

DNA-Polymer Hybride als molekulare Bausteine

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
im Promotionsfach Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz



vorgelegt von
Tina Kiefer
Geboren in Saarlouis

Mainz, 2010

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von Februar 2007 bis April 2010 am Institut für Physikalische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz angefertigt.

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 14.05.2010

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
2	Zielsetzung.....	7
3	Theoretische Grundlagen	9
3.1	Der Aufbau von Nukleinsäuren	9
3.2	Strukturstabilisierende Kräfte bei Nukleinsäuren	10
3.3	Schmelzen von DNA.....	14
3.3.1	Denaturierung und Hybridisierung.....	14
3.3.2	Schmelzkurven	15
3.3.3	Konzentrationsbestimmung.....	17
3.4	Chemische Synthese von Oligonukleotiden	18
3.5	Sequenzdesign.....	22
3.6	Die Polymerase Kettenreaktion	24
3.6.1	DNA-Polymerasen.....	25
3.6.2	Primer-Design.....	26
3.7	DNA-Ligasen	28
3.8	Elektrophorese	29
3.8.1	Gelelektrophorese	30
3.8.2	Präparative Gelelektrophorese	32
4	Ergebnisse und Diskussion	35
4.1	Synthese von DNA-Polymer-Hybriden.....	35
4.1.1	Kopplung von DNA mit synthetischen Polymeren	37
4.1.2	Synthese von asymmetrischen DNA ¹ -PEO-DNA ² -Dreiblockcopolymeren... 38	
4.1.3	Synthese von Dreiblockcopolymeren mit Diaminopolypropylenoxid..... 45	
4.2	Multiblockcopolymere durch Hybridisierung.....	61
4.2.1	Aufbau linearer Multiblockcopolymere aus asymmetrischen Dreiblockcopolymeren.	62
4.2.2	Polymerisation von Dreiblockcopolymeren.....	69
4.3	Integration kettensteifer dsDNA-Blöcke	76
4.3.1	Verknüpfung synthetischer dsDNA-Segmente über DNA ¹ -PEO-DNA ² Dreiblockcopolymere als Linker.....	77
4.3.2	Ligation der supramolekularen Hybridstruktur	87

4.4	Modellsysteme zur Untersuchung der Hybridisierungseffektivität	93
4.4.1	PCR-Produkte mit sticky-ends.....	95
4.4.2	PCR mit biotinylierten Primern	102
4.4.3	Hybridisierungseffizienz in Abhängigkeit von Segment- und Linkerlänge...	103
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	111
5.1	Zusammenfassung	111
5.2	Ausblick	117
6	Experimenteller Teil.....	120
6.1	Lösungsmittel und Chemikalien.....	120
6.1.1	Reinigung von Reagenzien und Lösungsmitteln	120
6.1.2	Flash-Säulenchromatographie	120
6.2	Synthese von Dreiblockcopolymeren.....	120
6.2.1	Darstellung der DNA ¹ -PEO-DNA ² -Dreiblockcopolymeren	120
6.2.2	Darstellung der DNA ¹ -PPO-DNA ² -Dreiblockcopolymeren.....	121
6.2.3	Abspalten der DNA vom Träger	121
6.2.4	Reinigung von DNA.....	122
6.3	Endgruppenfunktionalisierung des Polypropylenoxids.....	123
6.3.1	Mono-Tfa-geschütztes Diaminopolypropylenoxid.....	124
6.3.2	α -Fmoc- ω -Tfa-diaminopolypropylenoxid.....	124
6.3.3	Darstellung von 6-O-Dmt-capronsäure-NHS-Ester	125
6.3.4	Kopplung von 6-O-Dmt-capronsäure-NHS-ester an Mono-Tfa-diaminopolypropylenoxid	126
6.4	Polymerase Kettenreaktion	127
6.4.1	Aufarbeitung von PCR-Produkten	128
6.4.2	Magnetic Beads.....	128
6.5	Ligation.....	130
6.6	Analysen- und Trennmethode n	131
6.6.1	Gelelektrophorese.....	131
6.6.2	CEE (Continuous Elution Electrophoresis)	132
6.6.3	NMR-Spektroskopie.....	133
6.6.4	Elektrosprayionisation (ESI)	133
6.6.5	MALDI-Tof Massenspektrometrie	133
6.6.6	IR-Messungen.....	133
6.6.7	UV/VIS-Messungen.....	133
6.6.8	Gelpermeationschromatographie (GPC).....	133
6.6.9	AFM	134
7	Anhang	135

A:	Abkürzungsverzeichnis	135
B:	Chemikalien, Puffer, Nährmedien und Materialien.....	137
C:	Oligonukleotide.....	140
D:	Temperaturprogramme	144
E:	Verwendete Geräte	146
F:	Spektren.....	147
8	Literaturverzeichnis	150
	Danksagung	158

1 EINLEITUNG

Die DNA-Nanotechnologie hat sich im Laufe der letzten Jahre als interessanter Forschungszweig etabliert. Dabei werden die einzigartigen Selbsterkennungs- und Selbstorganisationseigenschaften der DNA ausgenutzt, um neue und kontrollierbare Strukturen aufzubauen [1-7]. Die programmierbare Selbstorganisation von DNA-Molekülen beruht darauf, dass zwei DNA-Einzelstränge nur dann miteinander eine stabile Bindung eingehen, wenn sie komplementäre Basensequenzen aufweisen. Begründet wurde dieses Gebiet schon in den frühen 80er Jahren von N. C. Seeman, als er seine ersten dreidimensionalen DNA-Strukturen konstruierte [8-11]. Prinzipiell können auch RNA [12] und andere Nukleinsäureanaloge [13-15] für den Aufbau von Nanostrukturen verwendet werden. Jedoch wird die DNA aufgrund ihrer automatisierten Synthese und der höheren physikalisch-chemischen Stabilität in diesem Zusammenhang am häufigsten genutzt.

DNA-Stränge können durch chemische *de novo*-Synthese bis zu einer Länge von ca. 150 Basen mit beliebiger Sequenz hergestellt werden. Dadurch wird die DNA über die Wahl der Basensequenz programmierbar und das *Self-Assembly* vorhersagbar. Ebenso ist es möglich sowohl direkt in der chemischen Synthese als auch postsynthetisch auf chemischem oder enzymatischem Wege eine Vielzahl von Modifikationen einzuführen.

Ein wichtiger Bestandteil beim Aufbau zwei- oder dreidimensionaler Strukturen ist das *sticky-end*: ein Einzelstrangüberhang, der wie eine Art Klebstoff verschiedene Bauteile zusammenhält. Über diese Sequenzen können gezielt Elemente hybridisiert werden, die über die komplementäre Sequenz verfügen. Die enzymatische Ligation dieser Komplexe ermöglicht dann die kovalente Verknüpfung.

Zum Aufbau größerer Strukturen müssen Verzweigungspunkte geschaffen werden. Bereits 1982 entwickelte N. C. Seeman dazu eine Strategie, die auf der Holliday-Junction beruht. Dieses Strukturmotiv ist während der genetischen Rekombination von Bedeutung. Hier sind vier miteinander verbundene Doppelstränge um einen Verzweigungspunkt angeordnet. Diese einfachen Komponenten, wie Doppelhelices und Kreuzstrukturen, erwiesen sich jedoch als zu flexibel, weshalb steifere DNA-Bausteine, wie *double*, *triple* oder *paranemic crossover*-DNA entwickelt wurden. Das *double crossover* Strukturmotiv, welches als Intermediat aus der Meiose bekannt ist, enthält zwei Holliday-Junctions, die durch zwei doppelhelikale Arme verbunden sind. Verschiedene Variationen doppelt-überkreuzter DNA-Moleküle, die sich durch die relative Orientierung ihrer Helixachsen unterscheiden, sind bekannt [16, 17]. *Double*

crossover Strukturen mit antiparalleler Orientierung sind stabiler als solche mit paralleler Orientierung (Abb. 1.1). Bei antiparalleler Orientierung liegt jeweils die kleine Furche einer Helix in der großen Furche der anderen Helix, dadurch werden die abstoßend wirkenden Coulomb-Kräfte geringer als bei paralleler Orientierung, in der sich jeweils die kleinen bzw. die großen Furchen begegnen [18].

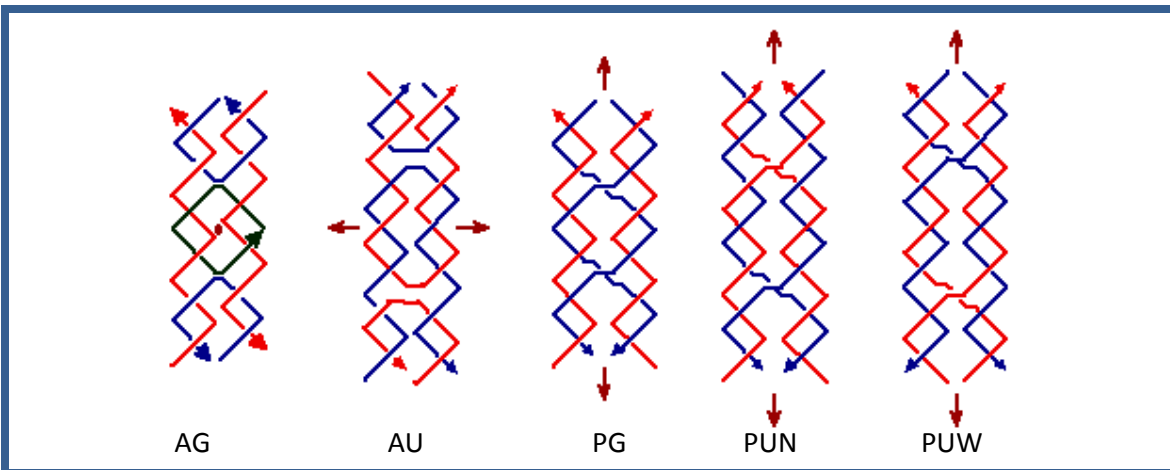


Abb. 1.1: Schematische Darstellung von double crossover Strukturen: A bzw. P stehen für parallele oder antiparallele Ausrichtung; G bzw. U geben die gerade oder ungerade Anzahl von halben Windungen zwischen zwei Überkreuzungen an; N bzw. W bezeichnen, ob sich die großen Furchen (W: wide) oder die kleinen Furchen (N: narrow) begegnen [19].

Ein Beispiel für ein größeres Konstrukt, bei dem mehrere DNA-Doppelhelices über gemeinsame Stränge miteinander verwoben sind, ist das Sechs-Helix-Bündel [20, 21]. Hier wurden sechs DNA-Doppelstränge durch jeweils zwei Überkreuzungspunkte miteinander verbunden. Dabei haben die Überkreuzungspunkte einen Abstand von 14 Basenpaaren. Dies entspricht $4/3$ Helixwindungen. Dadurch werden die Doppelstränge in einem Winkel von 120° zu einem hexagonalen Bündel angeordnet. Die Abb. 1.2 (a) zeigt die Sequenz des Moleküls und die Anordnung der Überkreuzungspunkte im Abstand von 14 Basenpaaren. Durch die Verwendung von *sticky-ends* ist das Molekül zur Selbstanordnung im Stande. In Abb. 1.2 (b) erkennt man gut die hexagonale Anordnung der Doppelstränge in der Stirnansicht; in (c) ist die Seitenansicht dargestellt.

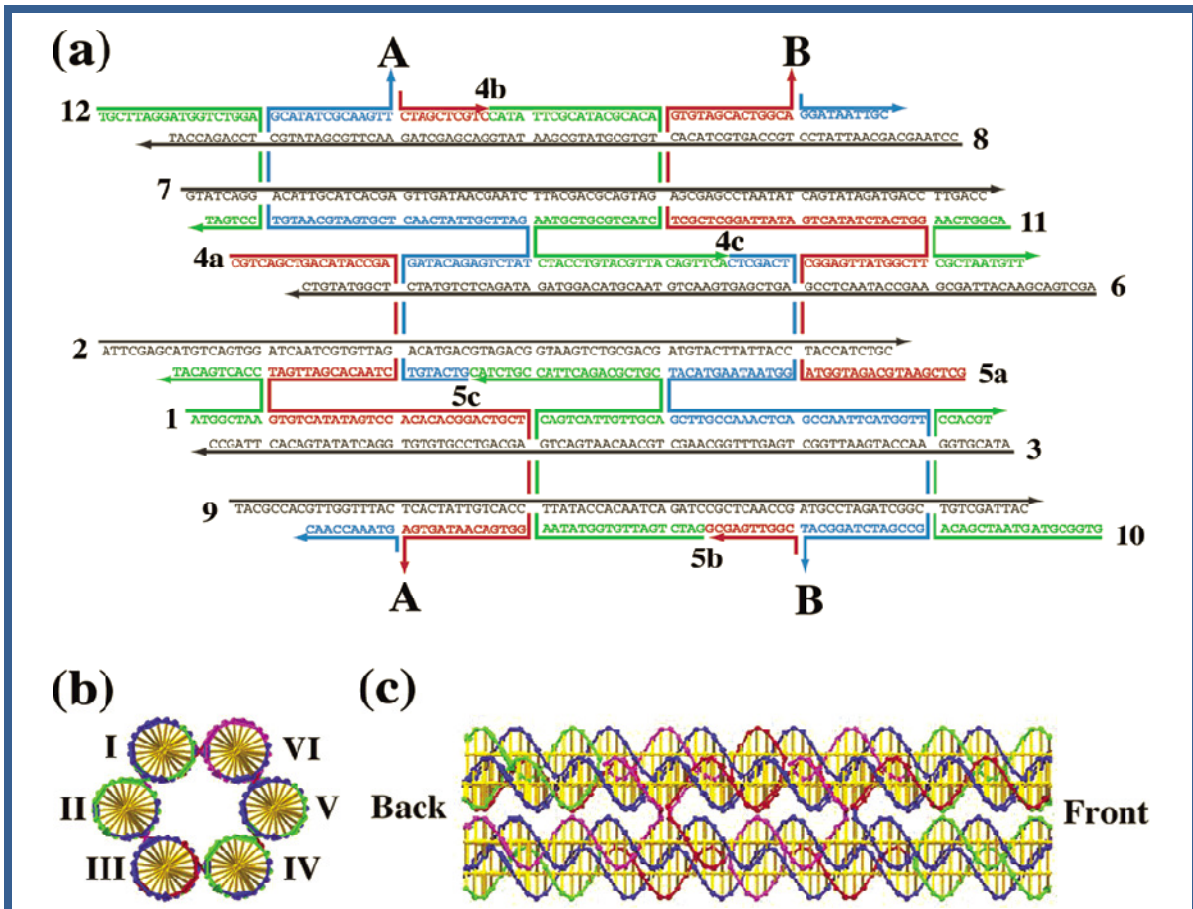


Abb. 1.2: Schematische Darstellung eines 6-Helix-Bündels. (a) zeigt die Anordnung der Crossover Stellen im Abstand von 14 Basenpaaren. (b) Frontansicht, bei der die hexagonale Anordnung der Doppelstränge im Bündel zu sehen ist. (c) Seitenansicht.

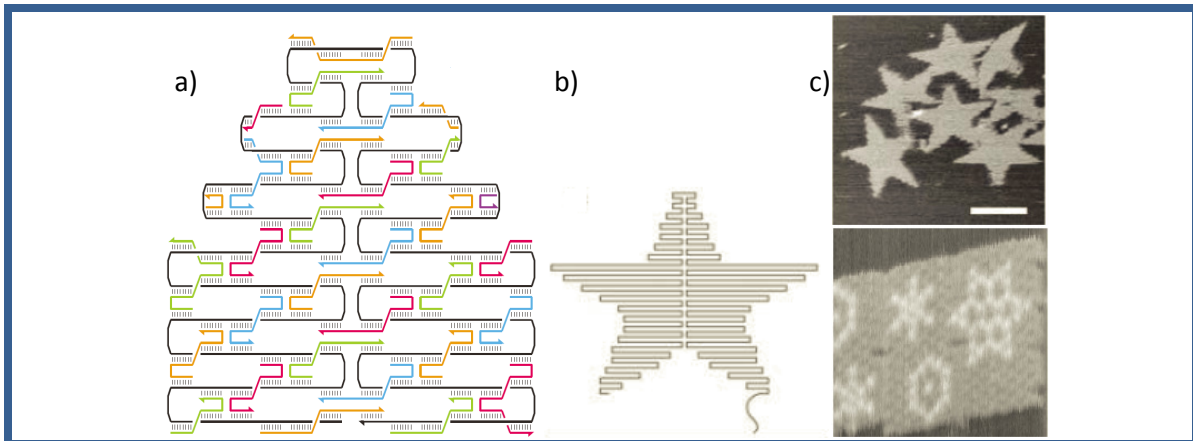


Abb. 1.3: DNA-Origami: a) Der lange DNA-Strang (schwarz) wird durch die Bildung von rigiden Crossover-Motiven mit kürzeren Klammersträngen (farbig) rasterartig in die gewünschte Form gefaltet. b) DNA-Stern als Faltungsschema. c) AFM-Aufnahmen der gebildeten Strukturen. (scale-bar: 100 nm).

Ein anderes Konzept zum Aufbau von DNA-Strukturen wurde vor einigen Jahren von P. W. K. Rothemund [22] entwickelt. Seine Methode zur Erzeugung zweidimensionaler Strukturen beruht auf einem einzelnen langen Gerüststrang (*scaffold strand*), der mit Hilfe vieler kleiner Klammerstränge (*staple strands*) in die gewünschte Form gefaltet wird (Abb. 1.3). Die Faltung

erfolgt unter Ausbildung von *crossover* Motiven rasch und in hoher Ausbeute. Im Unterschied zum traditionellen Ansatz muss hier keine Stöchiometrie eingehalten werden. Nach der Anlagerung der Klammerstränge an den Gerüststrang geht die Faltung lokal innerhalb des Gerüsts von statten. Durch die Zugabe eines großen Überschusses von Klammersträngen werden Fehlhybridisierungen durch Strangverdrängungsreaktionen verbessert. Durch dieses „DNA-Origami“ können beliebige Formen erzeugt werden. Jeder Klammerstrang hat eine individuelle Sequenz und somit eine einzige Position. Deshalb ist es möglich jede Position wie auf einem Steckbrett zu adressieren [23]. Mit dieser Technik gelang es mittlerweile W. M. Shih et. al. [24, 25] auch dreidimensionale Strukturen, wie ein Oktaeder zu falten. Programmierbare Nanoobjekte sind für viele Anwendungen von Interesse und in den letzten Jahren sind viele Fortschritte auf diesem Gebiet erzielt worden.

Neben der Strukturbildung auf Basis der Selbstorganisation von reiner DNA hat sich in den letzten Jahren ein interessantes Randgebiet der DNA-Nanotechnologie entwickelt, das auf der Verwendung biosynthetischer Hybridmaterialien beruht. Diese Hybridmaterialien, bestehend aus Einzelstrang-DNA und synthetischem Polymer, vereinen die Eigenschaften des Biomoleküls DNA, wie die Selbstorganisation, mit den Eigenschaften von Polymeren, wie Strukturbildung durch Mikrophasenseparation oder hydrophile, hydrophobe bzw. thermoresponsive Eigenschaften. Ein schönes Beispiel für die Verknüpfung von biologischer und synthetischer Strukturbildung ist die Anordnung adressierbarer DNA-PS-Mizellen durch die Hybridisierung mit DNA-modifizierten Goldpartikeln (Abb. 1.4). Somit können unter Ausnutzung der Selbsterkennung der DNA sowie der hydrophoben Wechselwirkungen wasserunlöslicher Polymersegmente definierte Nanostrukturen gebildet werden [26, 27].

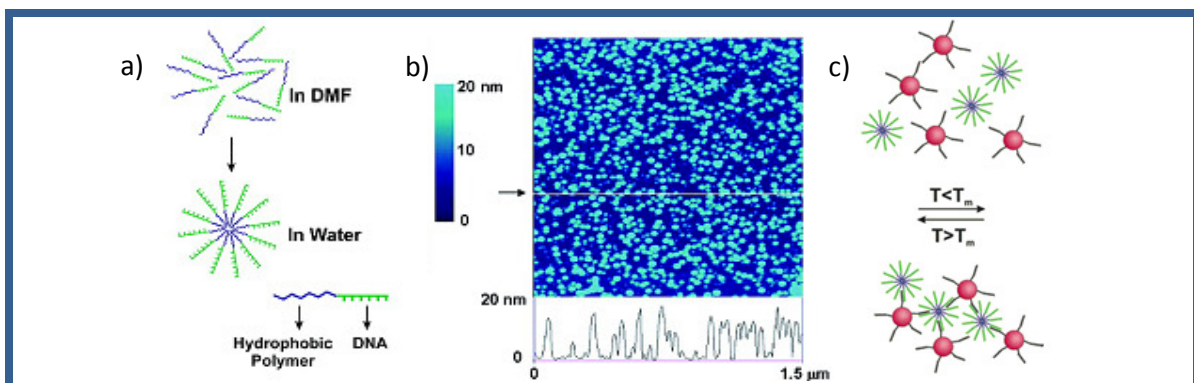


Abb. 1.4: a) Mizellenbildung der Zweiblockcopolymeren in Wasser; b) Tapping-Mode AFM-Bild der sphärischen DNA-PS-Blockcopolymermizellen; c) Anordnung der Mizellen durch Hybridisierung mit komplementärer Sequenz modifizierten Goldpartikeln. Durch Erhitzen über die Schmelztemperatur hinaus, wird die Anordnung wieder aufgehoben.

Zweiblockcopolymere können auf mehrere Weisen in Lösung oder trägergebunden durch verschiedene Kopplungsreaktionen dargestellt werden [27-31]. Auch grafting Methoden können verwendet werden, um bürsten- bzw. kammartige Strukturen zu erhalten [32-34]. Durch die Kombination synthetischer Polymere mit einer Oligonukleotidsequenz wurden bereits verschiedene lineare Zweiblockcopolymere mit Polystyrol-, Polypropylenoxid-, Polyethylenoxid- und Poly-N-isopropylacrylamidblöcken synthetisiert [28, 30, 35, 36]. Verwendung finden diese Zweiblockcopolymere als *delivery system* in der Gentherapie [37], zur Reinigung von Biomakromolekülen unter Ausnutzung der LCST von thermoresponsiven Polymeren [30, 38], der DNA-Templat gesteuerten Synthese [39] und der gezielten Formgebung von Mizellen [40, 41].

Die Synthese von A-B-A-Dreiblockcopolymeren aus zwei Oligonukleotiden und einem synthetischem Block ist in der Literatur nur vereinzelt zu finden [29, 42-45]. Dabei besteht der synthetische Block meist aus kleinen PEG-Spacer-Molekülen, die direkt in der Festphasensynthese eingeführt werden. Nur in einer Arbeit ist die Synthese von symmetrischen Dreiblocken mit bis-Phosphoramidit funktionalisierten PEGs verschiedener Größe ($M_n = 1000, 2000, 4000 \text{ g/mol}$) gelungen [46]. Eine Arbeit beschreibt außerdem die Herstellung eines Triblockcopolymeren aus zwei verschiedenen DNA Sequenzen und einem zentralen Oligopeptid, durch alternierende Anwendung der Standardtechniken zur Festphasensynthese von DNA- bzw. Aminosäuresequenzen [47]. Die ersten Ansätze zur Darstellung asymmetrischer Dreiblockcopolymere mit unterschiedlichen Oligonukleotidsequenzen auf beiden Seiten des synthetischen Blocks wurden in unserer Arbeitsgruppe entwickelt [48, 49].

2 ZIELSETZUNG

Im letzten Jahrzehnt hat sich die DNA durch die herausstechende Eigenschaft zur Selbstorganisation in den Naturwissenschaften zu einem beliebten Werkzeug entwickelt. Diese Eigenschaft konnte zum Aufbau komplexer Strukturen [50-52], zur DNA-Detektion [42, 44, 53] und zur Entwicklung nanoelektronischer Bauteile [54] genutzt werden. Auch in der Polymerchemie wird die DNA als monodisperses Molekül zur Darstellung und Untersuchung der Selbstanordnung diverser Hybridmaterialien genutzt. Eine neue Herausforderung dabei ist die Selbsterkennung der DNA zum Aufbau definierter Multiblockcopolymere zu nutzen. Multiblockcopolymere sind von großem wissenschaftlichem Interesse, da in diesen Makromolekülen meist chemisch inkompatible Polymere kovalent miteinander verknüpft sind. Diese Verknüpfung führt in Lösung zur Ausbildung von nanoskopischen Strukturen, wie Mizellen oder Vesikeln und zu verschiedenen Morphologien im Feststoff [55-57]. Die Strukturbildung kann dabei durch die Länge und die chemische Natur der einzelnen Blöcke kontrolliert werden [58-61]. In der klassischen Synthese stößt man dabei auf Limitierungen in Bezug auf Anzahl und Reihenfolge der Blöcke. Diese Limitierungen sollen durch die Synthese geeigneter Hybridmaterialien überwunden werden.

In dieser Arbeit sollen diskrete Multiblockcopolymere ausgehend von Dreiblockcopolymeren, bestehend aus einem synthetischen Polymerblock an dessen Enden verschiedene Oligonukleotidsequenzen angehängt sind, aufgebaut werden. Dabei sollen die Oligonukleotidblöcke ausreichend groß sein, um eine bei Raumtemperatur stabile Verknüpfung durch Hybridisierung zu erreichen. In der Literatur sind bereits Ansätze dieser Herangehensweise beschrieben [30], jedoch ist bisher nur die Synthese symmetrischer Dreiblockcopolymere (die gleiche Oligonukleotidsequenz auf beiden Seiten des synthetischen Polymers) gelungen. Die Synthese von definierten Multiblockcopolymerstrukturen ist in diesem Falle auf pentamere Strukturen aus einem Dreiblock und zwei Diblockcopolymeren beschränkt [29]. Durch die Synthese asymmetrischer Dreiblockcopolymere der Form $\text{DNA}^1\text{-Polymer-DNA}^2$ erhält man ein modulares System, wodurch verschiedene Polymere in beliebiger Reihenfolge und Anzahl miteinander verknüpft werden können.

Die DNA soll dabei nicht nur als Linker-Molekül zur Verknüpfung chemisch unterschiedlicher synthetischer Polymere genutzt werden, sondern auch als kettensteifes bzw. semiflexibles Strukturelement integriert werden. Die Blocklänge des kettensteifen Segments sollte dabei variierbar sein. Zu diesem Zweck sollen zum einen teilkomplementäre synthetische

Oligonukleotide dienen und zum anderen mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion große DNA-Fragmente erzeugt werden, da die Oligonukleotidsynthese auf 100-150 Basen begrenzt ist. Die Integration dieser Segmente kann dann durch die Verwendung von sticky-ends realisiert werden. Zur stabilen Verknüpfung der einzelnen Bausteine sollte die sticky-end Länge frei wählbar sein.

Auf diesen Grundlagen können schließlich die verschiedensten Parameter relativ einfach variiert werden, in Abhängigkeit derer dann der Einfluss auf die Strukturbildung untersucht werden kann: Durch die Verwendung verschiedener synthetischer Polymere sollte die Kombination von hydrophilen, hydrophoben und thermoresponsiven Eigenschaften gelingen. Es kann der Einfluss des kettensteifen Segments in Abhängigkeit von Blocklänge und Blockzahl untersucht werden. Aufgrund der Verwendung monodisperser Moleküle können Modellverbindungen synthetisiert werden, um theoretische Zusammenhänge zu untersuchen.

3 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

3.1 Der Aufbau von Nucleinsäuren

Die Nucleinsäuren treten in allen Zellen des Tier- und Pflanzenreichs auf. Sie regeln den Aufbau der Proteine, die für das Leben und die Funktion jeder Zelle notwendig sind.

Man unterscheidet zwei Arten von Nucleinsäuren: Desoxyribonucleinsäuren (DNA) und Ribonucleinsäuren (RNA). Die Nucleinsäuren sind lineare Polymere von Nucleotiden. Jedes Nucleotid besteht aus einer heterocyclischen Base der Pyrimidin- und Purin- Reihe, einer Pentose (2-Desoxyribose, bzw. Ribose) und Phosphorsäure im Molverhältnis 1:1:1. Die Phosphorsäure ist dabei mit der 3'-ständigen OH-Gruppe des Zuckerrests des einen und der 5'-OH-Gruppe des Zuckerrests des anderen Nucleosids verestert (Abb. 3.1). Dadurch hat jedes Oligonucleotid zwei chemisch unterschiedliche Enden, die nach dem „endständigen“ C-Atom der Ribose-Einheit als 5'- bzw. 3'-Ende bezeichnet werden.

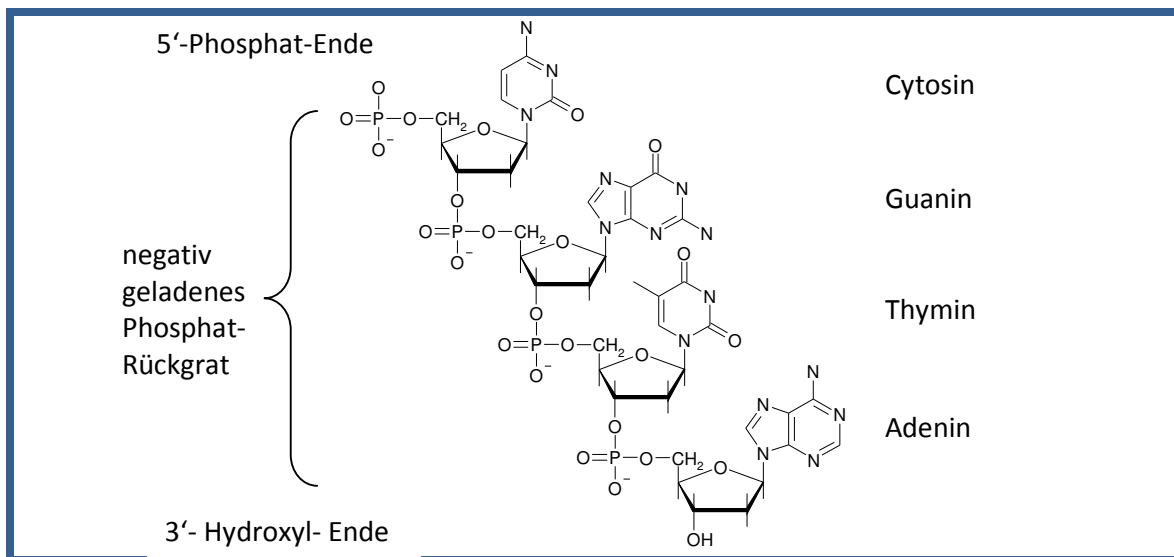


Abb. 3.1: Struktur der DNA, aufgebaut aus den vier verschiedenen Nucleobasen, die in natürlich vorkommender DNA auftreten. Die Verknüpfung mit dem C1-Atom der Riboseeinheit erfolgt bei den Purinbasen (Adenin bzw. Guanin) über die sekundäre Aminogruppe des Fünfrings. Die Pyrimidinbasen (Thymin bzw. Cytosin) sind über die N1-Position mit dem Kohlenhydrat verknüpft.

Die Nucleobasen sind mit verschiedenen Wasserstoffbrücken Donor- und Akzeptorgruppen funktionalisiert. Das relativ steife planare aromatische System führt zu einer definierten Orientierung der funktionellen Gruppen. Dadurch zeigt jede Base eine charakteristische strukturelle Identität, die die Grundlage der molekularen Erkennung bildet. Durch die Verknüpfung der verschiedenen Nucleotide zu oligomeren bzw. polymeren Sequenzen kann die molekulare Erkennung der Basen zum Speichern von Informationen ausgenutzt werden.

In den meisten Organismen wird die genetische Information auf der Basis von DNA gespeichert, während die RNA eine wichtige Rolle beim Ablesen des genetischen Codes (Transkription) und bei der Proteinbiosynthese (Translation) spielt. Während RNA durch die 2'-OH-Gruppe der Riboseeinheit anfällig für den autokatalytischen Prozess der hydrolytischen Spaltung des RNA-Rückgrates ist, tritt bei DNA gerade durch das Fehlen der OH-Gruppe die Depurinierung häufiger auf [62, 63]. An den so gebildeten abasischen Stellen wird die β -Eliminierung ermöglicht, die zur Spaltung des DNA Rückgrates führt. Neben DNA und RNA gibt es Nukleinsäuren, wie TNA (Threose-Nukleinsäure), PNA (Peptid-Nukleinsäure) oder GNA (Glycerol-Nukleinsäure), die sich nur im Aufbau des Polymerrückgrates von den beiden natürlich auftretenden Verwandten unterscheiden [64-67].

3.2 Strukturstabilisierende Kräfte bei Nukleinsäuren

J.D. Watson & F.H.C. Crick entwarfen 1953 mithilfe der Daten von Chargaff und der Röntgenkristallographie-Daten von R. Franklin und M. Wilkins das Modell der DNA-Doppelhelix [34]. Zwei gegenläufig orientierte Polynukleotidketten sind um eine gemeinsame Achse gewunden und bilden eine rechtsgängige Doppelhelix. Die Basen besetzen die Innenseite der Helix und sind über Wasserstoffbrücken mit der jeweiligen Base des gegenüberliegenden Stranges verknüpft (Abb. 3.2). Für die Stabilität der Doppelhelix und der in der DNA gespeicherten Information ist hauptsächlich die Basenpaarung zwischen komplementären Basen, sowie die Stapelwechselwirkungen aufeinanderfolgender Basen verantwortlich. Die AT-Basenpaarung wird durch zwei präzise ausgerichtete Wasserstoffbrücken verstärkt, die GC-Basenpaarung durch drei dieser Bindungen. Die Zucker-Phosphat-Ketten befinden sich an der Helixperipherie, dadurch wird die Abstoßung zwischen den negativ geladenen Phosphatgruppen minimiert. Stapelwechselwirkungen (stacking interactions) wirken in der Doppelhelix nur zwischen aufeinanderfolgenden Basenpaaren. Zwischen den aromatischen Ringsystemen der heterozyklischen Basen entsteht eine dipol-induzierte Dipol-Wechselwirkung, welche energetisch günstig ist. Die Bildung des ersten Basenpaares ist aufgrund des geringen Energiegewinnes und des Verlusts an Entropie zunächst ungünstig, jedoch ist die Elongation der Helix energetisch günstig, da die Basenpaarstapelung unter Energiegewinn verläuft [68].

Die Stapelwechselwirkungen sind sequenzabhängig und energetisch am günstigsten für gestapelte GC-GC, aber weniger günstig für gestapelte AT-AT. Diese Unterschiede in den

Stapelwechselwirkungen erklären hauptsächlich, warum GC-reiche DNA-Abschnitte thermodynamisch stabiler sind als AT-reiche, während Wasserstoffbrückenbildung hierbei eine untergeordnete Rolle spielt [69]. Die Persistenzlänge von doppelsträngiger DNA beträgt etwa 50 nm [70, 71], so dass kürzere dsDNA in guter Näherung als starr betrachtet werden kann.

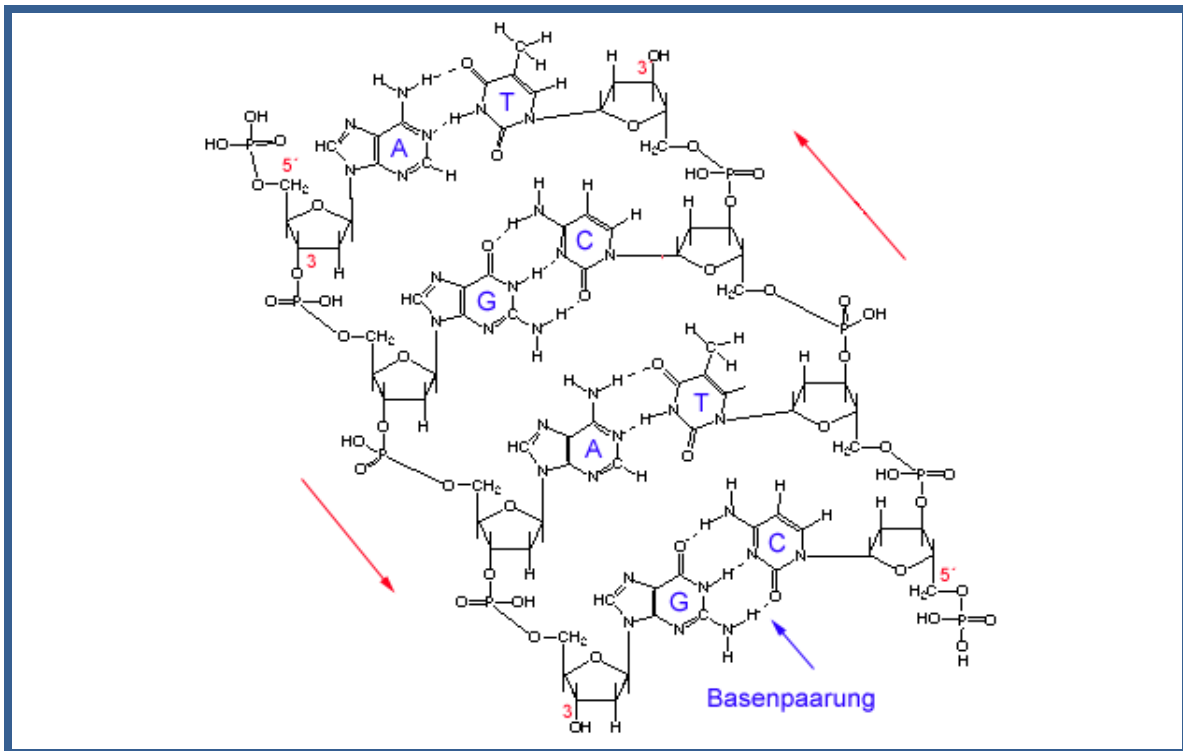


Abb. 3.2: Struktur der klassischen Basenpaarungen nach Watson und Crick. Adenin bindet an Thymin, Guanin bindet an Cytosin. Die beiden komplementären Stränge sind in antiparalleler Orientierung zu einer Doppelhelix umeinander gewunden [72].

In den 70er Jahren, als die Synthese kurzer DNA-Sequenzen Routine wurde, gab es auch vermehrt strukturelle Untersuchungen an DNA. Hierbei ergab sich bei dem Hexamer $d(CG)_3$ ein unerwarteter Befund. Die erhaltene Struktur unterschied sich deutlich von den bekannten Strukturen. Die Basen hatten z. B. bezüglich der Zuckerreste andere Ausrichtungen. Liegen bei der A- und B-DNA die Basen bezüglich der Ribose in der anti-Konformation (die Base zeigt vom Zuckerrest weg) vor, so wechseln sich hier die Orientierungen zwischen anti- und syn-Konformation (die Base ist zum Zuckerrest hin orientiert) ab.

Eine weitere Auffälligkeit ist der Verlauf des Rückgrates der DNA-Ketten. Diese zeigen einen deutlichen zick-zack-förmigen Verlauf, der für diese DNA-Konformation namensgebend wurde: Z-DNA. Die Entdeckung dieser weiteren DNA-Konformation wurde zwar zur Kenntnis genommen, führte aber in der Wissenschaft eher ein Schattendasein. Erst als eine Umwandlung der DNA von der B-Form in die Z-Form gezeigt werden konnte, verstärkte dies

das Interesse an Struktur und Funktion der Z-DNA. Mittlerweile ist bekannt, dass eine alternierende Abfolge von Purin- und Pyrimidin-Basen die Ausbildung der Z-DNA begünstigt. Im Gegensatz zu der B-Form ist die Z-Form thermodynamisch ungünstig, da sich die Phosphatgruppen hier sehr nahe kommen. Durch negatives Supercoiling kann dieser Energieverlust ausgeglichen und die Ausbildung von Z-DNA begünstigt werden.

Neben den klassischen Watson-Crick Basenpaarungen sind beliebig viele alternative Strukturen möglich (Abb. 3.3). Tautomerisierung und Ionisierung ändern die Elektronenkonfiguration der Basen, was auch eine Änderung der Basenpaarungseigenschaften mit sich zieht. Die Reversed Watson-Crick Paarung erhält man durch Drehung eines Nukleotids um 180°. Hoogsten-Basenpaarungen benutzen die C6-N7 Seite des Purins für die Wasserstoffbrückenbindung mit der N3-C4 Seite der Pyrimidin Base [73]. Wobble Basenpaare sind die nicht Watson-Crick-Paarungen G-T und A-C.

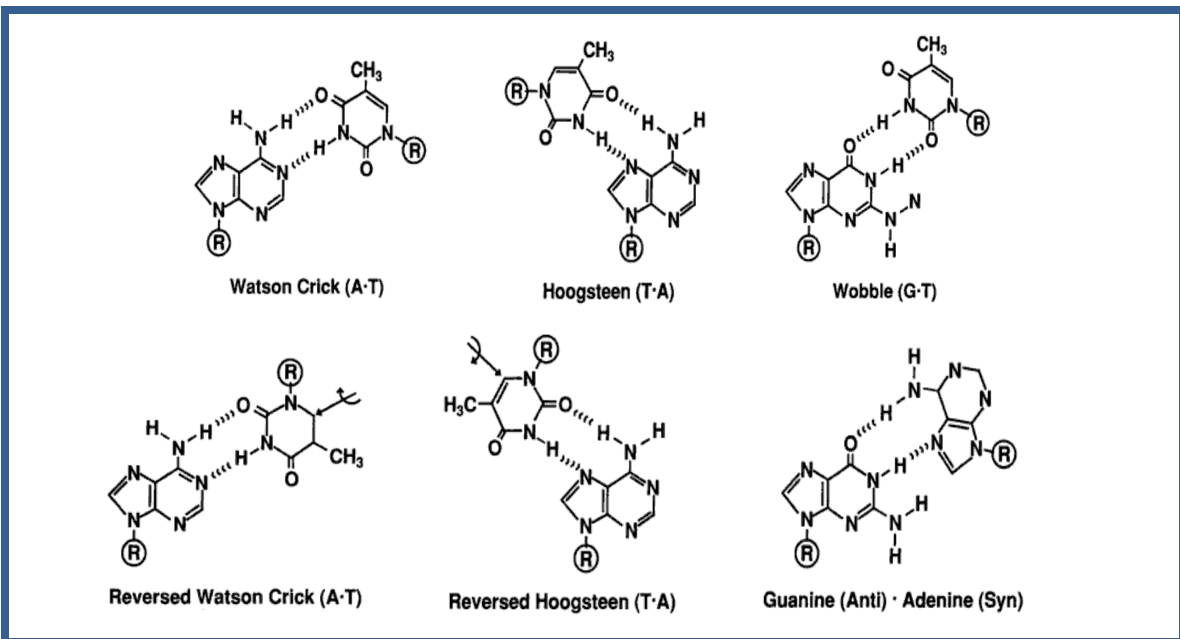


Abb. 3.3: Alternative Basenpaarungsmuster: Neben der bevorzugten Watson-Crick Basenpaarung sind beliebig viele andere Formen der Basenpaarung möglich [74].

Zusätzlich sind die Basen der DNA nicht nur zur Ausbildung der nach innen gerichteten Watson-Crick-Paarungen in der Lage, sondern können über andere Wasserstoffbrücken auch an der Außenseite der Doppelhelix Nukleotide anlagern. Diese ebenfalls spezifische Basenpaarung bezeichnet man als Hoogsteen-Wasserstoffbrücken. Es hat sich herausgestellt, dass ein G, gebunden an ein GC-Paar, und ein T, gebunden an ein AT-Paar, besonders stabil sind. Über solche Hoogsteen-Basenpaarungen kann sich ein weiterer DNA-Strang in die große Furche einer DNA-Doppelhelix unter Ausbildung einer DNA-Tripelhelix, auch als H-DNA bezeichnet, einlagern. Da alle Watson-Crick Basenpaarungen schon besetzt sind, muss der

dritte Strang Hoogsteen Basenpaare ausbilden. Deshalb ist die Bildung der Tripel-Helix auch nur für Purin-reiche Sequenzen möglich, da dort zwei Angriffsflächen für die Wasserstoffbrückenbindung vorhanden sind.

Die DNA ist ein flexibles und vielseitiges Molekül, was z. B. durch die unterschiedlichen Konformationsmöglichkeiten zum Ausdruck kommt. Guanosin-reiche DNA kann eine viersträngige Helix bilden. Vier Guanin-Basen liegen hierbei in einer Ebene und sind über Wasserstoffbrücken-Bindungen miteinander verbunden. Diese DNA-Struktur wird daher als G-Quadruplex bezeichnet. Diese Strukturen können sich durch Rückfaltung innerhalb eines Stranges oder auch zwischen unterschiedlichen Strängen ausbilden. DNA-Quadruplex-Strukturen sind in der Natur weit verbreitet und üben wichtige Funktionen aus. Die 3'-Enden der linearen DNA eukaryotischer Zellen besitzen beispielsweise spezielle Sequenzen, die so genannten Telomere. Diese bestehen beim Menschen aus Tandem-Wiederholungen mehrerer hundert bis tausend G-reicher Sequenzen. Derartige Sequenzen bilden *in vitro* spontan Quadruplex-Strukturen aus, was die Vermutung nahe legt, dass die Telomere der Chromosomen ebenso in dieser Konformation vorliegen. Die Ausbildung besonderer Strukturen der DNA-Enden ist für die Zellen von entscheidender Bedeutung, da dies die Unterscheidung zwischen dem normalen Ende eines Chromosoms und dem aus einem DNA-Bruch entstandenen Ende erlaubt. Somit wird eine Verknüpfung der einzelnen Chromosomen durch die DNA-Reparaturenzyme verhindert. Die Kenntnisse über derartige Strukturmodelle haben zu neuartigen Ansätzen in der Entwicklung von Therapeutika geführt. Eine Strategie verfolgt die Fähigkeit von DNA, dreisträngige Helizes auszubilden: Synthetische Oligonukleotide können sequenzspezifisch mit der DNA interferieren und hierdurch die Genexpression bzw. Replikation verhindern. Eine andere Strategie nutzt die Entwicklung spezifischer G-Quadruplex-bindender Substanzen, welche die G-Quadruplex-Struktur stabilisieren. Dadurch wird die Funktion der Telomerase, welche für die Verlängerung der Telomere zuständig ist, verhindert. Dies ist von Vorteil bei der Krebstherapie, da die Telomerase in vielen Krebsarten dereguliert und ständig aktiv ist. Ein weiteres Ziel ist die selektive Unterdrückung der Transkription bestimmter Proto-onkogene, die Vorstufen von Krebszellen sind und durch schädliche Einflüsse in die krebserzeugende Form verwandelt werden. Eine natürliche vorkommende G-Quadruplex-bindende Substanz ist z. B. das von *Streptomyces anulatus* gebildete Telomestatin. Erste G-Quadruplex-bindende Substanzen befinden sich in der klinischen Versuchsphase zur Behandlung bestimmter Krebsformen [74, 75].

3.3 Schmelzen von DNA

3.3.1 Denaturierung und Hybridisierung

Die Selbstorganisation der DNA aus zwei komplementären Einzelsträngen zu einem Doppelstrang wird als Hybridisierung bezeichnet. Die Hybridisierung wird durch viele Faktoren beeinflusst: Die Eigenschaften der DNA-Sequenz selbst, wie Länge und Basenkombination, sowie die Salzkonzentration des umgebenden Mediums und die Temperatur spielen eine entscheidende Rolle [76, 77]. Während der Hybridisierung kommt es zur zufälligen Kollision zwischen den Molekülen. Bei einem korrekten Kontakt erfolgt anschließend die Bindung zum Doppelstrang reißverschlussartig. Bisher gibt es aus der Molekularbiologie lediglich empirische Formeln zur Berechnung der Hybridisierungszeit für eine gegebene Sequenzlänge unter bestimmten Umgebungsparametern. Diese Formeln dienen eher der Zeitabschätzung, müssen aber immer auf den jeweiligen Fall optimiert werden. Ebenso ist die Anwesenheit anorganischer Salze, wie NaCl oder MgCl₂ für die Stabilisierung der Doppelhelix in wässriger Lösung nötig [78]. Der Umkehrprozess der Hybridisierung ist das Schmelzen bzw. Denaturieren der DNA. Die Denaturierung kann durch Basen, Säuren oder Erhitzen erfolgen. Die Temperatur, bei der 50 % der Basenpaare aufgebrochen sind, wird als Schmelztemperatur T_m bezeichnet und ist charakteristisch für eine bestimmte DNA-Sequenz. Die Schmelztemperatur steigt linear mit dem GC-Gehalt. Beim Schmelzvorgang wird die Basenstapelung aufgehoben und die Wasserstoffbrücken zwischen den Nukleobasen gebrochen. Dadurch trennen sich die komplementären Stränge der Doppelhelix. Beim langsamen Abkühlen können die Stränge wieder Renaturieren und wieder eine Doppelhelix ausbilden. Beim schnellen Abkühlen kollabieren die DNA-Stränge und nehmen eine zufällige Knäuelkonfiguration an.

Das Wissen über die thermische Denaturierung ist von fundamentaler Bedeutung. Der Erfolg vieler molekulargenetischer Methoden, wie die PCR und Hybridisierung beruhen auf einer stabilen DNA-Doppelstrangbildung. In Hybridisierungsexperimenten ist es wichtig, die minimal erforderliche Länge des Oligomers zu kennen, damit eine stabile Doppelhelix unter den gegebenen Konditionen gebildet werden kann. Die Molekularbiologie und Genetik beschäftigen sich in der Regel mit Abschnitten des Genoms, welche einige tausend Basenpaare lang sind. Da in dieser Arbeit nur DNA-Stücke mit weniger als tausend Basenpaaren (meist 23 bp) zur Hybridisierung verwendet wurden, sind die Erkenntnisse aus der Molekularbiologie nicht unmittelbar übertragbar.

3.3.2 Schmelzkurven

Die einfachste Methode, um den Schmelzvorgang der DNA zu beobachten, ist die Aufzeichnung der temperaturabhängigen Absorptionsänderung bei 260 nm mittels UV-Spektroskopie [79, 80]. Aufgrund der Basenstapelung hat doppelsträngige DNA einen geringeren molaren Extinktionskoeffizienten als die Summe der molaren Extinktionskoeffizienten der einzelnen Nukleobasen. Während der Temperaturerhöhung ändert sich infolge der Strukturänderung der Nukleobasen der Extinktionskoeffizient. Dadurch kommt es beim Schmelzen der DNA zu einer Zunahme der UV-Absorption. Man bezeichnet dies als den hyperchromen Effekt. Wenn man nun die Änderung der UV-Absorption in Abhängigkeit von der Temperatur aufzeichnet, ergibt sich eine sigmoide Schmelzkurve, an deren Wendepunkt die Schmelztemperatur T_m abgelesen werden kann (Abb. 3.4).

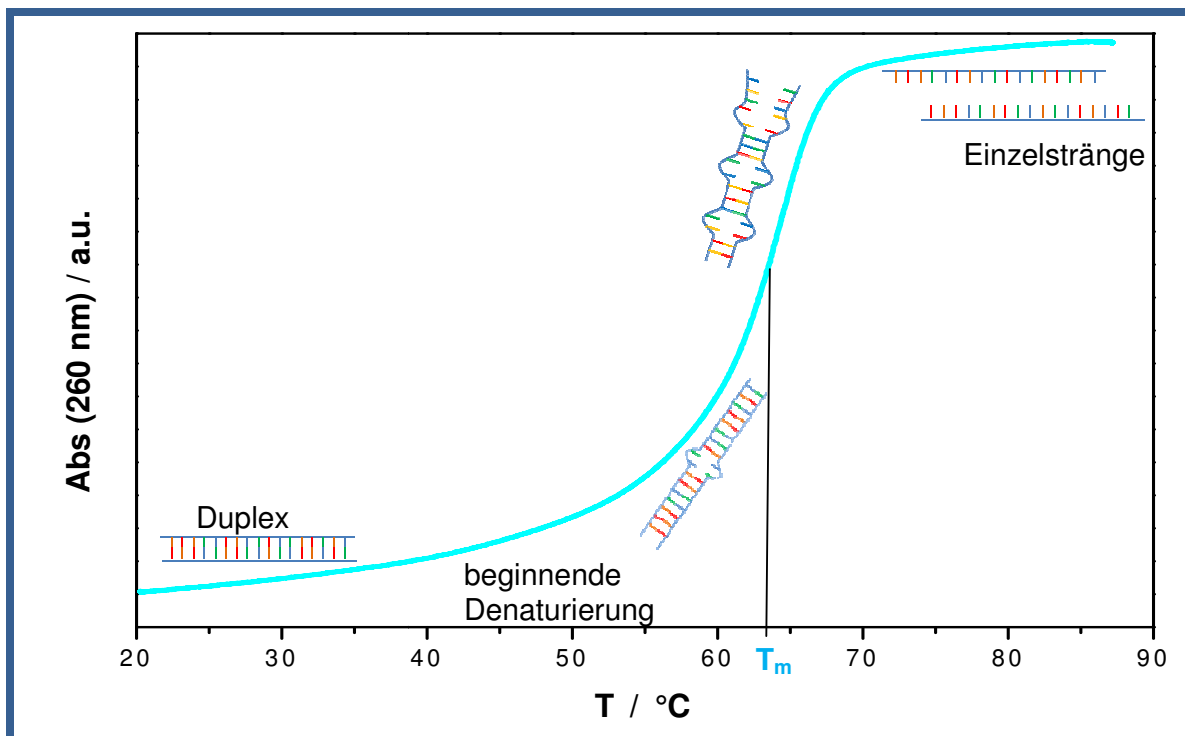


Abb. 3.4: Schmelzkurve eines DNA-Doppelstrangs mit sigmoidem Verlauf.

Die Phasenumwandlung vollzieht sich in einem engen Temperaturintervall. Beim Schmelzen von DNA handelt es sich um einen kooperativen Prozess, der in erster Linie auf die Basenstapelung zurückzuführen ist. Der leichte, lineare Anstieg der Absorption bei niedrigeren Temperaturen kommt durch das langsame Aufweiten der Basenstapelung zustande. Mit steigender Temperatur werden die Wasserstoffbrücken gebrochen und die Basenstapelung aufgehoben. Am Schmelzpunkt liegen 50 % der Stränge als Einzelstrang vor. Man kann sich vorstellen, dass einzelne aufgeschmolzene Basenpaare (in den am wenigsten stabilen Bereichen der Doppelhelix) das Aufbrechen weiterer benachbarter Basenpaare begünstigen.

Es konnte elektronenmikroskopisch gezeigt werden, dass längere Bereiche der DNA als Einheit schmelzen, und sich diese Bereiche mit noch doppelsträngigen Bereichen abwechseln. Bei einer bestimmten Temperatur kommt es dann zum sehr raschen Zusammenbruch der doppelhelikalen DNA Struktur und zur Trennung in die Einzelstränge. Das ist ähnlich dem Schmelzen kristalliner Substanzen, bei dem sich die Phasenumwandlung ebenfalls in einem engen Temperaturintervall vollzieht [81]. Der lineare Anstieg nach der Separation der Stränge kann durch eine weitere Aufhebung der Wechselwirkungen in den Einzelsträngen erklärt werden.

Auch einzelsträngige Oligodesoxynukleotide zeigen Schmelzkurven aufgrund von geordneten und unspezifischen Wechselwirkungen, wie Hairpin-Strukturen, Einzelstrang-Helix-Formation und schwache kooperative Wechselwirkungen. Der Schmelzbereich ist allerdings sehr breit und nur von geringer Energie [82-84].

Die Schmelzpunkte wurden durch die Ermittlung des Anteils an gebrochenen Basenpaaren Θ_B bestimmt. Dazu wird jeweils eine obere ($A_U(T)$) und eine untere ($A_L(T)$) Basislinie definiert (Abb. 3.5). Wenn man den Abstand der unteren Basislinie von der Absorptionskurve mit dem Abstand der beiden Basislinien ins Verhältnis setzt, erhält man den Anteil an gebrochenen Basenpaaren Θ_B in Abhängigkeit der Temperatur (Gleichung 1).

$$\Theta_B = [A(T) - A_L(T)] / [A_U(T) - A_L(T)] \quad (1)$$

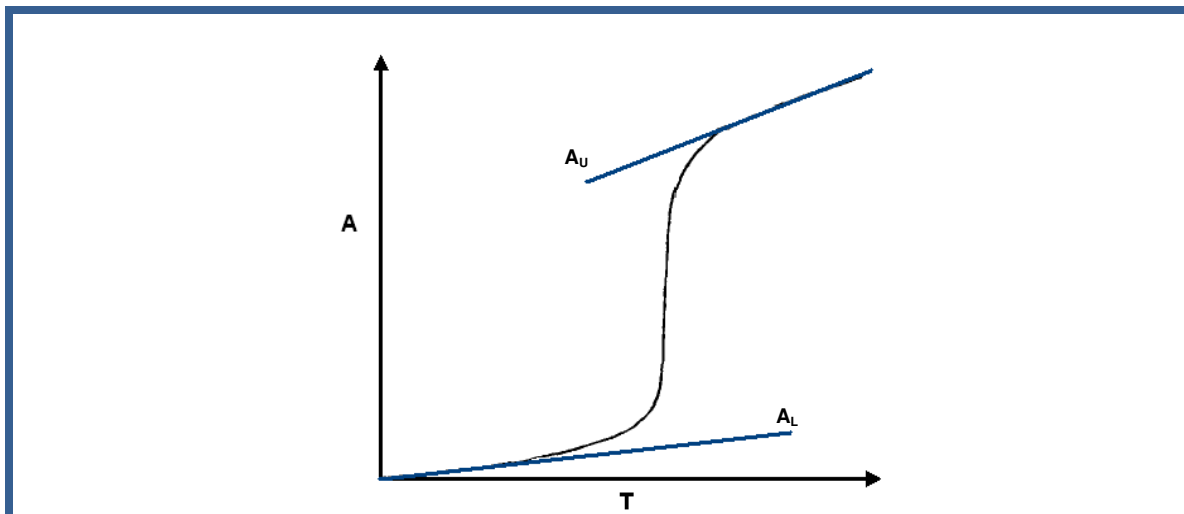


Abb. 3.5: Darstellung des Verlaufs einer typischen Schmelzkurve mit der oberen und unteren Basislinie. Durch die Berechnung des Abstands der unteren Basislinie von der Absorptionskurve im Verhältnis zum Abstand der beiden Basislinien erhält man den Anteil an gebrochenen Basenpaaren in Abhängigkeit der Temperatur. [85, 86]

Nach Definition ist der Schmelzpunkt erreicht, wenn der Anteil an gebrochenen Basenpaaren $\Theta_B = 0,5$ beträgt.

3.3.3 Konzentrationsbestimmung

Die am weitesten verbreitete Methode zur Konzentrationsbestimmung von DNA ist die Messung der Absorption bei 260 nm. Aus diesem Grund werden DNA-Konzentrationen üblicherweise in optischen Dichten (OD) angegeben. Dabei entspricht 1 OD der Menge an DNA, die in einem Milliliter bei 1 cm Schichtdicke bei $\lambda = 260$ nm zu einer Absorption von 1 führt. Die Berechnung der Konzentration erfolgt dann meistens über einfache Schätzwerte. Dabei muss im Falle der DNA aufgrund des hyperchromen Effektes unterschieden werden, ob es sich um Einzelstrang- oder Doppelstrang-DNA handelt. In der Literatur findet man Werte zwischen 47-50 $\mu\text{g/ml}$ bei dsDNA und 30-38 $\mu\text{g/ml}$ für ssDNA [87]. Hierbei geht man davon aus, dass die Extinktionskoeffizienten von DNA-Sequenzen mit statistischer Basenfolge bei ausreichender Länge nicht mehr von der individuellen Sequenz abhängen. Genau genommen müsste der Extinktionskoeffizient für jede Sequenz untersucht werden, da der Extinktionskoeffizient vom Verhältnis der Purin zu den Pyrimidinbasen sowie von den Wechselwirkungen benachbarter Basen abhängt. Es gibt verschiedene Ansätze zur Berechnung der Extinktionskoeffizienten [88-92]. Einen Ansatz zur Berechnung des Extinktionskoeffizienten von Oligonukleotiden bietet das „Nearest-Neighbour Verfahren“. Hier werden die Beiträge von allen in der Sequenz auftretenden Dinukleotiden aufsummiert. Das Verfahren berücksichtigt somit nicht nur die Zusammensetzung der Sequenz sondern auch die Reihenfolge der verschiedenen Basen [93].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Berechnung der DNA-Konzentrationen Schätzwerte von 37 $\mu\text{g/ml}$ für Einzelstränge und 47 $\mu\text{g/ml}$ für Doppelstränge bei einer Absorption von 1 und einer Schichtdicke von 1 cm bei 260 nm zugrunde gelegt.

3.4 Chemische Synthese von Oligonukleotiden

Eine ausgereifte Synthesechemie und moderne Parallelsynthesizer erlauben heutzutage die schnelle und effiziente Herstellung von Oligonukleotiden beliebiger Sequenz. In der Festphasensynthese wird die gewünschte Oligonukleotidsequenz an einem inerten Trägermaterial durch repetitive Kopplungsreaktionen aufgebaut und nach Syntheseende von diesem abgespalten. Gegenüber einer Synthese in Lösung hat die Festphasensynthese den großen Vorteil, dass die einzelnen Zwischenstufen nicht mühsam isoliert werden müssen, sondern überschüssige Reagenzien und abgespaltene Schutzgruppen durch einfache Wasch- und Filtrationsschritte entfernt werden können. Die Anfänge der Festphasensynthese von Oligonukleotiden beruhen auf der Phosphordiestermethode, die Mitte der 50er Jahre von H. G. Khorana et al. entwickelt wurde [94, 95]. Ende der 60er Jahre wurde von R. L. Letsinger die festkörperunterstützte Oligonukleotidsynthese vorgestellt, die zur Entwicklung des ersten DNA-Synthesizers führte. Jedoch erst die von M. Caruthers [96, 97] entwickelte Phosphoramiditchemie erlaubte eine effektive Kommerzialisierung. Diese löste die bis dahin praktizierte Phosphotriester- [98] und Phosphitriestermethode [99] ab.

Bei dieser Methode erfolgt der Synthesestart über ein Trägermaterial, das mit dem benötigten 3'- Nukleosid des zu synthetisierenden Oligonukleotids derivatisiert ist (Abb. 3.6). Üblicherweise ist das Startnukleosid über basenlabile Linker an Controlled Pore Glass (CPG) oder Polystyrol Beads gekoppelt.

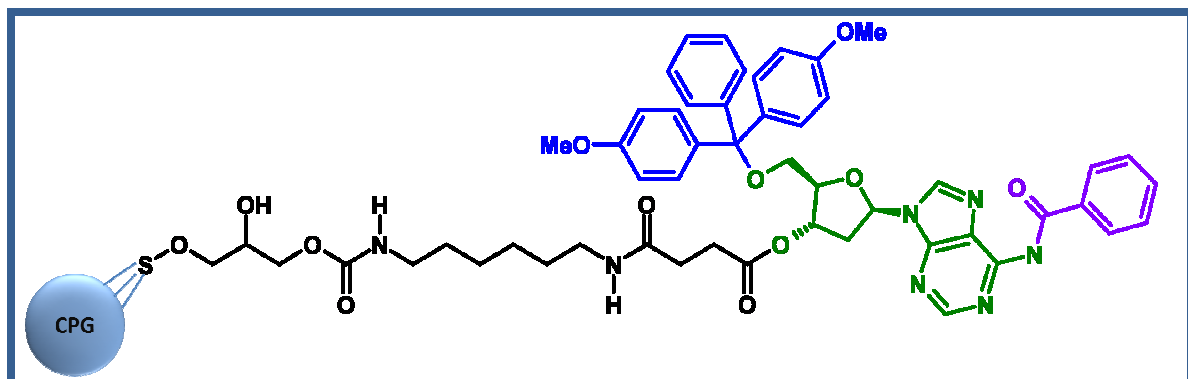


Abb. 3.6: Der basenlabile Linker (schwarz) verknüpft das erste Nukleotid (grün) über die die 3'-OH-Gruppe mit dem Trägermaterial. Die Dimethoxytritylschutzgruppe an der 5'-OH-Gruppe (blau) kann selektiv abgespalten werden, während die Schutzgruppen der exozyklischen Aminogruppen der Nukleotide (violett) während der gesamten Synthese erhalten bleiben.

Die Trägermaterialien sind für alle vier Nukleotide mit unterschiedlichen Porengrößen und Belegungsdichten kommerziell erhältlich. Als Alternative gibt es auch sogenannte „universal supports“. Bei diesen ist ein geeigneter Linker mit dem CPG verknüpft, an den im ersten

Syntheseschritt eine beliebige Base gekoppelt werden kann. Für spezielle Anwendungen stehen außerdem photosensible oder chemisch inerte Linkermoleküle zur Verfügung.

Die chemische Synthese von Oligonukleotiden wird ausgehend vom 3'-Nukleosid in 5'-Richtung durchgeführt. Der Synthesesyklus besteht aus vier Schritten:

a) Detritylierung

Von dem an der festen Phase verankerten Baustein (Startnukleosid oder später die wachsende Oligokette) wird die säurelabile 5'-Dimethoxytrityl-Schutzgruppe mit Di- bzw. Trichloressigsäure (2-3 Vol%) in Dichlormethan abgespalten. Auf diese Weise wird eine freie reaktionsfähige Hydroxyfunktion erhalten.

b) Kopplung:

Die Kopplungsreaktion erfolgt durch die Aktivierung des zugesetzten 3'-Phosphoramidits mit Tetrazol und anschließender Umsetzung der reaktiveren primären 5'-OH-Gruppe der trägergebundenen Komponente. Es entsteht eine Verknüpfung der beiden Nukleosidbausteine über eine Phosphitbrücke. Die Kopplungsreaktion verläuft typischerweise mit einer Kopplungsausbeute von ca. 98-99 %.

c) Blockieren (Capping):

Die nicht umgesetzten 5'-OH-Gruppen werden im Capping-Schritt durch Acetylierung mit Acetanhydrid blockiert. Durch diesen Schritt wird verhindert, dass der Synthesesyklus Oligonukleotide mit falscher Basenabfolge liefert. Als Nebenprodukte werden somit Oligonukleotide der erwünschten Basenabfolge gebildet, die jedoch im Verlauf der Synthese abgebrochen wurden und somit kürzer als die eigentliche Zielsequenz sind (Fehlsequenzen).

d) Oxidation:

Die im Kopplungsschritt entstandene internukleotidische Phosphitgruppierung wird durch Iodlösung zum Phosphat oxidiert.

Ein neuer Synthesesyklus wird wieder mit Schritt a) begonnen. Diese Reaktionen werden wiederholt bis die gewünschte Oligonukleotidsequenz hergestellt ist (Abb. 3.7).

Bei der Freisetzung der reaktiven 5'-OH-Gruppe wird zu Beginn eines jeden Kopplungszyklus ein Dimethoxytrityl-Kation durch saure Abspaltung gebildet, dessen Menge photometrisch bzw. durch Leitfähigkeitsmessung bestimmt werden kann. Unter Annahme einer vollständigen Abspaltung der Dmt-Gruppe von der Oligonukleotid-Kette kann aus der Menge an Dmt-Kationen auf die Effizienz des vorhergegangenen Kopplungsschritts geschlossen werden. Diese „Tritylwerte“ und damit die schrittweisen Kopplungsausbeuten sind ein Maß für die Güte des Syntheseverlaufs.

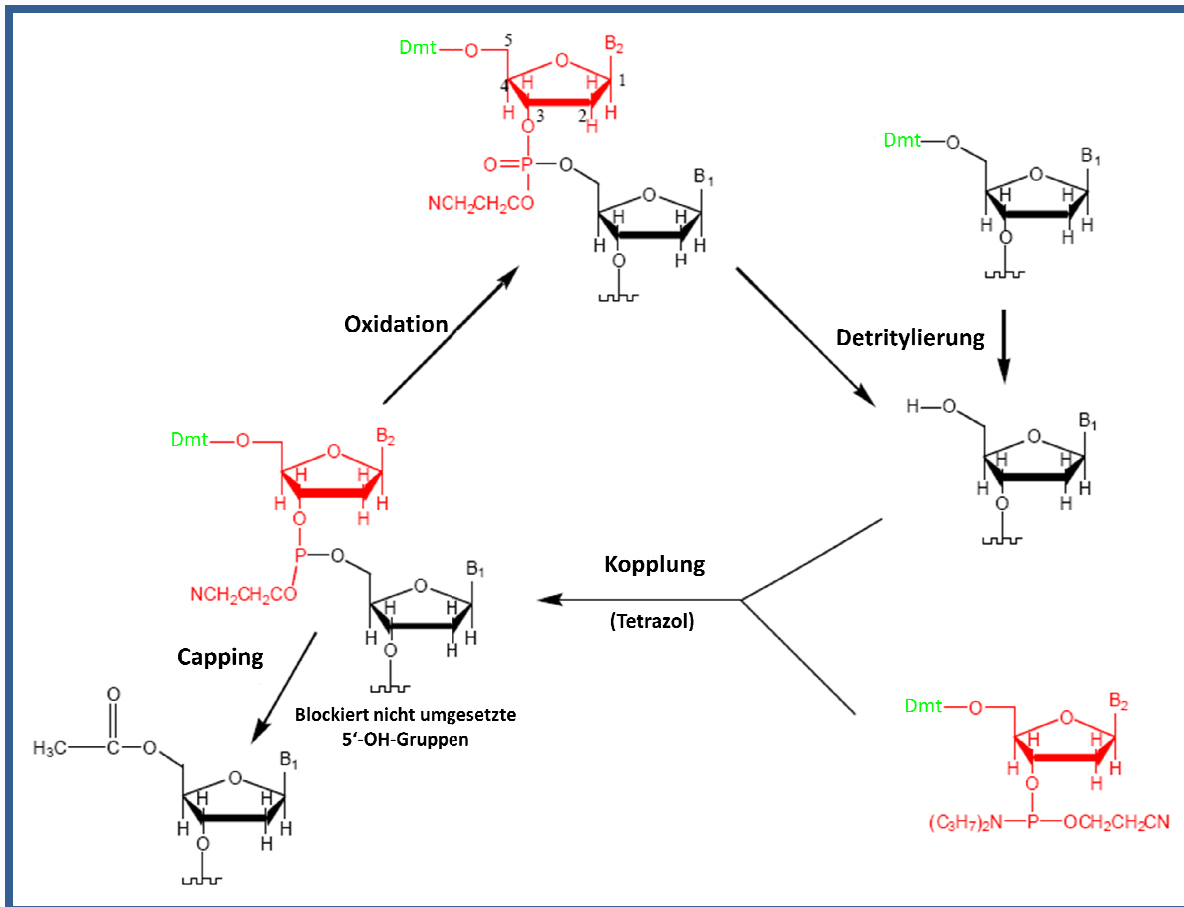


Abb. 3.7: Syntheszyklus von Oligonukleotiden nach R. Letsinger und M. Caruthers: Im ersten Schritt wird die 5'-OH-Gruppe des trägergebundenen Nucleotids freigesetzt. Die Kopplung erfolgt durch die Umsetzung dieser primären OH-Gruppe mit der Phosphoramiditfunktion des nächsten Nucleotids. Anschließend wird die neu gebildete Phosphitgruppe zum stabilen Phosphortriester oxidiert. Die OH-Gruppen, die während der Kopplungsreaktion nicht abreagieren, werden durch Acetylierung mit Acetanhydrid blockiert.

Mit dem gezeigten Syntheszyklus können standardmäßig Oligonukleotide bis zu einer Länge von ca. 100-150 Basen erzeugt werden. Durch Behandlung des fertigen trägergebundenen Oligonukleotids mit konzentrierter Ammoniaklösung und Erwärmung auf 50-80 °C für 1-8 h wird die Esterbindung zwischen der 3'-OH-Gruppe des Oligomeren und Träger gespalten, gleichzeitig erfolgt die vollständige Entschützung. Ein wichtiges Detail, das aus dem Verlauf der Oligonukleotidsynthese folgt, ist die Tatsache, dass synthetische Oligonukleotide in der Regel an beiden Enden OH-Gruppen aufweisen, während biologisch intakte DNA immer eine 3'-OH-Gruppe und eine 5'-Phosphatgruppe trägt. Wenn Oligonukleotide z. B. in Ligationsexperimenten eingesetzt werden sollen, ist es jedoch möglich den Syntheseweg so zu modifizieren, dass eine 5'-Phosphatgruppe am Ende der Sequenz erhalten wird.

Die durchschnittliche schrittweise Kopplungsausbeute während der Oligonukleotidsynthese hat einen dramatischen Einfluss auf die theoretisch erzielbare prozentuale Menge der Zielsequenz. Da die eigentliche Kopplungsreaktion in der Regel eine Umsetzung von etwa

98-99 % liefert, nimmt die Ausbeute der gebildeten Zielsequenz mit zunehmender Länge des Oligonukleotids deutlich ab. Selbst bei einer sehr guten schrittweisen Kopplungsausbeute von 99 % kann die Synthese eines Oligonukleotids mit 70 Basen nur knapp 50 mol% der erwünschten Zielsequenz liefern (Abb. 3.8).

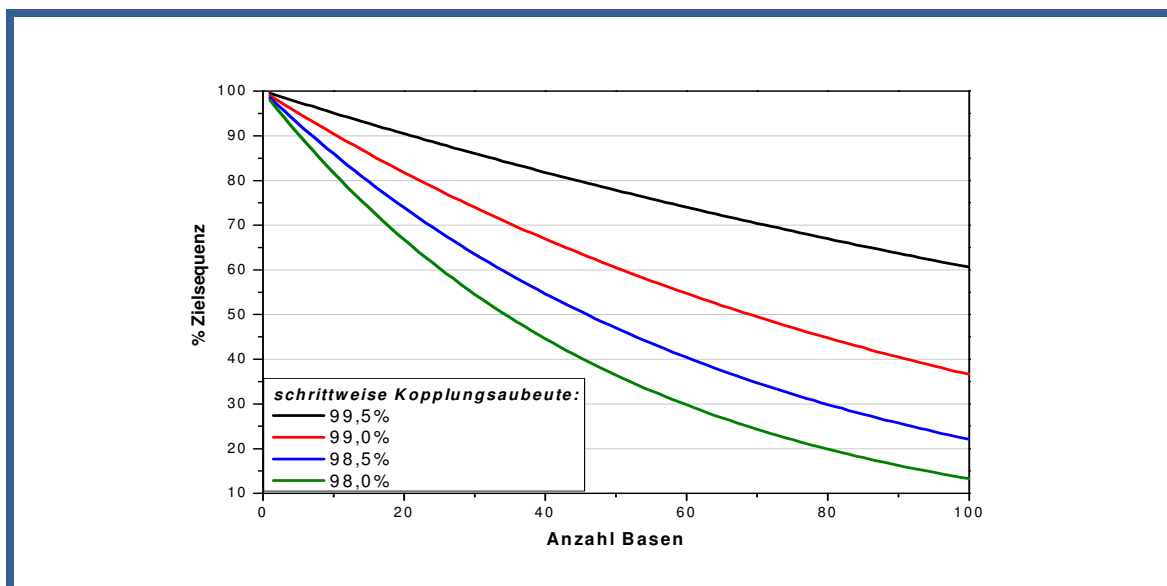


Abb. 3.8: Zusammenhang zwischen schrittweiser Kopplungsausbeute, Länge des Oligonukleotids und der Gesamtausbeute an Zielsequenz. Selbst bei einer sehr guten Kopplungsausbeute von jeweils 99 % enthält ein Oligonukleotid von 70 Basen nur noch $0,99^{70} = 49$ % der erwünschten Zielsequenz.

Die bei der Behandlung mit konzentrierter Ammoniaklösung abgespaltenen Schutzgruppen werden in der Regel in einem Schritt mit den Fehlsequenzen aus dem Rohmaterial abgetrennt. Die standardmäßige Abtrennung erfolgt durch die „Trityl-On-HPLC-Reinigung“. Dabei wird die terminale, stark hydrophobe Dimethoxytrityl-Schutzgruppe am 5'-Ende des Oligos zunächst belassen. Sie dient als Unterscheidungskriterium zwischen den Fehlsequenzen und der eigentlichen Zielsequenz. Die so verstärkte Hydrophobie der Zielsequenzen ermöglicht eine Abtrennung der Fehlsequenzen über Reversed-Phase-HPLC. Dabei wird der größte Teil der Fehlsequenzen abgetrennt. Eine quantitative Abtrennung der Fehlsequenzen für anspruchsvollere Anwendungen ist nur über gelelektrophoretische Methoden möglich. Neben der vollständigen Kontrolle über die Basenabfolge bietet die chemische Synthese den Vorteil, dass eine ganze Reihe von terminalen oder auch internen Modifikationen, wie z.B. verschiedene funktionelle Gruppen, Verzweigungspunkte, unterschiedliche Spacermoleküle oder Farbstoffe im Verlauf des Synthesesyklus in die Sequenzen integriert werden können.

3.5 Sequenzdesign

Das Sequenzdesign ist ein großes Problem beim Aufbau von Strukturen mit DNA. Die Moleküle müssen physikalische, chemische und logische Voraussetzungen erfüllen. Wichtig ist dabei die Kontrolle über die Sekundärstrukturbildung durch das gezielte Design geeigneter Oligonukleotidsequenzen. Wenn innerhalb einer DNA-Struktur an verschiedenen Stellen gleiche oder sehr ähnliche Sequenzabschnitte auftreten, können verschiedene Sekundärstrukturen miteinander in Konkurrenz treten. Die „Symmetrie“ der verwendeten Sequenzen muss also soweit minimiert werden, dass eine möglichst eindeutige Beziehung zwischen der primären Sequenz und der gebildeten Sekundärstruktur gegeben ist. Die eindeutige Beziehung wird dadurch charakterisiert, dass keine stabile Duplexbildung mit anderen Subsequenzen als der komplementären Sequenz erfolgt. Auch stabile Hairpin-Motive müssen vermieden werden, sowie Poly-G-Abschnitte, die zu G-Tetraedern führen können [100-102]. Auch das Auftreten von Polypurin- bzw. Polypyrimidinsegmenten mit mehr als 4-5 Basen, welches zur Krümmung der Helixachse [103] und Bildung von Triplex DNA [104, 105] führt, sollte ausgeschlossen sein. Das Problem bei dem Design von „eindeutigen Sequenzen“ ist die Tatsache, dass lediglich zwei verschiedene Basenpaare, A·T und G·C, in der DNA zur Verfügung stehen. Für einzelne Basen treten daher in größeren DNA-Strukturen immer mehrere komplementäre Partner auf. Aus diesem Grund müssen Sequenzabschnitte von drei, vier, fünf oder sechs Basen als „eindeutige Elemente“ verwendet werden.

Es gibt verschiedene Computeranwendungen die solche Symmetrieminimierungen unterstützen. Bei relativ kurzen linearen Sequenzen ist ein vollautomatisches Sequenzdesign möglich [106]. Die Rechenzeit nimmt allerdings bei diesen Anwendungen exponentiell mit der Sequenzlänge zu. Interaktive Programme erlauben das manuelle Einfügen von Sequenzmotiven, wie z. B. Verzweigungsstellen oder Erkennungssequenzen von Enzymen. Nach dem Design einer Sequenz, die zur Bildung einer erwünschten Struktur führen soll, bietet das verwendete Programm [107] die Möglichkeit, alle enthaltenen Stränge untereinander und mit sich selbst auf Fehlpaarungen zu untersuchen. Dadurch können unerwünschte komplementäre Basenabfolgen zwischen den manuell eingegebenen und den halbautomatisch erzeugten Sequenzen detektiert werden. Ebenso werden palindromische Abschnitte angezeigt. Bei dieser abschließenden Kontrolle kann ein „Schwellenwert“ vorgegeben werden, so dass das Programm nur die komplementären Abschnitte anzeigt, die beispielsweise aus einer Abfolge von mehr als fünf Basen aufgebaut sind. Die Lage der

Fehlpaarungen wird von dem verwendeten Programm jedoch nur in Form einer relativen Verschiebung der beteiligten Stränge angegeben. Für die Lokalisierung der Fehlpaarungen sind daher geeignete Computerprogramme, wie z.B. das Excel Makro „SEQUIN Mismatch Decoder“ zu empfehlen.

3.6 Die Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion ist eine Methode zur in vitro Vervielfältigung von DNA, bei der mit Hilfe der Polymerase ein bestimmter Abschnitt einer DNA exponentiell vervielfältigt wird. Diese Technik kann man zum Nachweis von Infektionserregern (z.B. Bakterien oder Viren), zur Erkennung von Erbkrankheiten aber auch zum Nachweis der Vaterschaft oder Täterschaft ("genetischer Fingerabdruck") verwenden. Anfang der 70er Jahre veröffentlichte K. Kleppe bereits das grundlegende Konzept durch zwei flankierende Primer DNA zu vervielfältigen [108]. Jedoch erst K. Mullis erhielt für die Neuentwicklung des Prinzips zur Vervielfältigung der DNA durch wiederholte Verdopplung den Nobelpreis [109].

Die Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction; PCR) dient der Vervielfältigung der DNA. Sie beruht auf einem immer wiederkehrenden Zyklus aus drei Schritten (Abb. 3.9) und wird im Thermocycler durchgeführt:

1) *Denaturierung:*

Die Reaktionslösung mit der Templat-DNA, der Polymerase, den Primern (kurze Oligonukleotide) und den Nukleotiden wird auf 95 °C erhitzt. Dadurch werden die beiden komplementären DNA-Stränge vollständig denaturiert.

2) *Primer Annealing:*

Durch schnelles Herabsetzen der Temperatur auf 55–65 °C werden die komplementären Primer an die 3'-Enden des zu verlängernden Templat-Strangabschnittes angelagert, bevor die Templat-DNA renaturieren kann. Die 3'-OH-Gruppe dient als Startpunkt für die Polymerase.

3) *Verlängerung:*

Die Temperatur wird nun auf 72 °C erhöht. Das ist die ideale Arbeitstemperatur für typische Polymerasen, um den komplementären Templatstrang aus Desoxynukleotidtriphosphaten aufzubauen. Die Verlängerung erfolgt bis zum 5'-Ende des Templatstranges, falls die Polymerisation nicht zufällig abbricht.

Auf diese Weise werden im ersten Zyklus zwei neue Doppelstrangabschnitte gebildet, wobei die neu gebildeten Stränge ausgehend von der Primersequenz komplementär zum Templatstrang sind. Im nächsten Zyklus lagern sich die gegenläufigen Primer an die Tochterstränge der ersten Generation an. Die Elongation führt zu Tochtersträngen der zweiten Generation, die auf beiden Seiten mit den Sequenzen der Primer enden. Diese entsprechen nun dem gewünschten Abschnitt der Templat-DNA. Ab dem dritten Zyklus wird

der gewünschte Templatabschnitt exponentiell vervielfältigt, während die Amplifikation der Tochterstränge der ersten Generation nur linear verläuft. Nach etwa 30 Zyklen erhält man eine millionenfache Vervielfältigung.

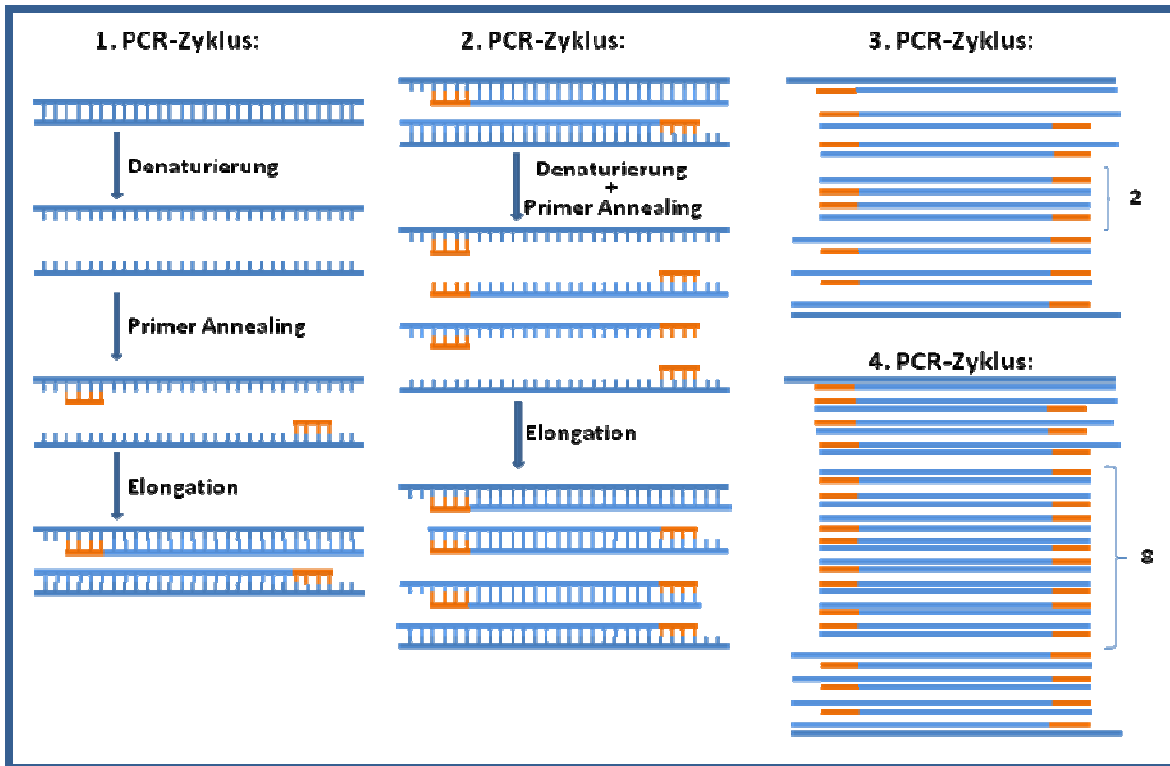


Abb. 3.9: Schematischer Verlauf der Vervielfältigung eines DNA-Abschnittes mit Hilfe der PCR. Die Sequenzen der verwendeten Primer (orange) müssen zu den Randbereichen des zu amplifizierenden Sequenzabschnittes komplementär sein.

Die Anzahl der Zyklen, die mit der PCR durchgeführt werden können, ist jedoch begrenzt. Nach 25-30 Zyklen flacht die exponentielle Amplifikation, abhängig von der verwendeten Startkonzentration der Templat-DNA, immer mehr ab. Dieser Plateau-Effekt ist auf den Verbrauch und Abbau der Reaktionskomponenten zurückzuführen. Nach einer gewissen Anzahl von Zyklen tritt eine Zerstörung der Polymerase auf, die zu veränderten Enzymaktivitäten führt. Dadurch werden vermehrt Nebenprodukte gebildet.

3.6.1 DNA-Polymerasen

DNA-Polymerasen sind Enzyme, die die Synthese von DNA aus Desoxyribonukleotridtriphosphaten an einer DNA-Matrize (Templat-DNA) katalysieren. Dabei sind sie in der Regel auf einen kurzen Doppelstrangabschnitt innerhalb des Templats angewiesen, von dem aus die Polymerase startet. Das 3'-Ende dieses Primers wird dann verlängert, wobei der komplementäre Templatstrang gebildet wird. Chemisch betrachtet findet dabei ein nukleophiler Angriff der endständigen 3'-Hydroxylgruppe des DNA-Stranges auf das α -Phosphat des dNTPs statt, wobei Pyrophosphat freigesetzt wird. Dieser Schritt

wird von der Polymerase katalysiert. K. Mullis verwendete zunächst die Polymerase I von *E. coli*. Dieses Enzym wird jedoch bei hohen Temperaturen vollständig zerstört und musste daher in jedem Zyklus erneut zugegeben werden. Die Entdeckung von hitzestabilen Polymerasen aus thermophilen Organismen vereinfachte die praktische Durchführung der PCR stark. Das klassische Beispiel einer thermophilen Polymerase ist die Polymerase I des Bakteriums *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase). Dieses Bakterium tritt in heißen Quellen auf und enthält daher eine ganze Reihe von thermostabilen Enzymen.

Enzyme in der Art der Polymerase I von *E. coli*, die sowohl eine Polymerase- als auch eine Exonukleaseaktivität besitzen, werden bei der sogenannten „nick translation“ eingesetzt. Die Polymerisation startet an einem Einzelstrangbruch bzw. einer „Einzelstranglücke“. Der bereits bestehende Strang wird während der Polymerisation abgebaut und durch den neu synthetisierten Strang ersetzt. Wenn der für die Exonukleaseaktivität verantwortliche Sequenzabschnitt aus der Polymerase I entfernt wird, erhält man das sogenannte Klenow-Fragment. Dieses Enzym kann genutzt werden um Einzelstranglücken in doppelsträngigen DNA-Fragmenten aufzufüllen. Bereits vorhandene Stränge werden nicht mehr angegriffen. Desweiteren gibt es die Reverse Transkriptase. Diese Polymerase ist in der Lage RNA als Templat für die Synthese von DNA-Sequenzen zu verwenden.

3.6.2 Primer-Design

In den meisten PCR-Anwendungen ist neben der Wahl der geeigneten Polymerase auch die Sequenz und die Qualität der verwendeten Primer ein zentraler Faktor für den Erfolg der Reaktion. Ein häufig auftretendes Problem ist die Bildung von Primer-Dimeren, d.h. die Bildung kleiner Doppelstrangfragmente, deren Länge in etwa der Summe der beiden Primer entspricht. Bei Primerpaaren, die am 3'-Ende komplementäre Abschnitte zeigen, ist dieser Effekt gut zu verstehen. Die Primer-Dimer Bildung tritt jedoch auch bei nicht komplementären Primern auf [110]. Dieses Phänomen kann nur durch alternative Basenpaarungsmuster oder einen Prozess, der mit der Ligation von glatten Enden vergleichbar ist, erklärt werden. Bei der Primerwahl müssen verschiedene Kriterien berücksichtigt werden:

a) Primerlänge und Spezifität:

Die typische Länge für PCR-Primer beträgt 15-30 Basen. Kürzere Primer binden meist sehr effizient, sind aber oftmals nicht spezifisch genug. Sehr lange Primer erhöhen zwar die Spezifität, haben aber eine niedrigere Effizienz beim Annealing und führen zu geringeren

Produktausbeuten. Die Primer-Sequenz sollte einmalig sein, repetitive Sequenzen sollten vermieden werden.

b) Annealingtemperatur:

Die Annealingtemperatur wird anhand der Schmelzpunkte der Primer abgeschätzt. Die Primer sollten eine Schmelztemperatur besitzen, die ein Annealing im Bereich von 55-65 °C erlaubt. Beide Primer sollten im Bereich von ± 5 °C die gleiche Schmelztemperatur haben. Sonst kann eine bevorzugte Hybridisierung im Extremfall zur Anreicherung von einem der beiden Templatstränge führen.

c) Sequenz der Primer:

Die Primersequenzen sollten keine Selbstkomplementaritäten von mehr als drei Basen aufweisen, da es sonst zu Sekundärstrukturen kommen kann, die das Binden an die Zielsequenz verhindern. Ebenso sollten Homologien zwischen den Primern vermieden werden. Besonders das 3'-Ende ist hierbei von großer Bedeutung, da es sonst zu Primer-Dimeren kommen kann, die mit der eigentlichen PCR-Reaktion konkurrieren und diese sogar vollständig unterdrücken können. Die Präsenz eines Guanins oder Cytosins am 3'-Ende der Primer bewirkt eine stabile Hybridisierung am Startpunkt der DNA-Synthese, womit die Effektivität der Primerverlängerung erhöht und das Öffnen des Primer-Templat-Komplexes minimiert wird. Der GC-Gehalt der gesamten Sequenz sollte im Bereich von 50-60 % liegen. Ein zu hoher Gehalt an G und C erhöht die Wahrscheinlichkeit einer unspezifischen Hybridisierung, während ein zu niedriger Anteil eine starke Verringerung des Schmelzpunktes mit sich bringt. Abfolgen von drei oder mehr G oder C in einer Reihe führen außerdem zu einem verstärkten Mispriming.

Das Design von Primersequenzen beruht auf generellen Zusammenhängen, die bei gewöhnlichen PCRs für jedes System zutreffen. Eine Optimierung der Reaktionsbedingungen für ein individuelles Syntheseproblem wird über Variationen im Temperaturprogramm und der Zusammensetzung der Reaktionsmischung erreicht. In Problemfällen gibt es zahlreiche Möglichkeiten die Reaktionsbedingungen zu optimieren. Außerdem stehen neben der Taq-Polymerase eine ganze Reihe von anderen, zum Teil speziell modifizierten Polymerasen mit ganz unterschiedlichen Eigenschaften zur Verfügung und es wurden viele verschiedene Varianten der PCR entwickelt, die für spezielle Anwendungen eingesetzt werden können.

3.7 DNA-Ligasen

Die Entdeckung zirkulärer DNA wies auf die Existenz eines Enzyms hin, das die Enden von DNA-Ketten verknüpfen kann. 1967 entdeckten Wissenschaftler in verschiedenen Laboratorien etwa zur gleichen Zeit die DNA-Ligase [111]. DNA-Ligasen sind Enzyme, die die Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen einer freien 5'-Phosphat-Gruppe und einer freien 3'-Hydroxy-Gruppe zweier doppelsträngiger DNA-Fragmente katalysieren. In der Zelle katalysieren diese Enzyme die Reparatur von Einzelstrangbrüchen. *In vitro* verbinden die DNA-Ligasen offene Enden (sticky ends oder auch blunt ends) von DNA-Fragmenten zur Herstellung von rekombinanter DNA. Die dazu erforderliche Energie liefert NAD^+ (in *E. coli* und anderen Bakterien) oder ATP (in tierischen Zellen und Phagen). Dieser Verknüpfungsprozess ist nicht nur zur Generierung zirkulärer DNA, sondern auch für die normale DNA-Synthese, die Reparatur beschädigter DNA und das Spleißen der DNA bei Rekombinationsvorgängen notwendig. Unbedingt erforderlich für diese Reaktionen ist, dass die DNA in einer Doppelhelix vorliegt; einzelsträngige DNA-Moleküle können von der DNA-Ligase nicht verbunden werden. Die T4-DNA Ligase kann sowohl glatte als auch überhängende Enden verknüpfen. Die *E. coli* DNA-Ligase dient nur zur Ligation von sticky-ends. In der Ligase-Reaktion reagiert ATP oder NADP mit der DNA-Ligase zu einem kovalent gebundenen Enzym-AMP-Komplex (Enzym-Adenylat-Komplex); dabei ist AMP über eine Phosphoamid-Bindung an die ϵ -Amino-Gruppe eines Lysin-Restes des Enzyms gebunden. Bei dieser Reaktion wird Pyrophosphat (oder Nicotinamid-mononucleotid, NMN) freigesetzt. Die aktivere AMP-Einheit wird dann vom Lysin-Rest auf die Phosphat-Gruppe am 5'-Ende der DNA-Kette übertragen. Es bildet sich ein DNA-Adenylat-Komplex. Der letzte Schritt ist ein nukleophiler Angriff der 3'-OH-Gruppe auf dieses aktivierte 5'-Phosphor-Atom. Die beschriebene Reaktionsfolge wird durch die Hydrolyse von Pyrophosphat angetrieben, das bei der Bildung des Enzym-Adenylat-Komplexes freigesetzt wird [112].

3.8 Elektrophorese

Unter Elektrophorese versteht man die Wanderung von geladenen Teilchen in einem flüssigen Medium unter Einfluss eines elektrischen Feldes. Dabei hängt die Wanderungsgeschwindigkeit von der Größe des elektrischen Feldes und von der Ladung, der Form sowie der Umgebung des Teilchens ab.

Der schwedische Wissenschaftler A. Tiselius entwickelte in den 30er Jahren die erste Elektrophorese: ein mit Puffer gefülltes U-Rohr, dessen Schenkel mit einer Gleichstromquelle verbunden waren. Damit gelang es ihm menschliches Serum in vier Hauptkomponenten aufzutrennen [113]. Im Laufe der Zeit wurden verschiedene Variationen der Elektrophorese entwickelt. In ihrer Variationsbreite wurden diese elektrophoretischen Methoden die wichtigsten Werkzeuge in der biochemischen Analytik, da sie sehr gut geeignet sind für die Trennung von Peptiden, Proteinen, Polynukleotiden und anderen biologisch interessanten Makromolekülen.

Die elektrophoretische Mobilität ist eine substanzspezifische Größe, die die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld bestimmt und damit für die Trennung entscheidend ist. Sie ist abhängig von den pK-Werten der geladenen Gruppen und der Molekül, bzw. Partikelgröße. Sie wird beeinflusst von der Art, Konzentration und pH-Wert des Puffers, Temperatur, Feldstärke sowie der Beschaffenheit des Trägermaterials.

Auf ein geladenes Teilchen wirken im elektrischen Feld eine beschleunigende Kraft F_e

$$F_e = q \cdot E \quad (2)$$

auf die Ladung q des Teilchens und eine bremsende Reibungskraft F_R

$$F_R = 6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta \cdot v \quad (3)$$

die für kleine kugelförmige Teilchen mit dem Stokes-Einstein Gesetz beschrieben werden kann. Das Gleichgewicht dieser beiden Kräfte bewirkt, dass sich die Teilchen mit konstanter Geschwindigkeit v im elektrischen Feld bewegen.

E: Feldstärke

z: Ladung

e: Elementarladung

η : Reibungskoeffizient

r: Stokes-Radius

μ : elektrophoretische Mobilität

$$v = \frac{z \cdot e \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta} = \mu \cdot E \quad (4)$$

In unendlicher verdünnter Lösung müssen noch die Retardation und die Relaxationskraft (Debye-Hückel-Theorie) berücksichtigt werden, welche eine Verlangsamung des geladenen Teilchens mit zunehmender Ionenstärke bewirken. Für schwache Säuren und Basen ist die

effektive Mobilität entscheidend, die über den Dissoziationsgrad mit der Ionenmobilität verknüpft ist. Demnach ist hier die Wanderungsgeschwindigkeit und somit die Auflösung direkt über den pH-Wert des Elektrolyten optimierbar. Für die praktische Durchführung bedeutet dies, dass man aufgrund der stattfindenden Elektrolyse im Puffer ausreichend große Pufferreservoirs braucht, damit sich dieser nicht erschöpft. Ein weiterer Punkt ist die durch den elektrischen Stromfluss entstehende Joulesche Wärme während der Elektrophorese, die die Äquivalenzleitfähigkeit beeinflusst. Die effiziente Wärmeabfuhr durch Flüssigkeitskühlung ist eine weitere Voraussetzung, um maximale Trennschärfe zu erhalten.

Elektrophoretische Trennungen werden in freier Lösung (Kapillarelektrophorese) oder in stabilisierenden Medien, wie Dünnschichtplatten, Folien oder Gelen durchgeführt. Es gibt grundsätzlich drei verschiedene Arten von elektrophoretischen Trennungen: Elektrophorese (homogenes Puffersystem, gleicher pH-Wert), Isotachophorese (diskontinuierliches Puffersystem) und die Isoelektrische Fokussierung (pH-Gradient).

3.8.1 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese zählt zu den effektivsten und einfachsten Trennmethode für Makromoleküle. Die gebräuchlichsten Gele bestehen aus Polyacrylamid oder Agarose mit definierter Porengröße. Je nach Trennbereich sind auch Kombigele aus beiden Stoffen oder Gradientengele möglich. Die Trennung erfolgt sowohl nach Molekülgröße als auch nach elektrophoretischer Beweglichkeit. Die Gelmatrix bewirkt einen Siebeffekt, der die Wanderung großer Moleküle stärker behindert als die der kleinen Moleküle. Der Auflösungsbereich wird durch die jeweilige Porengröße des verwendeten Gels eingestellt.

Bei Agarosegelen wird die Porengröße durch die Konzentration der Agarose bestimmt. Die Porengröße sinkt mit steigender Agarosekonzentration (150 nm bei 1 %, 500 nm bei 0,16 %). Sie eignen sich besonders für hochmolekulare Moleküle. Die Agarose wird durch Erhitzen in Wasser gelöst. Beim Abkühlen geliert die Agarose. Dabei bilden sich Polysaccharid Doppelhelizes aus, die sich zu relativ dicken Fäden zusammenlagern.

Polyacrylamidgele werden durch Copolymerisation von Acrylamid mit dem Vernetzer N, N'-Methylenbisacrylamid hergestellt. Die Porengröße wird durch die Totalacrylamidkonzentration T und den Vernetzungsgrad C definiert:

$$T = \frac{m(\text{Acrylamid}) + m(\text{Bisacrylamid})}{V} \quad (5)$$

$$C = \frac{m(\text{Bisacrylamid})}{m(\text{Acrylamid}) + m(\text{Bisacrylamid})} \quad (6)$$

Bei konstantem Vernetzungsgrad C wird mit steigender Totalacrylamidkonzentration T die Porengröße kleiner. Bei konstantem T folgt die Porengröße einer parabolischen Funktion: bei hohen und niedrigen Vernetzungsgraden C erhält man große Poren. Die Polymerisation erfolgt unter Luftausschluss (Radikalfänger). Außerdem ist die Polymerisationskinetik temperaturabhängig. Polyacrylamidgelen eignen sich für Oligomere bis zu 200 bp. Einer der Vorteile von Polyacrylamidgelen ist, dass sich durch geeignete Wahl des Puffers und der Temperatur sowohl native als auch denaturierende Bedingungen schaffen lassen. So führt die Verwendung eines Harnstoffpuffers mit einer Temperatur von 50 °C zu denaturierenden Bedingungen. Dies ist bei Agarosegelen nicht möglich, da der Harnstoff die Ausbildung der Polysaccharid Doppelhelizes verhindert [114, 115].

Elektrophoretische Trennungen werden in vertikalen und horizontalen Elektrophoresekammern durchgeführt.

Zur Anfärbung der Nukleinsäuren wird im Allgemeinen Ethidiumbromid verwendet. Die einzelnen Ethidiumbromid-Moleküle interkalieren dabei zwischen die Basen der DNA, wodurch sich das Anregungsspektrum von Ethidiumbromid verändert und so die Fluoreszenz der Substanz bei Anregung mit UV-Licht (254 nm) stark erhöht wird. Daher emittieren die Stellen im Gel, an denen sich Nukleinsäuren befinden, stark. Die Lichtintensität ist dabei proportional zu Konzentration und Länge der Nukleinsäuren. Da Ethidiumbromid möglicherweise erbgutverändernd ist, sind mittlerweile viele alternative Farbstoffe entwickelt worden, wie z.B. SYBR Green oder SYBR Gold [116]. Zur Färbung kleiner DNA-Stränge (< 50 bp) und für Einzelstrang DNA gibt es Farbstoffe, bei denen die Anfärbung auf elektrostatischen Wechselwirkungen beruht. In unserem Arbeitskreis hat sich die Verwendung von GelRed™ zum Anfärben von ssDNA bewährt.

3.8.2 Präparative Gelelektrophorese

Neben der analytischen Trennung kann die Gelelektrophorese auch zur präparativen Aufreinigung von DNA eingesetzt werden. Zum einen bietet sich die Möglichkeit die Gelelektrophorese mit Flachgelen durchzuführen. Dabei wird die Gelelektrophorese analog der analytischen Gele durchgeführt. Die maximale Probenmenge beträgt für die PAGE 280 µg pro Gel, bei Agarosegelen 2 µg. Zur Rückgewinnung wird die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA kann dann durch einen Elutionspuffer extrahiert werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Elektroelution. Hierbei werden die ausgeschnittenen Gelstücke in einem Dialyseschlauch mit Puffer versetzt. Durch Anlegen einer Spannung wandert die DNA aus dem Gel und wird an der Dialysemembran adsorbiert. Mittlerweile bieten Firmen, wie z.B. Invitrogen oder Lonza auch Recovery-Systeme. Diese bestehen aus Agarosegelen mit zwei Kämme. Die Probe wird in die Taschen des oberen Kamms geladen und wenn das gewünschte Fragment in den Taschen des unteren Kamms angekommen ist wieder entnommen. Dies ist eine schnelle und einfache Trennmethode, allerdings nur für maximal 5 µg Probe geeignet.

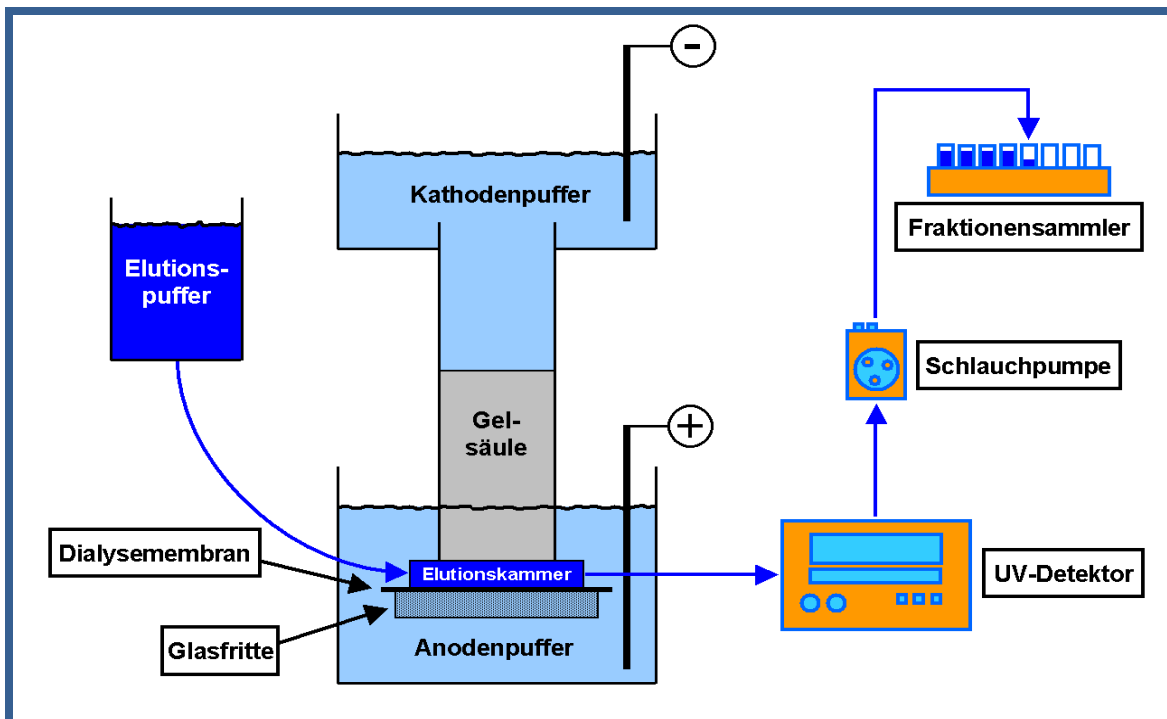


Abb. 3.10: Schematischer Aufbau der Continuous Elution Electrophoresis (CEE).

Für größere Probenmengen eignet sich die Continuous Elution Electrophoresis (CEE) (Abb. 3.10). Dieses System wurde für die präparative Trennung von Proteinen über Acrylamidgele entwickelt [117, 118]. Hier wird die Gellösung in eine Glasröhre gegossen, so dass sich eine Gelsäule bildet, die eine deutlich größere Oberfläche aufweist als die

typischen Flachgele. Durch die angelegte Spannung wandert die DNA durch die Gelsäule und wird am unteren Ende eluiert. Direkt unter der Gelsäule befindet sich die Elutionskammer, die durch eine Dialysemembran und eine Glasfritte vom Anodenraum getrennt ist. Dort bewirkt ein kontinuierlicher orthogonaler Pufferstrom, dass die aufgetrennten Moleküle durch den UV-Detektor zu einem Fraktionensammler transportiert werden.

Diese Methode eignet sich hervorragend zur Abtrennung von Fehlsequenzen im großen Maßstab [48]. Es konnten bisher Mengen von 1,5 mg mit 62 b ssDNA aufgetrennt werden. Dies entspricht der 5,5 fachen Menge eines Flachgels.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurden flexible und semiflexible und kettensteife molekulare Bausteine dargestellt, die durch Selbstorganisation von Oligonukleotiden zu Multiblockcopolymeren verknüpft werden. Die flexiblen Bausteine bestehen aus ABA'-Dreiblockcopolymeren, wobei ein synthetischer Polymerblock (B) mit zwei unterschiedlichen Oligonukleotiden (A, A') verknüpft ist. Semiflexible Einheiten können durch die Erzeugung von dsDNA-Fragmenten mit langen überstehenden Enden (sticky-ends) realisiert werden. Die zur Verknüpfung der Bausteine genutzten Oligonukleotidabschnitte wurden so gewählt, dass ihre Hybridisierung zu einer bei Raumtemperatur stabilen Verknüpfung führen sollte.

In den folgenden Abschnitten werden die Synthesen der biosynthetischen Dreiblockcopolymeren mit monodispersen Oligoethylenoxid bzw. eng verteiltem Polyethylenoxid und Polypropylenoxid beschrieben. Diese wurden dann sowohl zur Darstellung von diskreten nicht periodischen Multiblockcopolymerstrukturen genutzt als auch zur Synthese reversibler Polymere durch Hybridisierung komplementärer Oligonukleotide. Die Integration kettensteifer Blöcke erfolgte durch Hybridisierung teilkomplementärer Oligonukleotidsequenzen mit Dreiblockcopolymeren. Semiflexible Strukturelemente werden mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion erzeugt. Neben den Synthesen wird die Hybridisierungseffizienz auf Grundlage der Bildung linearer Strukturen diskutiert.

4.1 Synthese von DNA-Polymer-Hybriden

Klassisch werden Blockcopolymeren nach drei verschiedenen Strategien hergestellt: durch Blockkopplungen, Blockpolymerisationen und Blockcopolymerisationen [57, 119].

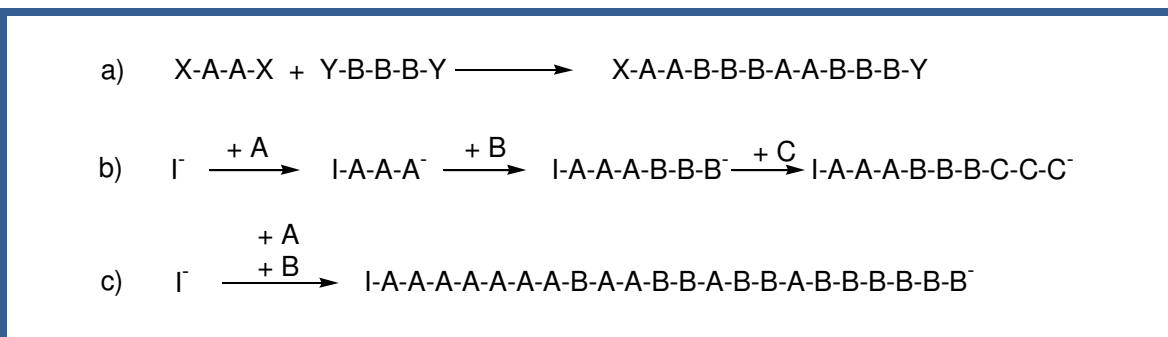


Abb. 4.1: Darstellung von Blockcopolymeren durch a) Blockkopplung, b) Blockpolymerisation, c) Blockbildende Copolymerisation

1) *Blockkopplung*

Bei Blockkopplungen (Abb. 4.1 a) werden die Blöcke separat hergestellt und dann, z.B. durch Kondensations- oder Additionsreaktionen gekoppelt. Da diese Kopplung eine polymeranaloge Reaktion darstellt, sind die Umsätze in der Regel nicht quantitativ und die Abtrennung von nicht gekoppelten Homopolymeren kann problematisch sein. Durch die getrennte Darstellung der einzelnen Blöcke ist eine gute Kontrolle der Blocklängen möglich.

Im Fall von zwei funktionalisierten Enden können Multiblockcopolymeren entstehen. Die Reihenfolge der verschiedenen Polymere ist bei diesem Ansatz frei wählbar.

2) *Blockpolymerisation*

Bei Blockpolymerisationen (Abb. 4.1 b) wird erst nach vollständiger Polymerisation von Monomer A das nächste Monomer B zugegeben und polymerisiert, anschließend Monomer C, usw. Das lebende Kettenende des ersten Blocks startet die Polymerisation des zweiten Monomers. Somit ist die Reihenfolge der Blöcke durch die unterschiedlichen Polaritäten der Kettenenden vorgegeben. Bei diesem Verfahren besteht wegen der drei separaten Wachstumsprozesse eine hohe Wahrscheinlichkeit für unerwünschte Abbruchreaktionen. Die Bildung von Homopolymeren und Zweiblockpolymeren lässt sich deshalb nicht vermeiden.

3) *Blockbildende Copolymerisation*

Bei blockbildenden Copolymerisationen (Abb. 4.1 c) werden beide Monomere gemeinsam zugegeben, aber erst nacheinander polymerisiert. In Abhängigkeit von den Copolymerisationsparametern (r_a ; r_b) werden unterschiedliche Strukturen gebildet. Aus binären Mischungen von Monomeren mit $r_a \ll 1$ und $r_b \gg 1$ erhält man Diblockcopolymeren. Dieses Verfahren reduziert die Gefahr für Kettenabbrüche durch Verunreinigungen, produziert jedoch Gradientencopolymeren. Dies sind keine reinen Blockcopolymeren, sondern ein Ende ist reicher an Monomer A, das andere reicher an Monomer B.

Die blockbildende Copolymerisation ist bei der Erzeugung biosynthetischer Blockcopolymeren nicht anwendbar, da die Synthese definierter Oligonukleotide einen komplexen Zyklus verschiedener Reaktionsschritte erfordert. Auch das Prinzip der Blockpolymerisation ist ungeeignet, da es nur schwer möglich ist, während der Polymerisation des synthetischen Blocks Nebenreaktionen mit den funktionellen Gruppen des DNA-Blocks auszuschließen. Aus diesen Gründen scheint die Blockkopplung für die Verknüpfung von Oligonukleotiden und synthetischen Polymeren zunächst am besten geeignet.

4.1.1 Kopplung von DNA mit synthetischen Polymeren

Zur Darstellung linearer DNA Blockcopolymere nach dem Konzept der Blockkopplung ist die Adressierbarkeit der Kettenenden sowohl des Polymers als auch des Oligonukleotids von entscheidender Bedeutung, da ein Ende des Oligonukleotids mit einer terminalen funktionellen Gruppe des synthetischen Polymers umgesetzt werden soll. Die Kopplung kann in Lösung oder an der Festphase erfolgen.

Um ein synthetisches Polymer mit unterschiedlichen Oligonukleotidsequenzen zu verknüpfen, muss das Polymer zwei chemisch unterschiedliche Enden besitzen. Dies ist durch heterobifunktionelle Polymere oder Schutzgruppenchemie möglich.

Daher ist es nötig, dass die Synthese des Polymers eine Funktionalisierung der beiden Kettenenden erlaubt und dabei eine möglichst enge Molmassenverteilung aufweist. Aufgrund des Löslichkeitsverhaltens von DNA und zur Gewährleistung einer möglichst hohen Flexibilität bei der Wahl der Reaktionsbedingungen ist es günstig ein Polymer zu verwenden, das sowohl in wässrigen als auch in organischen Medien löslich ist [120].

Diese Voraussetzungen werden beispielsweise von Polyethylenoxid (PEO) und Polypropylenoxid (PPO) erfüllt. Beide Polymere können durch ringöffnende anionische Polymerisation von Ethylenoxid bzw. Propylenoxid erzeugt werden. Diese Methode liefert enge Molmassenverteilungen und ermöglicht eine gezielte Funktionalisierung der beiden Kettenenden. Im Bereich relativ kleiner Molmassen sind monodisperse Polyethylenoxide und Polypropylenoxide durch repetitive Kopplung zugänglich [121]. Aufgrund seiner chemischen Struktur ist PEO sowohl in polaren als auch in unpolaren Medien löslich, PPO zeigt in Wasser eine lower critical solution temperature (LCST).

Die Oligonukleotide werden an der Festphase über Standard-Phosphoramiditchemie nach R. Letsinger und M. Caruthers [122, 123] dargestellt. In diesem Zyklus kann auch eine Funktionalisierung am 5'-Ende des Oligonukleotids mit einem N-Hydroxysuccinimidester (NHS-Ester) realisiert werden [124]. Somit bietet sich die Aminogruppe als Funktionalisierung des synthetischen Polymers an, da diese mit dem NHS-Ester gekoppelt werden kann. Die Kopplung muss dann direkt an der zur Synthese der Oligonukleotide eingesetzten Festphase erfolgen, da die Abspaltung der DNA vom Träger mit konzentrierter Ammoniaklösung zur Aminolyse des NHS-Esters führen würde. Dieses Vorgehen bietet den großen Vorteil, dass die synthetische Polymerkomponente im großen Überschuss eingesetzt und durch die Festphasenbindung das überschüssige Material durch einfache Extraktion quantitativ entfernt

werden kann. Typischerweise erfolgt die Kopplungsreaktion in Dichlormethan unter wasserfreien Bedingungen.

Prinzipiell ist die Blockkopplung auch in wässrigem Medium möglich, dabei steht allerdings die Aminolyse des Aktivesters durch die Aminofunktion des Polymers in Konkurrenz zur Hydrolyse, was zu wesentlich schlechteren Ausbeuten führt, aber dennoch möglich ist, da die Aminolyse etwa zehnmal schneller erfolgt, als die Hydrolyse [125].

4.1.2 Synthese von asymmetrischen DNA¹-PEO-DNA²-Dreiblockcopolymeren

Die Synthese von asymmetrischen DNA¹-PEO-DNA² Dreiblockcopolymeren wurde mit monodispersen α -Amino- ω -hydroxy-oligoethylenoxiden mit 12, 16 bzw. 32 Wiederholungseinheiten durchgeführt. Die Oligoethylenoxide $n=16$ und 32 wurden im Rahmen meiner Diplomarbeit [49] durch repetitive Kopplung unter Verwendung orthogonaler Schutzgruppen mit anschließender Endgruppenfunktionalisierung dargestellt. Das entsprechende 12mer ist kommerziell erhältlich. Die Verwendung einer monodispersen Verbindung sollte einheitliche Multiblockstrukturen liefern und die Interpretation analytischer Methoden vereinfachen.

Der Vorteil bei der Verwendung von α -Amino- ω -hydroxy funktionalisierten Polymeren ist, dass keine Schutzgruppenchemie erforderlich ist, da die Hydroxygruppe nicht über eine ausreichende Nukleophilie verfügt, um mit dem NHS-Ester zu reagieren. Im ersten Schritt wird folglich die Aminogruppe des α -Amino- ω -hydroxy-oligoethylenoxid selektiv mit dem trägergebundenen succinimidylfunktionalisierten Oligonukleotid umgesetzt. Danach steht am Ende des DNA-Polymer-Zweiblocks die freie OH-Gruppe zur Verfügung, welche als Startpunkt für die Festphasensynthese der zweiten Oligonukleotidsequenz dienen kann, da sich der Zweiblock immer noch auf dem Trägermaterial befindet (Abb. 4.2).

Zur Kopplung wurden vier verschiedene Oligonukleotidsequenzen von 23 Basen (M2, M4, M6, M8) auf Trägermaterialien mit unterschiedlicher Porengröße von 500 Å bzw. 2000 Å verwendet. Die Oligonukleotide sind 5'-NHS-funktionalisiert, die genaue Sequenz ist im Anhang C zu finden. Die Kopplungsreaktion findet dann in wasserfreiem Dichlormethan mit 10 % Triethylamin statt. Die Kopplung zeigt eine gute Reproduzierbarkeit mit hohen Ausbeuten. Bis auf drei Proben (M4EG12, M4EG32 und M6EG32) liegt die Ausbeute der Kopplungsreaktion über 90 % (Abb. 4.3). Die schlechtere Ausbeute bei diesen Proben wird

sehr wahrscheinlich durch Verunreinigungen in den Oligonukleotiden verursacht, da die gleichen Polymere mit anderen Sequenzen besser koppeln.

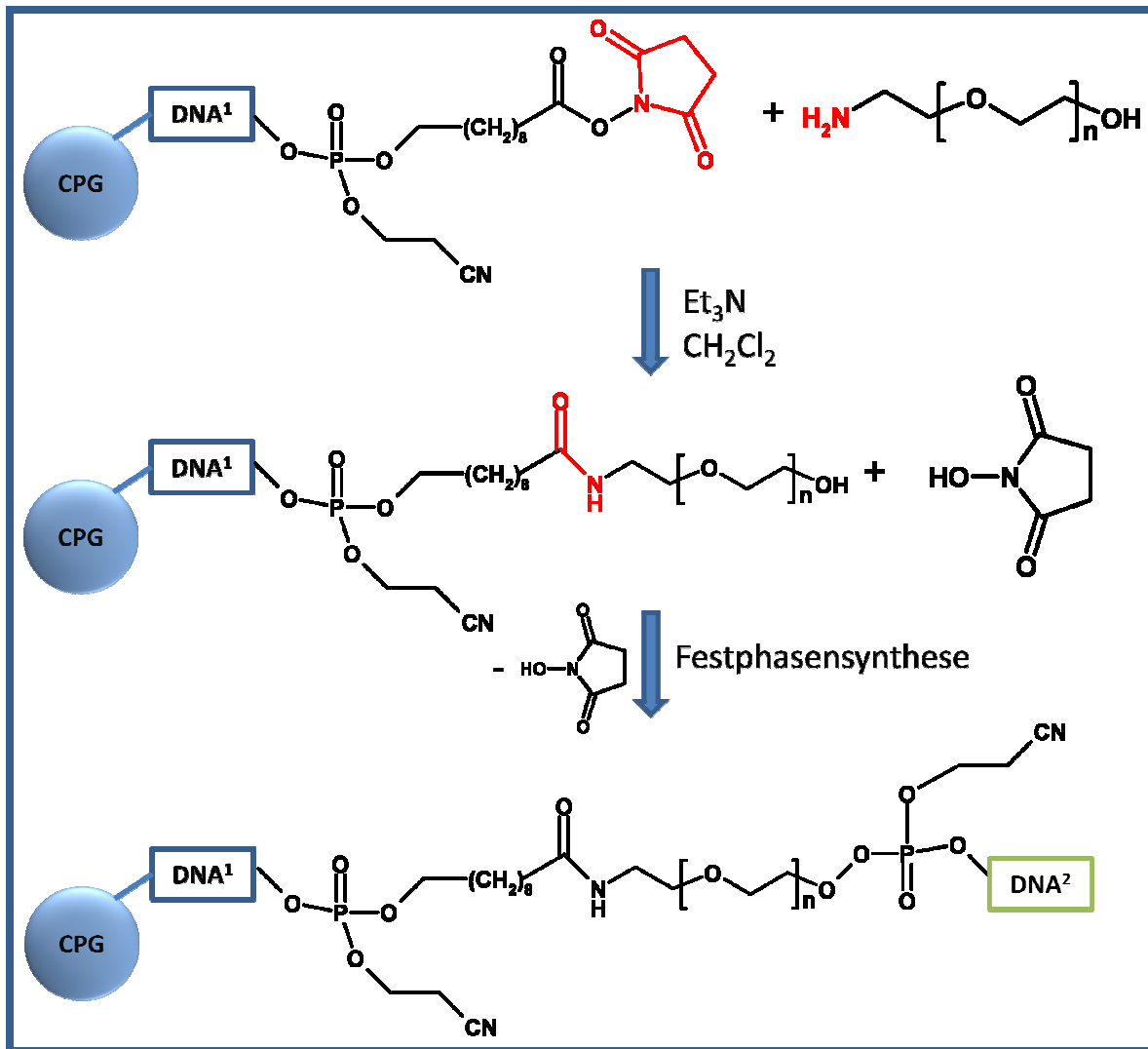


Abb. 4.2: Synthese von asymmetrischen DNA¹-PEO-DNA² Dreiblockcopolymeren durch Kombination von Kopplung der Aminogruppe an das succinimidylfunktionalisierte Oligonukleotid im ersten Schritt und der Festphasensynthese der zweiten Oligonukleotidsequenz als zweiter Schritt.

Das Oligoethylenoxid mit 32 Wiederholungseinheiten ist mit kleineren Homopolymeren ($n = 16$ bzw. 24) verunreinigt, die bei dessen Synthese entstehen und durch Säulenchromatographie nur schwer abzutrennen sind (Anhang F, Abb. 7.1). Aus diesem Grund sind auf dem Gelbild drei schwache Baden zu sehen (Spuren 11 & 12, Abb. 4.3). Allerdings ist bei diesen Proben die Kopplungsausbeute insgesamt schlecht.

Die Porengröße des Trägermaterials zeigt bei den verwendeten Polymeren keinen systematischen Einfluss auf die Kopplungsausbeute.

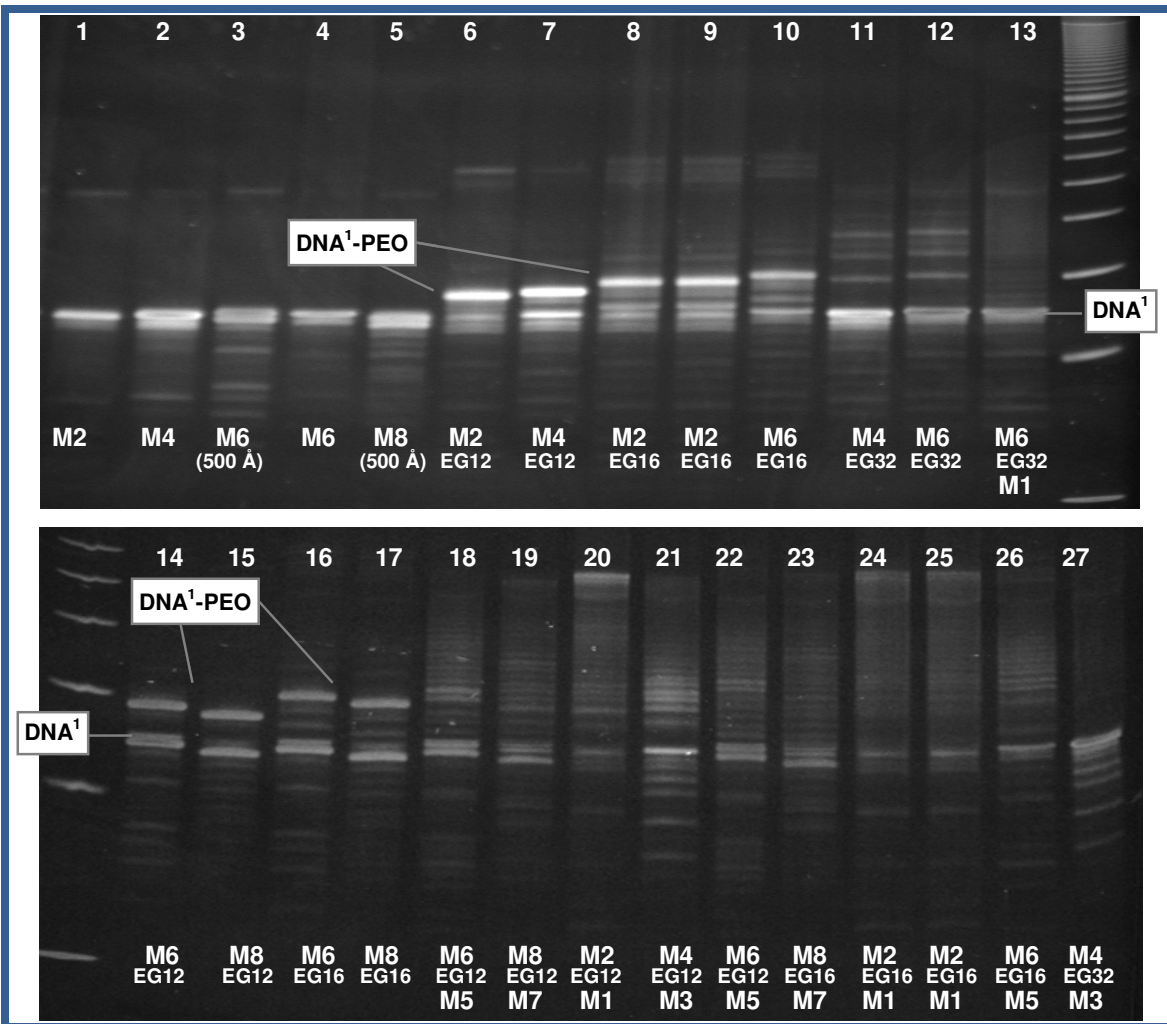


Abb. 4.3: Denaturierende PAGE nach Kopplungsreaktionen an vier verschiedenen Oligonukleotidsequenzen (M2, M4, M6, M8) mit drei verschiedenen α -Amino- ω -hydroxypolyethylenoxiden ($n = 12, 16, 32$) auf Trägermaterialien mit 500 bzw. 2000 Å und nach Synthese der zweiten Oligonukleotidsequenz. Oben rechts und unten links außen ist ein 10 b Marker aufgetragen. Spuren 1-6: Oligonukleotide (M2, M4, M6, M6, M8) mit 23 Basen. Die Proben 3, 5, 14-19 und 22-23 wurden auf Standard CPG (500 Å) synthetisiert. Alle anderen Sequenzen sind an 2000 Å CPG gebunden. Spuren 6-12 und 14-17: Diblockcopolymere (M2-EG12, M4-EG12, M2-EG16, M2-EG16, M6-EG16, M4-EG32, M6-EG32, M6-EG12, M8-EG12, M6-EG16, M8-EG16). Mit der Sequenz M8 ist die Kopplung quantitativ (Spur 15, 17), die untere Bande entspricht der nicht funktionalisierten DNA. Bei M6 und M4 ist die Ausbeute mit beiden Polymeren ein wenig schlechter. Spur 13 u. 18-27: Triblockcopolymere: Bis auf eine Probe zeigen alle Spuren lediglich die Fehlsequenzen der zweiten Oligonukleotidsynthese. Die eigentliche Zielsequenz wird so gut wie gar nicht gebildet.

Die Synthese der zweiten Oligonukleotidsequenz führt jedoch zu schlechteren Ergebnissen. Der gewünschte Dreiblock entsteht kaum, da ungewöhnlich viele Fehlsequenzen gebildet werden. Durch Überprüfung der Tritylwerte konnte schließlich festgestellt werden, dass die Synthese bereits bei der Kopplung der ersten Base erheblich gestört ist.

Die Ursache für die Störung konnte auf die Inkubation der Probe im Lösemittelgemisch der Blockkopplung zurückgeführt werden. Das basische Milieu kann für die Abspaltung der Phosphatschutzgruppe im Rückgrat des Oligonukleotids verantwortlich sein. Das Fehlen dieser Schutzgruppe führt zu erheblichen Störungen in der Synthese der zweiten

Oligonukleotidsequenz, da in diesem Fall weitere OH-Gruppen als Anker für die Kopplung des ersten Nukleotids zur Verfügung stehen. Als basische Komponente, die zur β -Eliminierung der Cyano-ethyl-Schutzgruppe als Acrylonitril führt, kommen sowohl die Aminogruppe des synthetischen Polymers als auch das als Katalysator dienende Triethylamin in Frage. Zur Überprüfung wurde eine Testsequenz mit 23 Basen und einer OH-Gruppe am 5'-Ende synthetisiert. Diese Testsequenz wurde auf dem Trägermaterial belassen und in verschiedenen Lösungen unterschiedlich lange inkubiert. Anschließend wurde das Trägermaterial wieder in den Syntheszyklus eingebracht und ein zweiter Oligonukleotidblock von 23 Basen synthetisiert (Abb. 4.4).

Die Inkubation der Sequenz in einer Lösung aus α -Amino- ω -hydroxypolyethylenoxid in Dichlormethan führte erst nach 2-7 Tagen zu einer Störung im Syntheszyklus. Durch Inkubation in 10 % Triethylamin in Dichlormethan bildeten sich hingegen schon nach 2 Stunden vergleichbar viele Fehlsequenzen. In reinem Dichlormethan konnte keine Störung festgestellt werden.

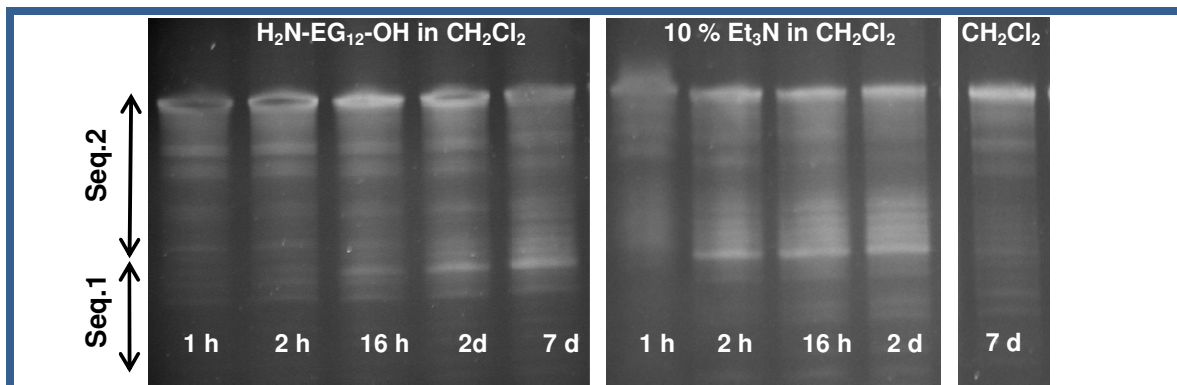


Abb. 4.4: Synthese des zweiten Sequenzabschnittes nach der Inkubation eines 5'-OH-Oligonukleotids in einer Lösung des $\text{H}_2\text{N-EG}_{12}\text{-OH}$ in Dichlormethan (links) bzw. in einer Lösung von 10 % Triethylamin in Dichlormethan (Mitte). Die verschiedenen Inkubationszeiten sind am unteren Ende der jeweiligen Spur angegeben. Die Anwesenheit einer basischen Verbindung führt mit zunehmender Inkubationszeit zu immer stärker ausgeprägten Fehlsequenzen im Bereich kurz oberhalb des ersten Sequenzabschnittes. Zum Vergleich, die Inkubation des 5'-Hydroxy-Oligonukleotids in reinem Dichlormethan (rechts).

Zur Lösung dieses Problems wurde eine Syntheseoptimierung durchgeführt. Eine Verkürzung der Reaktionszeit und die Kopplung des Polymers mit der ersten Oligonukleotidsequenz ohne Zusatz von Triethylamin sollten dazu führen, dass weniger Phosphatschutzgruppen abgespalten werden und somit die Synthese der zweiten Sequenz weniger gestört wird. Zur Überprüfung wurde ein α -Amino- ω -hydroxypolyethylenoxid ($n = 16$) jeweils mit und ohne Triethylamin mit einer Oligonukleotidsequenz umgesetzt. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.5 gezeigt. Nach zwei Stunden Reaktionszeit ist die Kopplung noch nicht vollständig, jedoch sind keine Unterschiede in der Ausbeute zu sehen, ob mit oder ohne Triethylamin.

Nach 17 Stunden erhält man eine quantitative Umsetzung des NHS-funktionalisierten Oligonukleotids in reinem Dichlormethan, wie man am Verschwinden der DNA-NHS-Bande erkennen kann. In Anwesenheit von Triethylamin hat sich die Ausbeute trotz längerer Reaktionszeit nicht verbessert. Die Herabsetzung der Kopplungseffizienz dieser Probe könnte von der Blockierung der primären Aminogruppe des Polymers durch Addition des abgespaltenen Acrylonitrils herrühren.

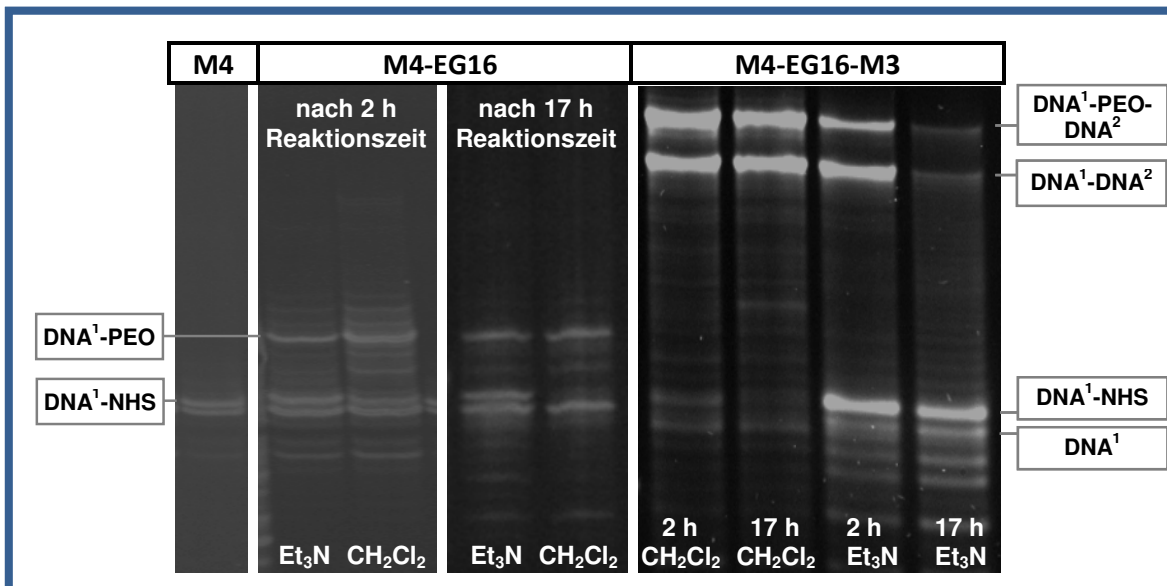


Abb. 4.5: Einfluss von Reaktionszeit und Zugabe von 10 % Triethylamin im ersten Kopplungsschritt auf die Festphasensynthese des zweiten Oligonukleotids. Das Oligonukleotid M4 zeigt die funktionalisierte und nicht funktionalisierte Bande der Sequenz. Nach einer Reaktionszeit von 2 h ist die Umsetzung noch nicht quantitativ unabhängig von der Zugabe von 10 % Triethylamin. Eine Verlängerung der Reaktionszeit auf 17 h zeigt in Anwesenheit von Triethylamin keine weiteren Veränderungen, in Dichlormethan wird das funktionalisierte Oligo vollständig umgesetzt. Die Synthese der zweiten DNA-Sequenz ist nach der Kopplung in reinem Dichlormethan unabhängig von der Reaktionszeit. Bei der Zugabe von Triethylamin in der Kopplungsreaktion und einer Reaktionszeit von 17 h, liefert die Festphasensynthese der zweiten Sequenz nur noch ganz schwache Produktbanden.

Die Ergebnisse der Synthese der zweiten Oligonukleotidsequenz bestätigen diesen Zusammenhang. Die Festphasensynthese ist an beiden Proben in reinem Dichlormethan erfolgreich. In den Ansätzen mit Triethylamin sind deutliche Unterschiede zu sehen: an der Probe, die nur zwei Stunden inkubiert wurde, ist die Synthese des zweiten Oligonukleotids noch möglich, während nach 17 Stunden Reaktionszeit offenbar derart viele Schutzgruppen abgespalten wurden, dass eine weitere Festphasensynthese nicht mehr durchführbar ist. Die Tatsache, dass zwei Banden im Bereich des Dreiblockcopolymer auftreten, wird durch den Anteil an nicht funktionalisierter DNA verursacht. Die nicht funktionalisierte Sequenz (M4) trägt ebenfalls eine 5'-OH-Gruppe und wird somit in der Festphasensynthese verlängert. Die beiden Banden entsprechen also dem erwünschten Dreiblockcopolymer (M4-EG16-M3) und der reinen DNA-Sequenz M4M3. Die Bande auf Höhe der Sequenz M4 bei den Proben mit

Triethylamin kann dem nicht gekoppelten NHS-funktionalisierten Teil der Sequenz zugeordnet werden. Aufgrund der 5'-Funktionalisierung können diese Moleküle in der Festphasensynthese nicht verlängert werden.

Triethylamin wird standardmäßig als Katalysator in Kopplungen von Aminen mit NHS-Estern eingesetzt. In dieser Reaktion kristallisierte sich Triethylamin nicht nur als unnötig, sondern sogar als störend heraus. Da die Abspaltung der Phosphatschutzgruppen durch die Aminogruppe des synthetischen Polymers nur langsam verläuft, konnten die Kopplungsbedingungen insoweit verbessert werden, dass eine nahezu quantitative Umsetzung erfolgt und die zweite Oligonukleotidsynthese an der Festphase zu der gewünschten Dreiblockstruktur führt.

Die gewonnenen Erkenntnisse wurden anschließend auf die Synthese eines Dreiblockcopolymers mit einem anionisch polymerisierten, eng verteiltem α -Amino- ω -hydroxy-polyethylenoxid höherer Molmasse ($M_w = 3400$ g/mol, PD = 1,028) übertragen. Auch hier wird eine annähernd quantitative Umsetzung erreicht (Abb. 4.6). Da das Polymer eine Molmassenverteilung besitzt, ist hier eine verbreiterte Bande des Zweiblocks zu sehen. Die Bande des Dreiblocks ist in einen Bereich des Gels mit geringerer Auflösung verschoben, wodurch eine Fokussierung zustande kommt. Diese ist gerade ausreichend, um die Banden des Zwei- und Dreiblockcopolymeren unterscheiden zu können.

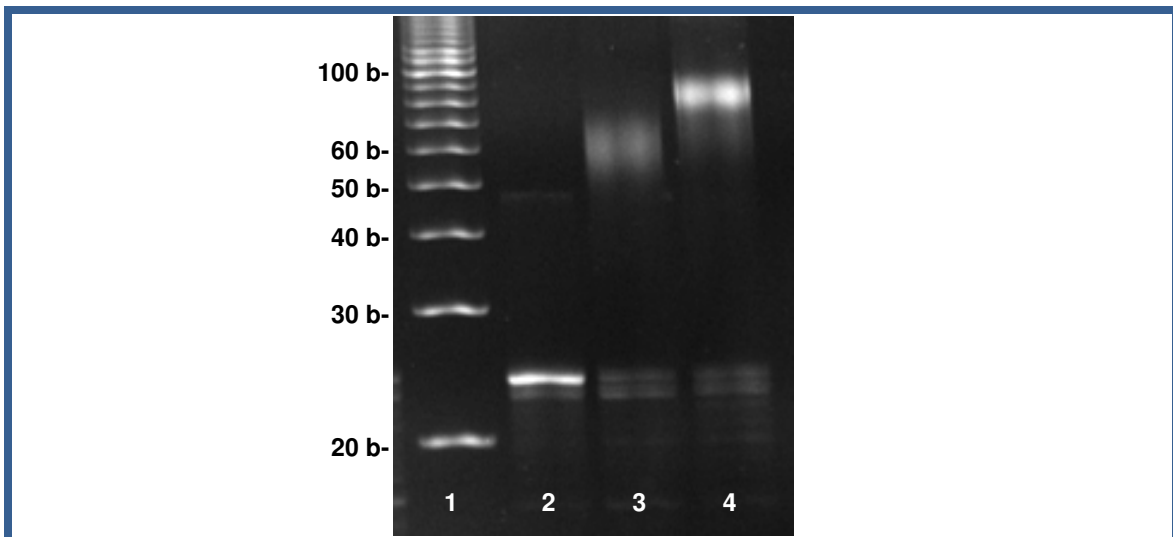


Abb. 4.6: Synthese eines Dreiblockcopolymers mit einem polydispersen α -Amino- ω -hydroxy-polyethylenoxid (Sunbright HO-034PA, NOF Corporation, $M_w = 3400$ g/mol, PD = 1,028). Spur 1: 10 b-Marker, Spur 2: funktionalisiertes Oligo (DNA^1), Spur 3: Diblockcopolymer (DNA^1 -PEO-OH), Spur 4: Dreiblockcopolymer (DNA^1 -PEO- DNA^2).

Für die gezielte Synthese von Dreiblockcopolymeren aus zwei verschiedenen Oligonukleotidsequenzen und einem synthetischem Polymer ist also die Adressierbarkeit der beiden Enden des synthetischen Blocks von Bedeutung. Dies wurde durch die Verwendung von α -Amino- ω -hydroxypolyethylenoxiden erreicht, die monodispers durch repetitive Kopplung hergestellt wurden, bzw. eng verteilt auch kommerziell erhältlich sind. In der ersten Kopplungsreaktion kann die NHS-Esterfunktion des Oligonukleotids selektiv mit der Aminogruppe umgesetzt werden. Das so erhaltene trägergebundene Diblockcopolymer trägt eine endständige OH-Gruppe, die als Startpunkt für die Festphasensynthese der zweiten DNA-Sequenz genutzt werden kann. Mit diesem Syntheseansatz wurde eine quantitative Bildung des Dreiblockcopolymers realisiert. Als Nebenreaktion tritt eine β -Eliminierung an den Phosphatschutzgruppen auf, die durch Triethylamin und bei langen Reaktionszeiten in geringerem Maße auch von der primären Aminogruppe des PEOs katalysiert wird. Die so gebildeten freien Phosphatgruppen stören die Synthese des zweiten Oligonukleotids. Durch die Kopplung des PEOs mit der ersten DNA-Sequenz in reinem Dichlormethan kann diese Nebenreaktion so weit zurückgedrängt werden, dass die Synthese des zweiten Oligonukleotids ebenso gute Ergebnisse liefert wie bei gewöhnlichen DNA-Sequenzen. Der Syntheseweg sollte auch auf andere, nicht wasserlösliche Polymere übertragbar und somit universell einsetzbar sein. Der einzige Nachteil der Festphasensynthese besteht in der Bildung der Fehlsequenzen, deren Anteil von der Länge der Sequenz abhängig ist. Die Kopplungsausbeute der Festphasensynthese ist in jedem Schritt etwa 99 %, d.h. für eine Sequenz mit 23 Basenpaaren erhält man eine Ausbeute von $(0,99)^{23} = 80$ % der Zielsequenz, es sind also sind 20 % Fehlsequenzen auf dem Träger. Zusätzlich schwankt die Ausbeute der Modifizierung zwischen der DNA¹-Sequenz mit dem NHS-Linker, weshalb im ersten Kopplungsschritt zum Zweiblock nicht alle Oligonukleotide NHS-modifiziert sind und somit ein Teil nicht reaktionsfähig ist. Aus diesem Grund muss der Dreiblock nach dem Abspalten vom Träger durch präparative PAGE gereinigt werden. Bei der Aufreinigung der Dreiblockkopolymere kann die CEE, wie bereit in Kapitel 3.8.2 beschrieben, verwendet werden. Mit dieser Reinigungsmethode können bis zu 1,5 mg eines Dreiblockcopolymeren in einem Schritt von den Fehlsequenzen befreit werden, wodurch in kurzer Zeit große Mengen an Dreiblockcopolymeren verfügbar sind.

4.1.3 Synthese von Dreiblockcopolymeren mit Diaminopolypropylenoxid

Der mit Polyethylenoxiden entwickelte Syntheseweg soll nun auch auf andere Polymere übertragen werden. Allerdings sind α -Amino- ω -hydroxy-Polymere kommerziell nur schwer zugänglich, weshalb verschiedene Strategien zur Synthese asymmetrischer Dreiblockcopolymere entwickelt wurden ausgehend von α , ω -Diaminopolypropylenoxid. In dieser Arbeit wurden zwei Jeffamine verwendet mit $M_w = 2000$ g/mol, PD= 1,05 und $M_w = 4000$ g/mol, PD= 1,14 (Abb. 6.2). Analog zur Zweiblocksynthese mit PEG wurden die beiden Diaminopolypropylenoxide mit NHS-funktionalisierten Oligonukleotiden an der Festphase in Dichlormethan umgesetzt. Hier kann ein großer Überschuss der Polymerlösung verwendet werden, der anschließend wieder durch Waschen entfernt wird. Da die Polymere zwei Aminogruppen tragen, entsteht nicht nur der gewünschte Zweiblock, sondern ein Gemisch aus Zweiblocken und symmetrischen Dreiblocken. Um den Anteil an symmetrischen Dreiblocken so gering wie möglich zu halten, wird nicht der Standardträger von 500 Å verwendet, sondern ein Träger mit Porengrößen von 2000 Å, der eine deutlich geringere Beladungsdichte aufweist. Nach dem Waschen des Trägers wird das Gemisch aus Zwei- und Dreiblocken abgespalten (Abb. 4.7). Der gewünschte Zweiblock trägt noch eine freie Aminogruppe, welche wiederum mit einer weiteren succinimidylfunktionalisierten trägergebundenen Oligonukleotidsequenz gekoppelt werden kann, während der symmetrische Dreiblock keine Reaktion eingeht. Der Vorteil von zweimaligem Koppeln besteht darin, dass das Dreiblockcopolymer einfacher von den Fehlsequenzen abgetrennt werden kann. Bei der Festphasensynthese entstehen Fehlsequenzen, die natürlich auch dann entstehen, wenn die Festphasensynthese am Zweiblockcopolymer durchgeführt wird. Zur Kopplung mit dem Zweiblock sind allerdings nur die vollständigen Oligonukleotidsequenzen in der Lage, die die NHS-Funktionalisierung tragen. Die Fehlsequenzen der Synthese des zweiten Blocks sind dann natürlich wesentlich kürzer als das Dreiblockcopolymer und zeigen eine erhebliche höhere elektrophoretische Mobilität, wodurch die Abtrennung erleichtert wird.

Durch das Abspalten und Entschützen der DNA trägt diese nun freie Phosphatgruppen, deshalb ist das Diblockcopolymer nicht mehr in Dichlormethan löslich. Der zweite Kopplungsschritt muss also in wässrigem Milieu stattfinden. Nach der zweiten Kopplung ist das asymmetrische Dreiblockcopolymer auf dem Träger gebunden. Durch einfaches Waschen des Trägers kann das symmetrische Dreiblockcopolymer separiert und evtl. nicht umgesetzter Zweiblock, sowie nicht umgesetztes Oligonukleotid aus der ersten Kopplung entfernt werden.

Durch erneute Behandlung mit Ammoniaklösung wird der asymmetrische Dreiblock abgespalten und in Lösung gebracht.

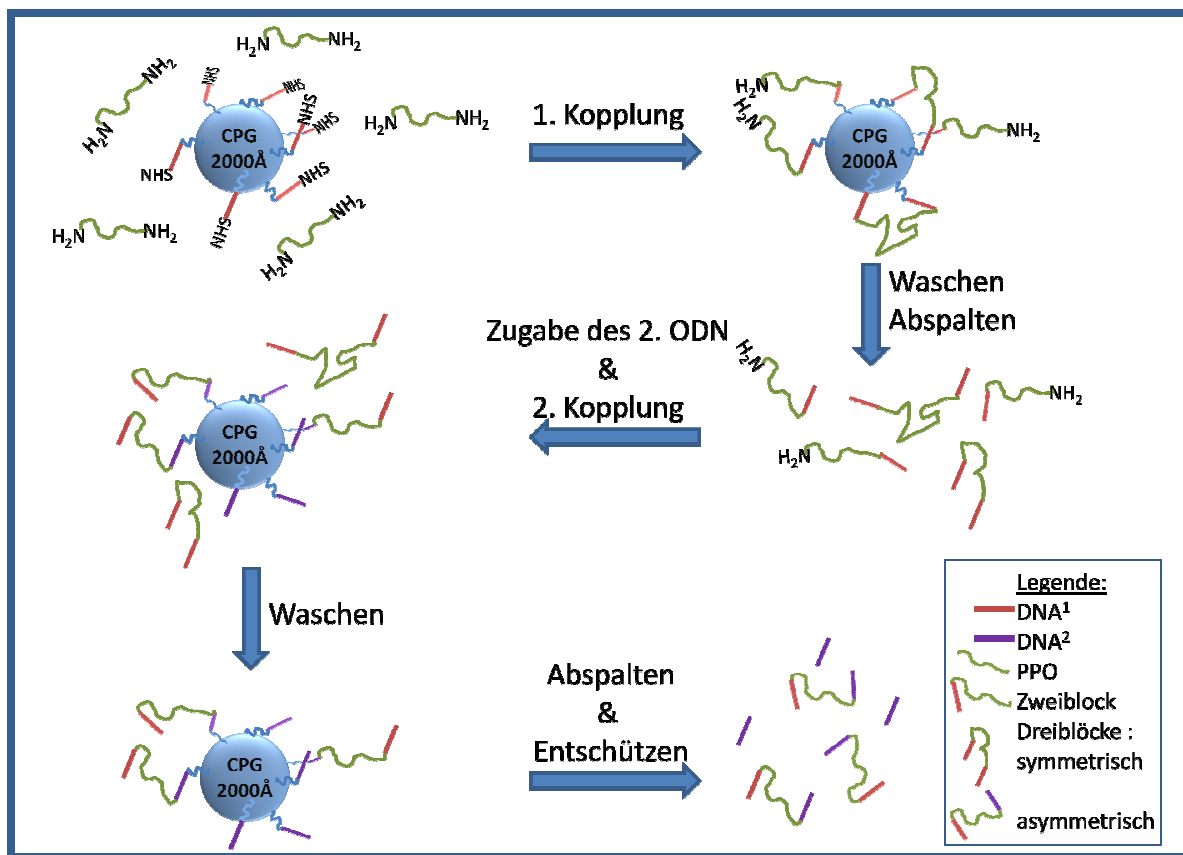


Abb. 4.7: Schematische Darstellung der Synthese asymmetrischer und symmetrischer Dreiblockcopolymerer: das α , ω -Diaminopolypropylenoxid wird an trägergebundene 5'-NHS-funktionalisierte DNA gekoppelt und anschließend vom Träger abgespalten. Durch einen weiteren Kopplungsschritt befindet sich der asymmetrische Dreiblock auf dem Träger, während der symmetrische in Lösung verbleibt und gewaschen werden kann. Durch erneutes Abspalten erhält man das asymmetrische Dreiblockcopolymer.

Im ersten Kopplungsschritt wurden die beiden Diaminopolypropylenoxide ($M_w = 2000$ g/mol; bzw. 4000 g/mol) mit der 23 Basen langen Sequenz M6 umgesetzt. Die Sequenz M6 befindet sich auf einem 2000 Å-Träger. Zusätzlich wurde die Reaktion auf dem Standard 500 Å-Träger mit der Sequenz M8 und dem PPO mit 2000 g/mol getestet. Wie erwartet, entsteht ein Gemisch aus Zwei- und Dreiblocken. Auch hier entsteht eine verbreiterte Bande aufgrund der Molmassenverteilung des Polypropylenoxids. Der Einfluss des Polypropylenoxids auf die elektrophoretische Mobilität des Zweiblocks skaliert etwa linear mit der Molmasse. In Abb. 4.8 ist gut zu erkennen, dass die Bande des Zweiblocks um etwa 15 bzw. 30 Basen gegenüber der Bande der ersten Sequenz verschoben wurde. Dementsprechend ist die Bande des symmetrischen Dreiblocks bei etwa 60 Basen für das PPO mit 2000 g/mol bzw. 80 Basen für das PPO mit 4000 g/mol zu erwarten. Die zusätzliche Bande bei etwa 50 Basen ist ein Gelartefakt. In manchen Fällen treten „Geisterbanden“ bei der doppelten Masse auf, in

diesem Fall handelt es sich um die doppelte Masse des 23 Basen Oligonukleotids. Um den Anteil an Zwei- und Dreiblock zu bestimmen, wurden die Spuren 2 und 5 (M6-PPO2kD und M8-PPO2kD) mit ScionImage ausgewertet und ein Verhältnis Zweiblock zu Dreiblock von etwa 4:1 für den 2000 Å-Träger und 1:1 für den 500 Å-Träger gefunden. Es ist also sinnvoll den Träger mit kleinerer Beladungsdichte und größeren Poren zu verwenden, da damit ein höherer Anteil an Zweiblock entsteht.

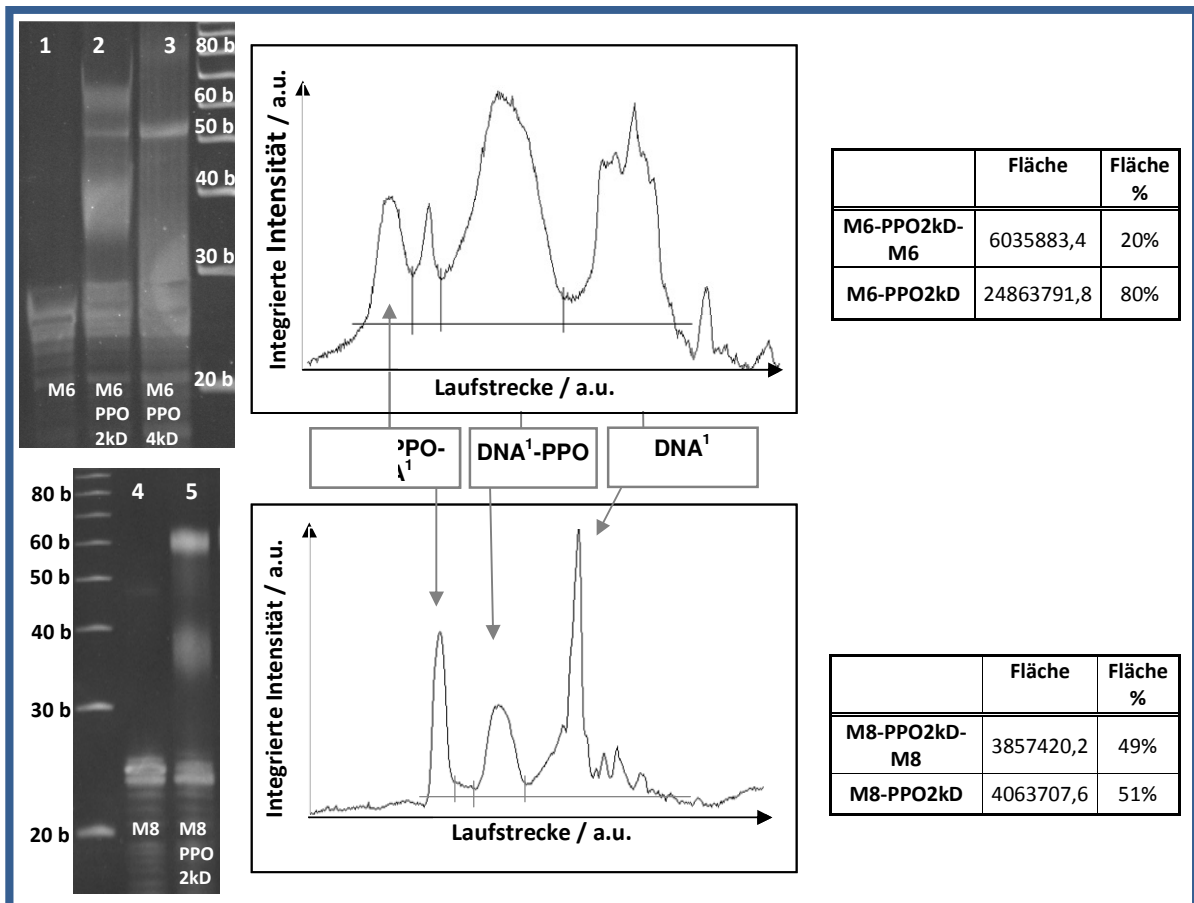


Abb. 4.8: Denat. PAGE der Abspaltungsprodukte nach der 1. Kopplung: Spur 1 & 4: DNA¹-Sequenzen M6 (2000 Å-CPG) und M8 (500 Å-CPG); Spur 2 & 5: Gemisch aus Zweiblock und symmetrischem Dreiblock mit PPO (2000 g/mol), Spur 3: Zwei- & Dreiblockgemisch mit PPO (4000 g/mol). Mitte: Plot der integrierten Intensitäten für Spur 2 (oben) und Spur 5 (unten). Rechts: Verhältnis der integrierten Flächen für Zwei- und Dreiblock in Prozent.

Bei der Probe M6-PPO4kD macht diese Auswertung der Banden keinen Sinn, da direkt über der Bande der Sequenz M6 ein breit verschmierter Bereich zu sehen ist. Durch MALDI-ToF Spektroskopie konnte herausgefunden werden, dass im PPO mit 4000 g/mol ein Anteil an niedermolekularem PPO enthalten ist (Abschnitt 6.3) und daher dieser verschmierte Bereich wahrscheinlich der Zweiblockkomponente zuzuordnen ist.

Die Produkte der Kopplungen M6-PPO2kD und M6-PPO4kD wurden durch Zugabe einer Ammoniaklösung (38 %) vom Träger abgespalten und in eine wässrige Lösung überführt.

Diese Lösungen wurden jeweils zu einer zweiten trägergebundenen NHS-funktionalisierten DNA²-Sequenz gegeben und in einem ca. äquimolaren Ansatz gekoppelt. Hier sollte die freie Aminogruppe des DNA¹-PPO-Zweiblockcopolymers mit dem NHS-Ester der DNA²-Sequenz reagieren können. Anschließend wurde der Träger gewaschen. Im Waschwasser sollten sich nun der symmetrische Dreiblock aus der ersten Kopplungsreaktion und die Fehlsequenzen der DNA¹-Sequenz befinden. Der verbleibende Träger wurde dann wieder mit Ammoniaklösung behandelt zum Abspalten des asymmetrischen Dreiblocks. Das Ergebnis ist in Abb. 4.9 gezeigt.

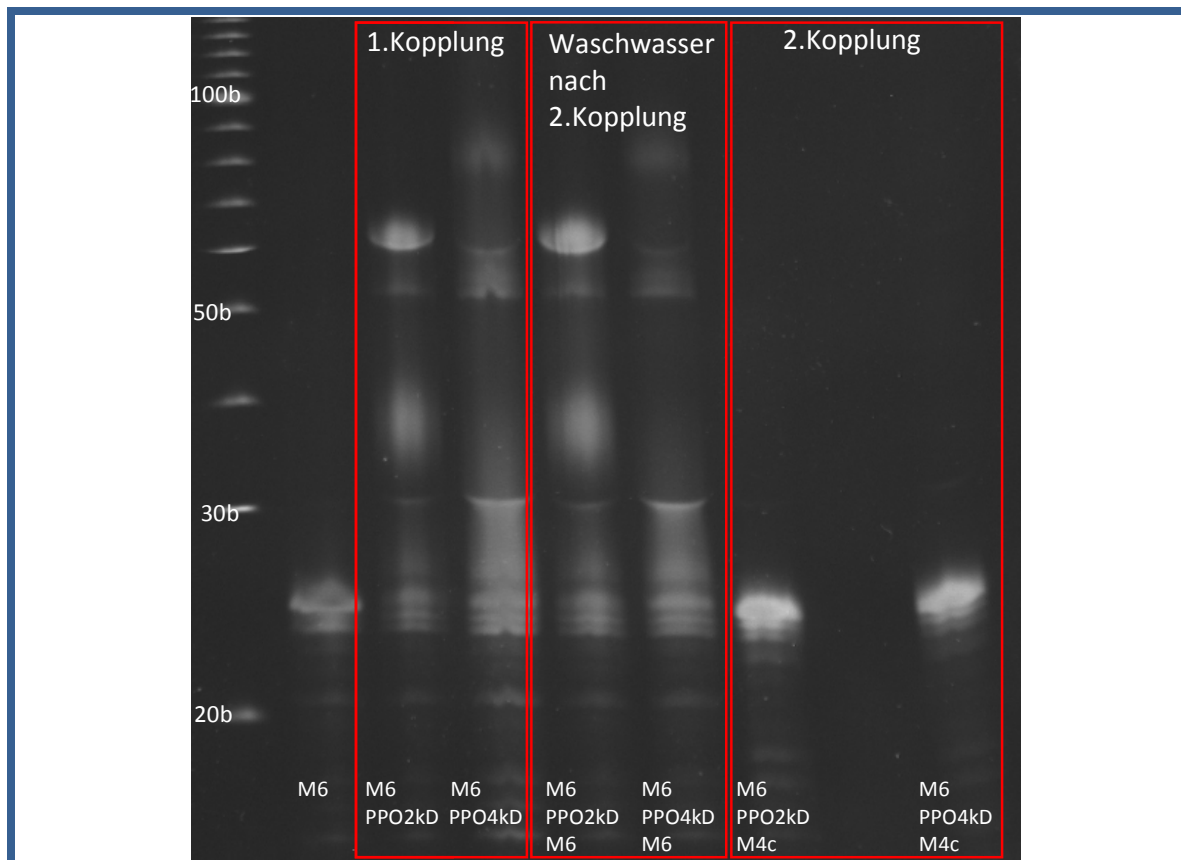


Abb. 4.9: Denat. PAGE der Produkte nach 1. u. 2. Kopplung, sowie des Waschwassers der 2. Kopplung vor dem Abspalten des asymmetrischen Dreiblocks. Nach der ersten Kopplung erhält man ein Gemisch aus Zwei- & symmetrischem Dreiblock. Im Waschwasser sollte nur der symmetrische Dreiblock sein, jedoch hat der Zweiblock nicht mit dem 2. ODN gekoppelt und ist im Waschwasser zu finden. Deshalb ist kein asymmetrischer Dreiblock nach der 2. Kopplung vorhanden.

In der denaturierenden PAGE erkennt man, dass die zweite Kopplung nicht funktioniert hat. Nach der zweiten Kopplung sieht man nur die nicht umgesetzte DNA²-Sequenz. Der Zweiblock ließ sich nicht an die trägergebundene DNA²-Sequenz koppeln und ist im Waschwasser zu finden. Im Waschwasser sollte sich nur noch der symmetrische Dreiblock befinden, doch dort ist der Zweiblock noch mit der gleichen Intensität zu sehen, wie nach der ersten Kopplung. Die Ursache für die schlechte Ausbeute an asymmetrischem Dreiblock liegt sehr wahrscheinlich in der Konzentration der Aminokomponente. Im ersten Kopplungsschritt kann ein großer

Überschuss der Aminokomponente eingesetzt werden. Dort ist die Konzentration des Diaminopropylenoxids 70 mM. Im zweiten Kopplungsschritt stellt das DNA-PPO-Diblockcopolymer die Aminokomponente dar. Da ein gewisses Mindestvolumen benötigt wird, um der Träger vollständig zu benetzen, in diesem Fall wurden 40 µl für 4 mg Träger benötigt, konnte nur eine Konzentration von etwa 57 µM an Zweiblockcopolymer erreicht werden. Ein weiteres Problem bei der Kopplung im wässrigen Medium ist die Konkurrenz zwischen der Hydrolyse des Aktivesters und der Kopplungsreaktion mit der Aminogruppe. Zwar ist die Aminolyse in etwa zehnmal schneller als die Hydrolyse, jedoch ist dadurch eine Erhöhung der Reaktionszeit nicht beliebig möglich.

Eine Alternative ist die direkte Übertragung des unter 4.1.2 beschriebenen Synthesewegs auf Diamine, da auch eine Aminogruppe als Startpunkt für die Oligonukleotidsynthese einsetzbar sein sollte.

In der automatisierte Festphasensynthese von Oligonukleotiden erfolgt die Kopplungsreaktion der nächsten Base durch Aktivierung des 3'-Phosphoramidits mit Tetrazol und der Umsetzung der reaktiven primären OH-Gruppe der trägergebundenen Komponente. Das aktivierte 3'-Phosphoramidit sollte auch in ähnlicher Weise mit Aminogruppen reagieren.

Bei diesem modifizierten Syntheseweg werden die entstandenen Zwei- und Dreiblöcke nach der ersten Kopplung folglich nicht vom Träger abgespalten, sondern zur Synthese des zweiten Oligonukleotids wieder in den Festphasensynthesesyklus eingebracht. Erst nach der Synthese der zweiten Oligonukleotidsequenz an der freien Aminogruppe des Zweiblockcopolymers wird der Dreiblock vom Träger abgespalten. In der Lösung befindet sich nun ein Gemisch aus symmetrischen und asymmetrischen Dreiblocken, die durch denaturierende PAGE nicht unterschieden werden können. Jedoch besitzen die beiden Dreiblockcopolymere unterschiedliche Oligonukleotidsequenzen, wodurch eine Trennung durch Hybridisierung mit den komplementären Strängen und anschließender Gelelektrophorese möglich wird. Gibt man zur Lösung des Gemisches den komplementären Strang der DNA²-Sequenz, so kann nur der asymmetrische Dreiblock hybridisiert werden. Durch die Hybridisierung verändert sich die elektrophoretische Mobilität in der nativen PAGE und somit kann der asymmetrische vom symmetrischen Dreiblock abgetrennt werden (Abb. 4.10). Anschließend wird eine weitere Aufreinigung durch denaturierende PAGE notwendig, um den symmetrischen Dreiblock wieder vom komplementären Strang zu befreien.

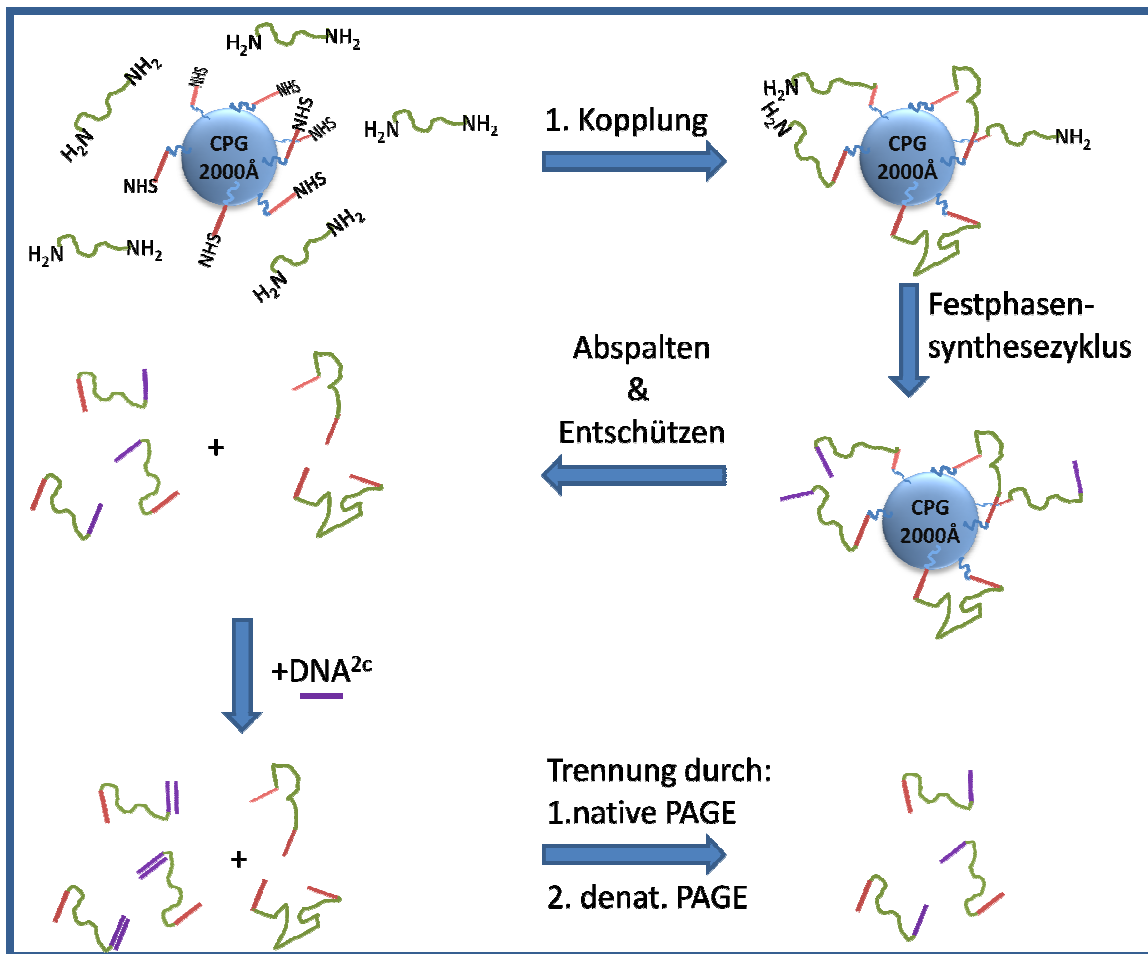


Abb. 4.10: Schematische Darstellung der Synthese asymmetrischer und symmetrischer Dreiblockcopolymere: das α, ω -Diaminopolypropylenoxid wird an trägergebundene 5'-NHS-funktionalisierte DNA gekoppelt und anschließend wieder in den Festphasensynthesezyklus eingebracht. Die Synthese der zweiten ODN-Sequenz erfolgt an der freien Aminogruppe des Zweiblocks. Anschließend wird ein Gemisch aus symmetrischen und asymmetrischen Dreiblocken vom Träger abgespalten. Durch Hybridisierung mit der komplementären DNA-Sequenz (DNA^{2c}) können die Dreiblocke in der präparativen nativen PAGE getrennt werden. Durch eine weitere denat. PAGE sollte dann der asymmetrische Dreiblock isolierbar sein.

Zur Überprüfung, ob die Oligonukleotidsynthese an der freien Aminogruppe erfolgreich verläuft, wurde PPO mit $M_w = 2000$ g/mol an das NHS-funktionalisierte Oligonukleotid M6c auf 2000 Å-CPG gekoppelt und anschließend wieder in den Festphasensynthesezyklus zur Synthese des zweiten Oligonukleotids eingebracht. Das Ergebnis ist in Abb. 4.11 zu sehen. Wie erwartet entsteht bei der ersten Kopplung ein Gemisch aus Zwei- und Dreiblockcopolymeren. Der NHS-funktionalisierte Anteil der DNA wurde dabei annähernd vollständig umgesetzt. Nach der Synthese des zweiten Oligonukleotids tritt eine Bande bei 46 b auf, die wieder dem verlängerten nicht funktionalisierten DNA^1 -Anteil entspricht.

Die Zweiblockbande ist zwar schwächer in der Intensität geworden, jedoch nicht gänzlich verschwunden. Dies bedeutet, dass die Reaktion des aktivierten Phosphoramidits mit der Aminogruppe keine ausreichende Umsetzung liefert. Ein Grund dafür könnte sein, dass bei

der Kopplungsreaktion, das Wachstum des nicht funktionalisierten Oligonukleotids ($\text{DNA}^1\text{-OH}$) in Konkurrenz mit dem aminofunktionalisierten Zweiblock tritt.

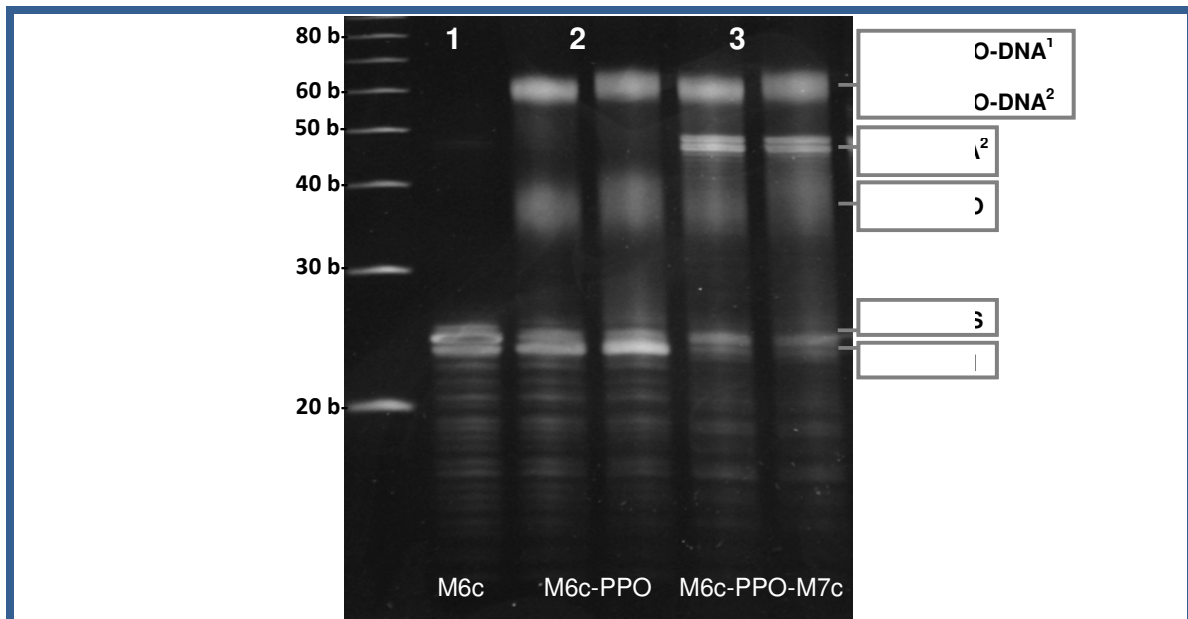


Abb. 4.11: Denat. PAGE der Kopplungsprodukte der DNA^1 -Sequenz mit dem Diaminpropylenoxid und nach anschließender Festphasensynthese der DNA^2 -Sequenz. Die NHS-funktionalisierte DNA^1 wird umgesetzt und ein Gemisch aus Zweiblock und symmetrischem Dreiblock gebildet. Nach der zweiten Festphasensynthese ist der Anteil des Zweiblocks ($\text{DNA}^1\text{-PPO}$) geringer im Vergleich zur Dreiblockbande. Zusätzlich wird die nicht funktionalisierte DNA^1 -Sequenz verlängert.

Die Aminogruppe ist also ein schlechterer Ausgangspunkt für die trägergebundene Oligonukleotidsynthese. Untersuchungen [126, 127] haben gezeigt, dass die Alkoholyse des Phosphoramidits schneller als die Aminolyse verläuft, der Mechanismus ist allerdings noch nicht vollständig geklärt.

Zur genaueren Untersuchung der Proben, wurde der verbliebene Zweiblock vom Dreiblockcopolymergemisch durch präparative denaturierende PAGE separiert und die Fehlsequenzen abgetrennt. Nach der Aufreinigung wurden der Zweiblock und das Dreiblockgemisch in Wasser gelöst und die Konzentration mittels UV-Absorption bei 260 nm bestimmt. Demzufolge ist das Verhältnis von Zweiblock zu Dreiblock nun etwa 1:3 (vorher 1:1). Dies bedeutet, etwa ein Viertel der freien Aminogruppen sind die Reaktion mit dem aktivierten Phosphoramidit eingegangen.

Um den symmetrischen von dem asymmetrischen Dreiblock zu trennen, muss ein komplementärer Strang zugegeben werden. Hier bieten sich zwei Möglichkeiten: Der zur DNA^2 komplementäre Strang kann nur den asymmetrischen Dreiblock hybridisieren, der zur DNA^1 komplementäre Strang hybridisiert beide Dreiblocke, jedoch den symmetrischen gleich

zweimal. In beiden Fällen resultiert eine Verschiebung der elektrophoretischen Mobilitäten, die zur Auftrennung des Dreiblockgemisches ausgenutzt werden können.

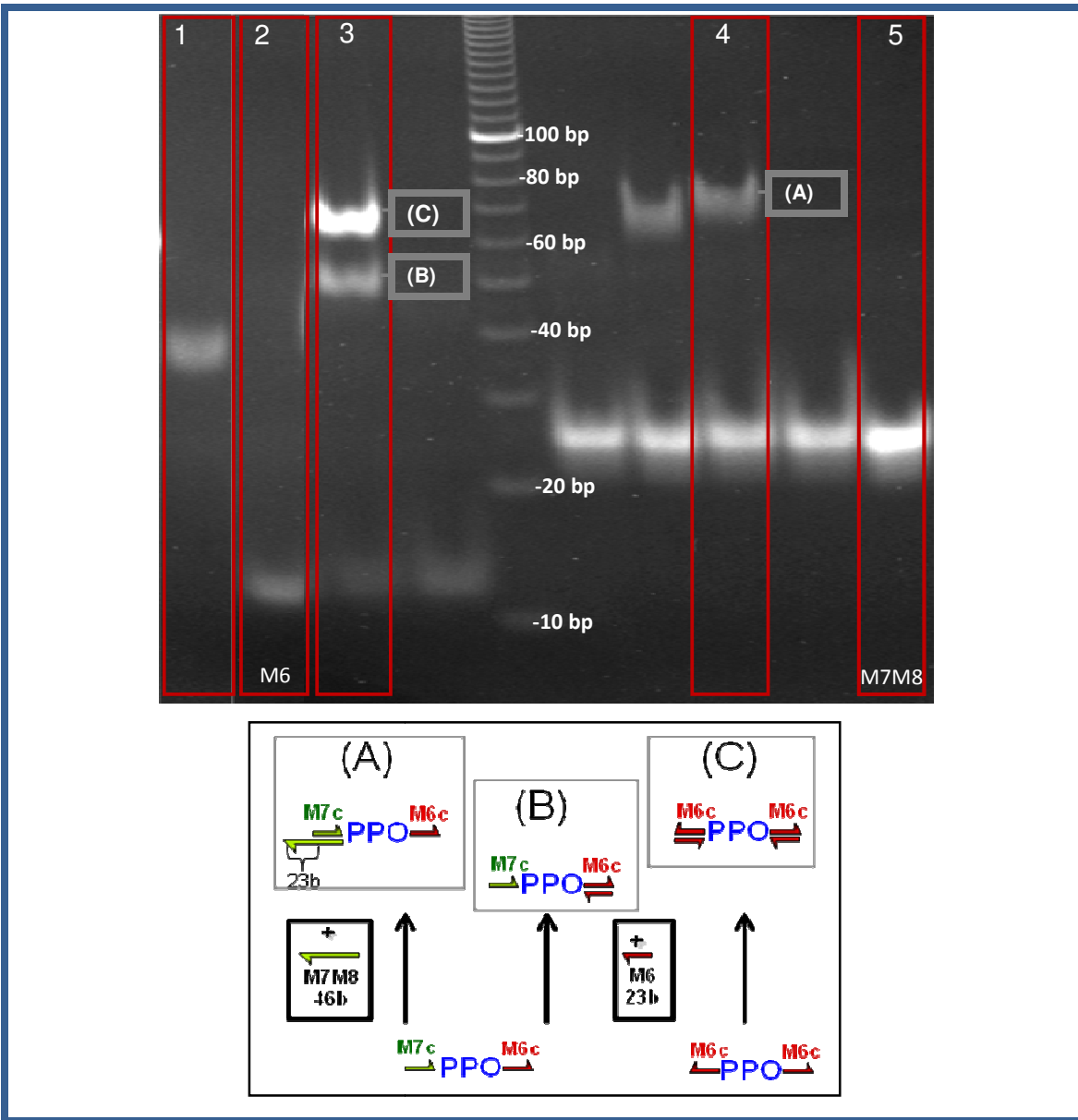


Abb. 4.12: Schematische Darstellung der Hybridisierungsprodukte mit dem jeweils komplementären Strang (unten) und die entsprechende Auftragung einer nativen PAGE (oben). Der komplementäre Strang zu M6c ist M6 (23 Basen, Spur 2). Der symmetrische Dreiblock (M6c-PPO-M6c) kann mit zwei M6-Strängen hybridisieren (C), der asymmetrische Dreiblock (M7c-PPO-M6c) nur einmal (B). Daraus ergeben sich zwei Hybridisierungsprodukte (B, C) mit unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität. Die elektrophoretische Trennung des Gemisches ist in Spur 3 zu sehen. Die Sequenz M7c des asymmetrischen Dreiblocks wurde mit M7M8 (46 Basen, Spur 5) hybridisiert. Hier hat man einen Einzelstrangüberhang von 23 Basen. Die dadurch verminderte elektrophoretische Mobilität, ist in Spur 4 zu erkennen. Der symmetrische Dreiblock kann mit M7M8 nicht hybridisiert werden. Zum Vergleich wurde auf Spur 1 das Dreiblockgemisch aufgetragen.

In Abb. 4.12 ist die Trennung der Dreiblock-Mischung gezeigt. Zu dem Dreiblockgemisch wurde zum einen im Überschuss der Strang M7M8 gegeben, diese Sequenz enthält 46 Basen, dadurch erhält man also einen Einzelstrangüberhang von 23 Basen. M7M8 ist komplementär

zu M7c und hybridisiert nur mit dem asymmetrischen Dreiblock. Der hybridisierte asymmetrische Dreiblock läuft in der nativen PAGE etwa auf der Höhe von 70 bp (Spur 4, (A)), hingegen das Dreiblockgemisch bei etwa 40 bp (Spur 1). Zum anderen wurde der Strang M6 mit 23 Basen zugegeben, welcher komplementär zu M6c ist und somit mit beiden Dreiblocken hybridisiert. Der hybridisierte symmetrische Dreiblock läuft in der nativen PAGE bei etwa 70 bp (Spur 3, (C)), da hier eine Anlagerung von M6 an beide ODN-Blöcke erfolgt. Der asymmetrische ist bei etwa 50 bp (Spur 3, (B)) zu finden. Die Trennung des Dreiblockgemischs ist also auf beiden Wegen erfolgreich. Das Verhältnis von symmetrischem zu asymmetrischem Dreiblock kann in diesem Fall nicht über die Intensität der Banden ermittelt werden, da zum einen die Intensität mit der Menge an DNA steigt und zum anderen Doppelstränge intensiver angefärbt werden als Einzelstränge, da das Ethidiumbromid in den Doppelstrang besser interkaliert. Das bedeutet, die Bande der Struktur C leuchtet intensiver als die der Struktur B, da dort zwei Doppelstränge gebildet wurden, wodurch zum einen die Masse pro Molekül erhöht wird, ebenso wie der Anteil an Doppelstrang doppelt so hoch ist. Dies führt auch dazu, dass in Spur 4 nur der hybridisierte asymmetrische Dreiblock zu erkennen ist. Der symmetrische Dreiblock, der nur aus Einzelstrang DNA besteht wird nicht ausreichend angefärbt.

Der Nachteil dieses Syntheseweges ist auf der einen Seite der hohe Trennaufwand: die Separierung des asymmetrischen Dreiblocks erfordert dreimal die Reinigung durch präparative PAGE (1. Abtrennen der Fehlsequenzen nach der Festphasensynthese, 2. native PAGE nach Hybridisierung, 3. denaturierende PAGE zum Entfernen des komplementären Stranges). Zum anderen ist die Ausbeute geringer im Vergleich zu einer Dreiblocksynthese ausgehend von α -Amino- ω -hydroxy-polymeren, da bei der ersten Kopplung als Nebenprodukt der symmetrische Dreiblock entsteht und bei der Synthese des zweiten ODN-Blocks der Umsatz des Amins mit dem Phosphoramidit bei der Ankopplung der ersten Base geringer ist als bei einer Hydroxygruppe.

Der direkte Einsatz von α,ω -Diaminopolypropylenoxid zur Synthese von asymmetrischen Dreiblockcopolymeren hat sich also als nicht optimal erwiesen. Aus diesem Grund wurde das verwendete PPO modifiziert: Die oben beschriebene Bildung des symmetrischen Dreiblocks kann vollständig unterbunden werden, wenn eine der beiden Aminogruppen des α,ω -Diaminopolypropylenoxid reversibel blockiert wird. Zu diesem Zweck wurde die Trifluoressigsäure (Tfa)-Schutzgruppe eingesetzt.

Die Einführung der Tfa-Schutzgruppe erfolgt in verdünnter methanolischer Lösung unter Verwendung von 1,2 äq. Trifluoressigsäureethylester [128]. Der Nachweis der Tfa-Schutzgruppe erfolgte durch ^{19}F -NMR und IR-Spektroskopie ($\text{C}=\text{O}$ Schwingung, 1720 cm^{-1}) (Anhang F).

Unter den gewählten Reaktionsbedingungen sollte das einseitig Tfa-geschützte Diaminopolypropylenoxid als Hauptprodukt resultieren. Als Nebenprodukte entstehen die doppelt und ungeschützten Diaminopolypropylenoxide. Die Reaktionsgleichung ist in Abb. 4.13 dargestellt. Wichtig ist es das ungeschützte Diamino-PPO vollständig abzutrennen, da dieses in den folgenden Schritten stören würde.

Durch Flash-Säulenchromatographie in Methanol gelang eine saubere Isolierung des einfach Tfa-geschützten Diamino-PPO.

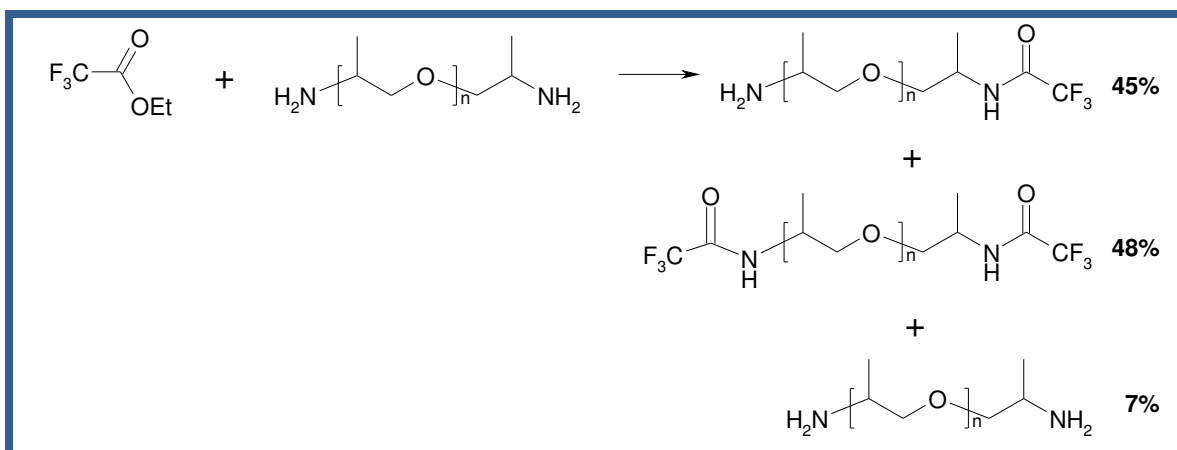


Abb. 4.13: Die Umsetzung von Diaminopolypropylenoxid mit Trifluoressigsäureethylester führt zu einem Gemisch aus doppelt-, einseitig-, und ungeschütztem Diamino-PPO, welches durch Flash-Säulenchromatographie getrennt werden kann.

Das nicht umgesetzte Diaminopolypropylenoxid zeigt eine deutlich stärkere Retardation als die beiden Tfa-geschützten Komponenten. Die Unterscheidung zwischen dem doppelt- und einfach Tfa-geschütztem Diamino-PPO erfolgte durch Umsetzung mit einem Fluoreszenzfarbstoff. Eine Probe der einzelnen Fraktionen der Flash Säulenchromatographie wurde mit einem Überschuss an 9-Fluorenylmethyl-N-succinimidyl-carbonat (Fmoc-ONSu) umgesetzt [129]. Nur das einfach Tfa-geschützte Diamino-PPO kann mit Fmoc-ONSu reagieren und anschließend zur Fluoreszenz gebracht werden (Abb. 4.14)

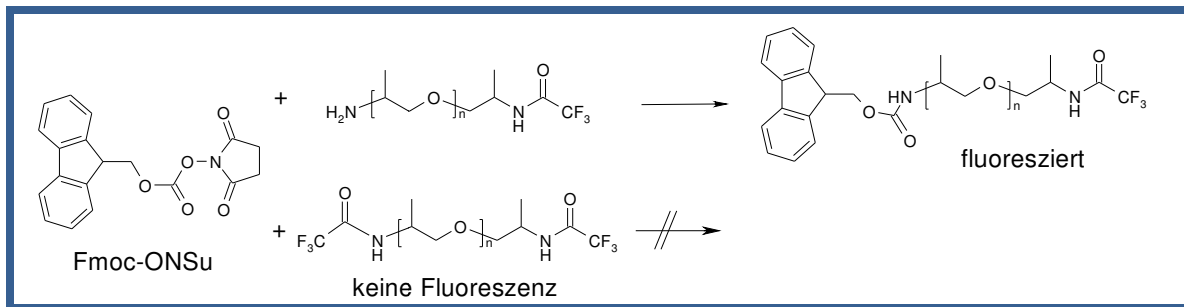


Abb. 4.14: Zum Nachweis des Mono-Tfa-diamino-PPO wurde ein Teil der Fraktionen der Flash Säulenchromatographie mit Fmoc-ONSu umgesetzt. Anschließend erfolgte der Nachweis des Produkts durch Anregung im UV.

Die Reaktionsprodukte wurden anschließend durch Dünnschichtchromatographie in Methanol entwickelt und mit UV-Licht (254 nm) angeregt. Die Identifizierung des ungeschützten Diaminopolypropylenoxids erfolgte durch den Vergleich mit der Eduktbande. Die Unterscheidung von doppelt und einfach geschütztem Produkt gelang anhand der Fluoreszenz. Ein weiterer Nachweis für das Mono-Tfa-geschützte Diamino-PPO erfolgte durch Umsetzung mit NHS-funktionalisierter DNA. Wie in Abb. 4.15 zu erkennen ist, entsteht durch Umsetzung des Mono-Tfa-geschützten Diamino-PPO mit NHS-funktionalisierter DNA nur der Zweiblock.

In Spur 1 ist die NHS-funktionalisierte DNA aufgetragen, daneben in Spur 2 das Abspaltungsprodukt nach der Kopplung. Man erkennt, dass die Umsetzung fast vollständig erfolgt. Der Zweiblock ist bei etwa 37 Basen zu erkennen.

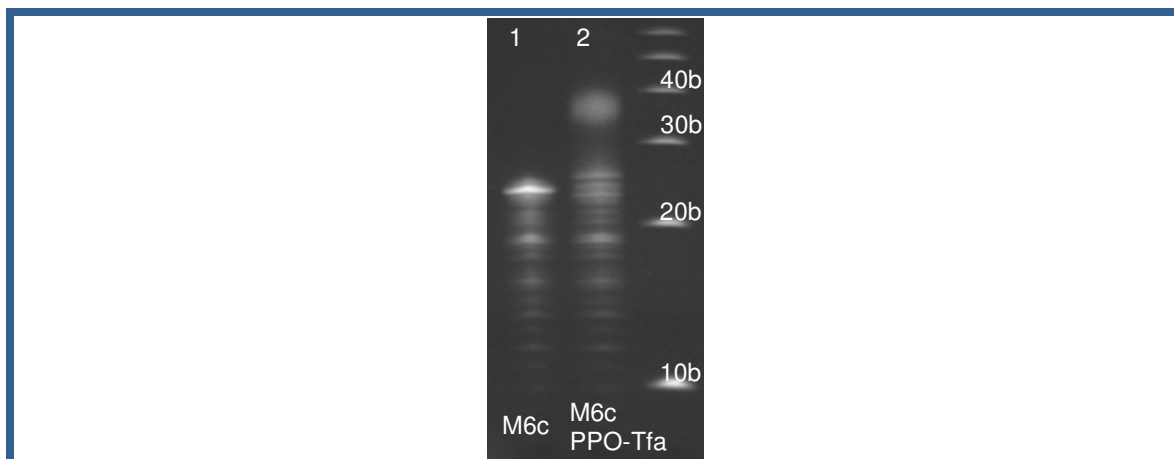


Abb. 4.15: denat. PAGE der Kopplung von Mono-Tfa-diamino-PPO mit NHS-funktionalisierter DNA. Spur 1: M6c: NHS-funktionalisierte DNA; Spur 2: M6c-PPO-Tfa: Kopplungsprodukt nach Abspaltung vom Träger.

Die Tfa-Schutzgruppe ist basenlabil und wird bei der Abspaltung der DNA vom Träger gleichzeitig mit abgespalten. Die Aminofunktion ist also nach der Abspaltung vom Träger wieder freigesetzt. Somit könnte der Zweiblock wieder mit einer NHS-funktionalisierten DNA gekoppelt werden, jedoch wären auch hier eine Kopplung in wässrigem Medium und eine hohe Konzentration an Zweiblock erforderlich.

Deshalb wäre die elegantere Lösung das PPO so zu modifizieren, dass der Zweiblock auf dem Träger verbleibt und eine freie Hydroxygruppe trägt.

Die Idee dabei ist, nicht eine Aminogruppe durch eine Hydroxygruppe zu ersetzen, sondern ein Linker-Molekül zu verwenden. Dieses soll einerseits mit der Aminogruppe des PPO reagieren können und auf der anderen Seite eine Hydroxygruppe tragen, welche dann als Ausgangspunkt für die trägergebundene Oligonukleotidsynthese dienen kann. Als Startpunkt für die Erzeugung des Linkermoleküls wurde die 6-Hydroxycapronsäure gewählt. Allerdings ist die Kopplung mit dem Amin nicht direkt möglich, da die ω -Hydroxyhexansäure unter Einwirkung von DCC zur Ringbildung und Polymerisation neigt. Die Hydroxygruppe muss folglich zuerst geschützt werden. Dann kann die Säuregruppe aktiviert werden, um mit der Aminogruppe des PPO zu reagieren. Als Schutzgruppe wurde die Dimethoxytritylschutzgruppe (Dmt) gewählt. Diese ist eine Schutzgruppe für Hydroxygruppen, die typischerweise in der Nukleinsäurenchemie eingesetzt wird. Die Dmt-Schutzgruppe ist im Gegensatz zur Tfa-Schutzgruppe säurelabil und wird normalerweise mit Trifluoressigsäure abgespalten. Der Reaktionsweg zur Erzeugung des Linker-Moleküls ist in Abb. 4.16 dargestellt.

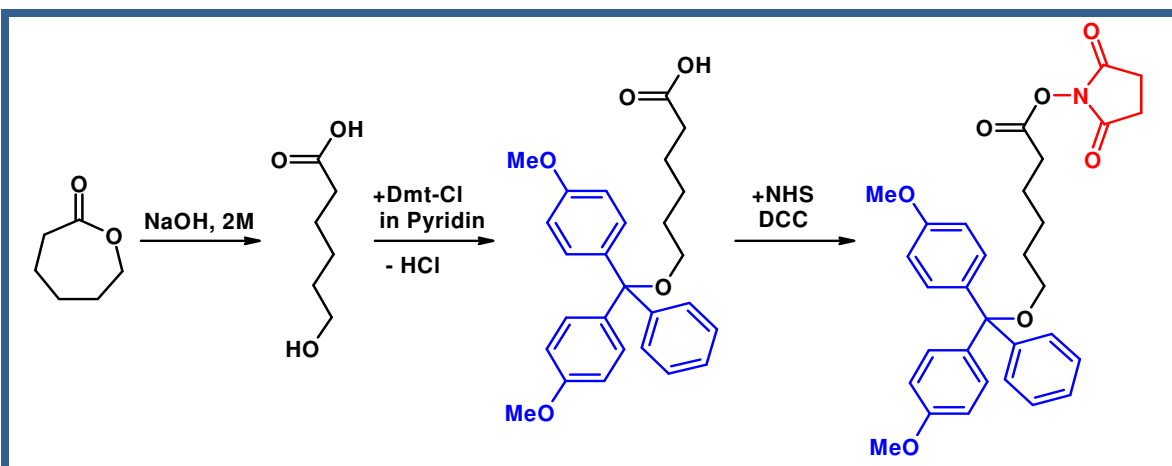


Abb. 4.16: Darstellung von 6-O-Dmt-hexansäure-NHS-Ester ausgehend von ϵ -Caprolacton.

Die Synthese des 6-O-Dmt-capronsäure-NHS-ester beginnt mit der Ringöffnung von ϵ -Caprolacton unter Einwirkung von 2M Natronlauge [102, 130]. Dadurch erhält man die 6-Hydroxycapronsäure. Nach deren Isolierung wird die 6-Hydroxycapronsäure in Pyridin gelöst und mit Dimethoxytritylchlorid versetzt. Das Dimethoxytritylchlorid reagiert selektiv mit der ω -Hydroxygruppe. Die 6-Hydroxycapronsäure ist nun nicht mehr in der Lage einen Ring zu bilden oder zu polymerisieren. Die Aktivierung der Säuregruppe erfolgt anschließend durch die Veresterung mit N-Hydroxysuccinimid unter Einwirkung von DCC. Man erhält den

gewünschten 6-O-Dmt-capronsäure-NHS-ester [131]. Die entsprechenden ESI- und NMR-Spektren sind in Abb. 4.17 zu sehen.

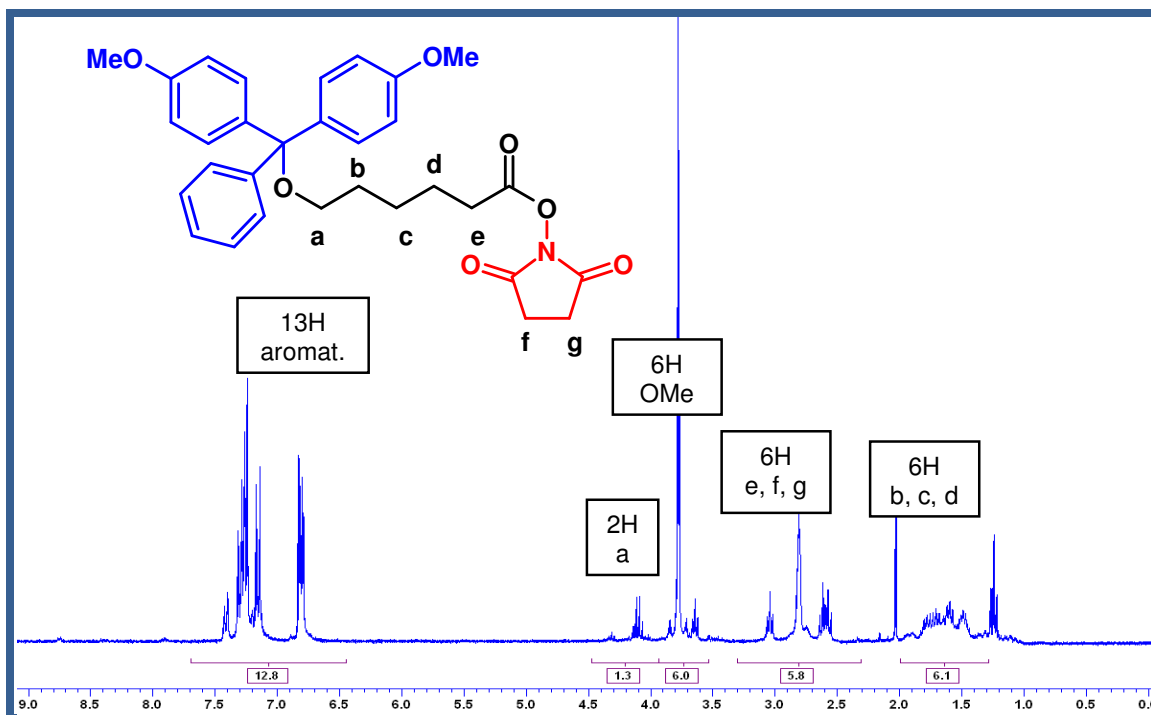
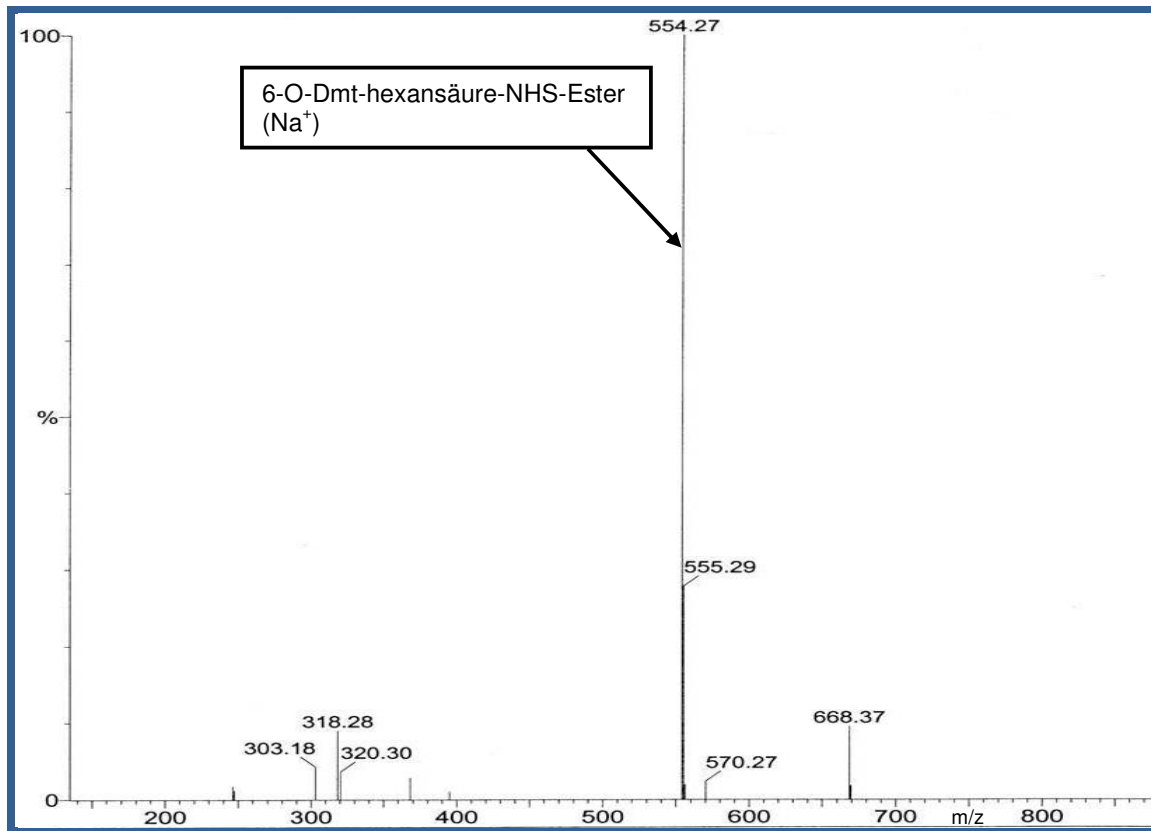


Abb. 4.17: ESI- und ¹H-NMR-Spektrum von 6-O-Dmt-hexansäure-NHS-Ester. Oben: Im ESI-Spektrum findet man den erwarteten Peak bei 554 g/mol. Unten: ¹H-NMR-Spektrum (CDCl₃, 400 MHz).

Dieser Linker kann nun mit dem Mono-Tfa-diamino-PPO durch eine Kopplungsreaktion in Dichlormethan verbunden werden (Abb. 4.18). Anschließend folgt die selektive Abspaltung der Tfa-Schutzgruppe durch Aminolyse unter Erhaltung der Dmt-Schutzgruppe. Die Dimethoxytritylschutzgruppe ist stabil gegenüber Basen und somit resistent gegen die Aminolyse bei der Abspaltung der Tfa-Schutzgruppe. Die so erhaltene freie NH_2 -Gruppe am Polymer ist wieder in der Lage mit einer trägergebundenen NHS-funktionalisierten DNA zu koppeln. Durch die Kopplung erhält man ein trägergebundenes Zweiblockcopolymer, wobei die Hydroxygruppe immer noch durch die Dmt-Gruppe geschützt ist.

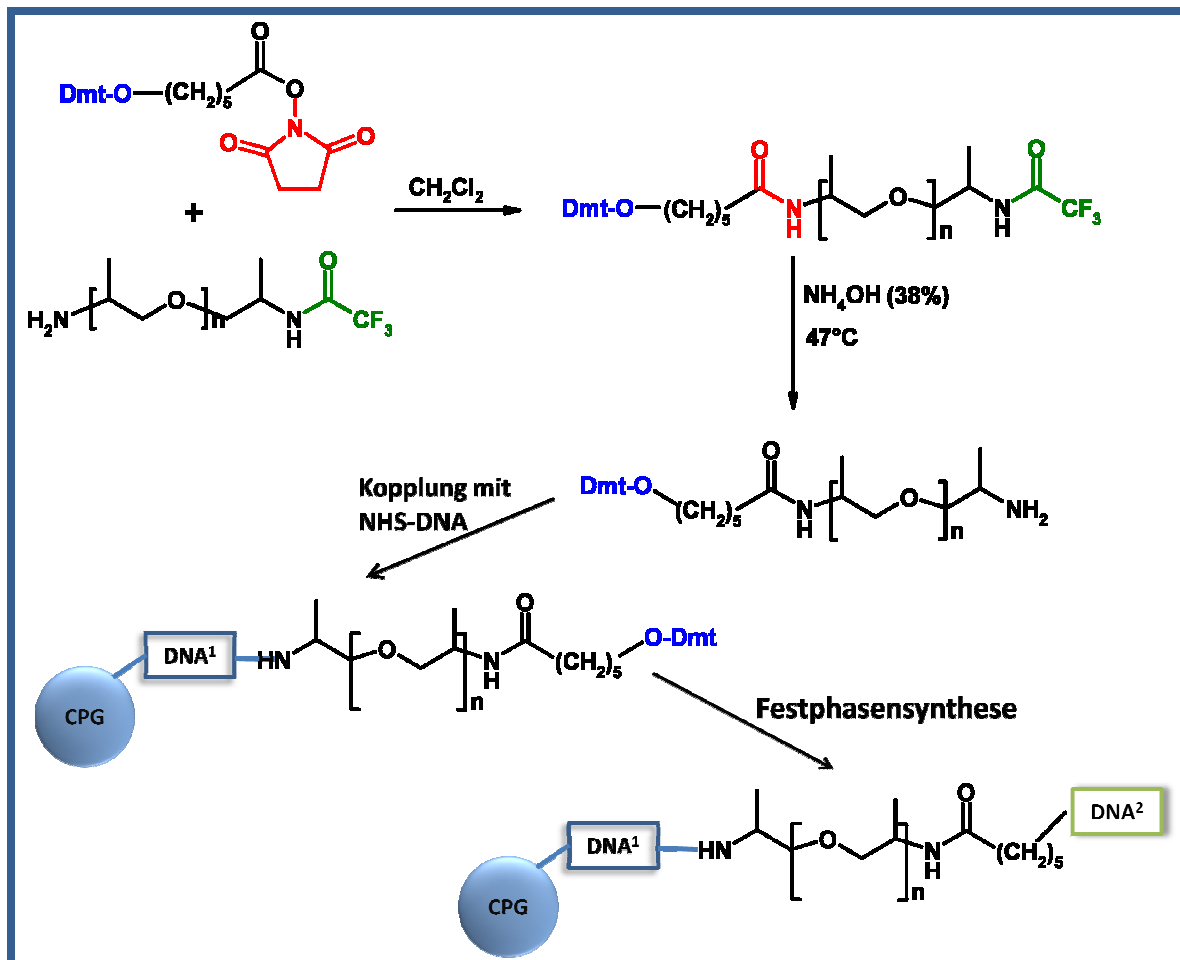


Abb. 4.18: Schematische Darstellung der Synthese des Dreiblockcopolymers mit Polypropylenoxid. Das Mono-Tfa-diamino-PPO wird mit dem 6-O-Dmt-capronsäure-NHS-ester gekoppelt, anschließend folgt die Abspaltung der Tfa-Schutzgruppe. Die freigesetzte Aminogruppe kann nun mit NHS-funktionalisierter trägergebundener DNA reagieren. Das entstandene Zweiblockcopolymer kann direkt in den Festphasensynthesezyklus eingebracht werden, da dort im ersten Schritt die Dmt-Schutzgruppe abgespalten wird. Anschließend folgt der schrittweise Aufbau der zweiten DNA-Sequenz. Durch Abspalten vom Träger erhält man das gewünschte Dreiblockcopolymer.

Hier zeigt sich der Vorteil der Dimethoxytritylschutzgruppe: diese ist nämlich nicht nur basenstabil und somit orthogonal zur Tfa-Schutzgruppe, sie wird auch standardmäßig in der Oligonukleotidsynthese eingesetzt. Dort dient sie als Schutz der 5'-OH-Gruppe der

Desoxyribose und wird im ersten Schritt der Oligonukleotidsynthese mit Dichloressigsäure abgespalten.

Dies bedeutet, dass das Dmt-geschützte Zweiblockcopolymer direkt in die Festphasensynthese eingebracht werden kann zur Synthese des zweiten DNA-Blocks. Nach der Abspaltung vom Träger durch Aminolyse erhält man das gewünschte Dreiblockcopolymer. Die Ergebnisse der Synthese sind in der Abb. 4.19 dargestellt.

Die Umsetzung bei der Kopplungsreaktion ist fast vollständig, auch die Synthese der zweiten DNA-Sequenz war erfolgreich. Das bedeutet, dass die Abspaltung der Dmt-Schutzgruppe im Syntheszyklus vollständig war und die Reaktion zwischen dem aktivierten Phosphoramidit und der Hydroxygruppe stattfindet.

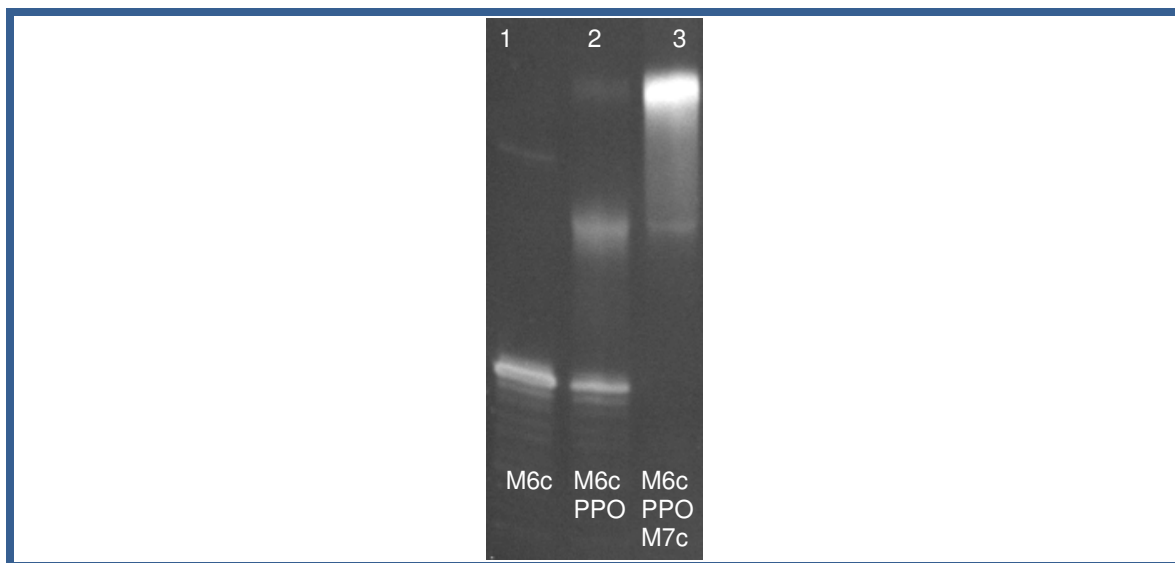


Abb. 4.19: Denat. PAGE der Dreiblocksynthese durch Kopplung zum Zweiblock und anschließender Festphasensynthese zum Dreiblock. Spur 1: die succinimidylfunktionalisierte Sequenz M6c; Spur 2: das Zweiblockcopolymer der Kopplung von M6c mit 6-O-Dmt-capronsäure-PPO-NH₂; Spur 3: Dreiblockcopolymer nach der Synthese der Sequenz M7c.

Durch die Synthese des 6-O-Dmt-capronsäure-NHS-Esters als Linker-Molekül und die Kopplung an das Mono-Tfa-geschützte diamino-polypropylenoxid ist es also auch hier möglich, die Dreiblocksynthese so zu gestalten, dass man Blockkopplung und Festphasensynthese kombiniert.

Durch die Verwendung von α, ω -Diaminopolypropylenoxiden ist die Adressierbarkeit der beiden Polymerenden verloren gegangen. Dieser Verlust sollte durch die Verwendung eines Trägers mit größeren Poren und kleinerer Belegungsdichte bei der Kopplung des Polymers mit der DNA ausgeglichen werden. Trotzdem konnte die Bildung von Zwei- und Dreiblockcopolymer-Gemischen nicht verhindert werden. Die Abtrennung des symmetrischen

Dreiblocks sollte durch eine weitere Kopplung des Zweiblocks mit einer NHS-funktionalisierten DNA-Sequenz auf dem Träger erreicht werden. Die zweite Kopplung war jedoch nicht erfolgreich, da diese nun auf wässrige Medien beschränkt ist und die entsprechenden Konzentrationen für eine Umsetzung mit hoher Ausbeute nur erreicht werden können, wenn das erste Oligonukleotid in extrem hohem Überschuss eingesetzt wird. Aus diesem Grund wurde die Festphasensynthese an der verbleibenden Aminogruppe vorgezogen. Diese ist möglich, liefert allerdings schlechtere Ausbeuten als die Synthese an der Hydroxygruppe. Nach dem Abspalten vom Träger erhält man ein Gemisch aus symmetrischen und asymmetrischen Dreiblocken. Jene konnten durch Zugabe einer komplementären DNA-Sequenz voneinander separiert werden. Jedoch ist der Trennaufwand in diesem Fall erheblich, da drei präparative Gelelektrophoresen durchgeführt werden müssen.

Das einseitige Schützen des Diaminpropylenoxids verhindert die Entstehung eines symmetrischen Dreiblocks während der ersten Blockkopplung. Man erhält eine quantitative Umsetzung zum Zweiblock. Die Tfa-Schutzgruppe kann allerdings nicht abgespalten werden, ohne dass auch die DNA vollständig entschützt und vom Träger abgespalten wird. Dadurch wäre auch in diesem Fall eine Blockkopplung mit der zweiten DNA-Sequenz im wässrigen Medium erforderlich. Das einseitige Schützen des Polymers mit der Tfa-Schutzgruppe ermöglicht allerdings die Kopplung mit dem 6-O-Dmt-hexansäure-NHS-Ester. Dadurch erhält das Polymer wieder zwei chemisch unterschiedliche Enden. Die Adressierbarkeit der Polymerenden ist also wieder hergestellt, womit die Kombination von Blockkopplung und Festphasensynthese erfolgreich angewendet werden kann. Dies bietet zwei Vorteile: Zum einen wird die zweite Blockkopplung im wässrigem Milieu umgangen. Zum anderen wurden die Schwierigkeiten der Phosphoramiditkopplung an der Aminogruppe vermieden. Es wurde also ein Linker gefunden, der ausgehend von Diaminopolymeren Zugang zu Dreiblockcopolymeren bietet.

Mit Hilfe des beschriebenen Linker-Moleküls wurde somit ein universelles Synthesekonzept entwickelt, welches ausgehend von Diaminopolymeren einen sehr effektiven Zugang zu verschiedenen Dreiblockcopolymeren bietet.

4.2 Multiblockcopolymere durch Hybridisierung

Biologischen Bausteinen gelingt es nach dem Prinzip der Selbsterkennung, spezifische Bindungsstellen selbst zu finden, womit in kurzer Zeit komplexe Strukturen aufgebaut werden können. Nach diesem Vorbild soll die Oligonukleotidselfsterkennung zum Aufbau komplexer Multiblockcopolymere genutzt werden. Dabei können komplementäre Oligonukleotidsequenzen als Verbindungsstück zwischen synthetischen Blöcken dienen (Abb. 4.20 a) oder mit überstehenden Enden von DNA-Helices hybridisiert werden, so dass man doppelsträngige DNA-Blöcke als formtreue Komponenten integrieren kann (Abb. 4.20 b).

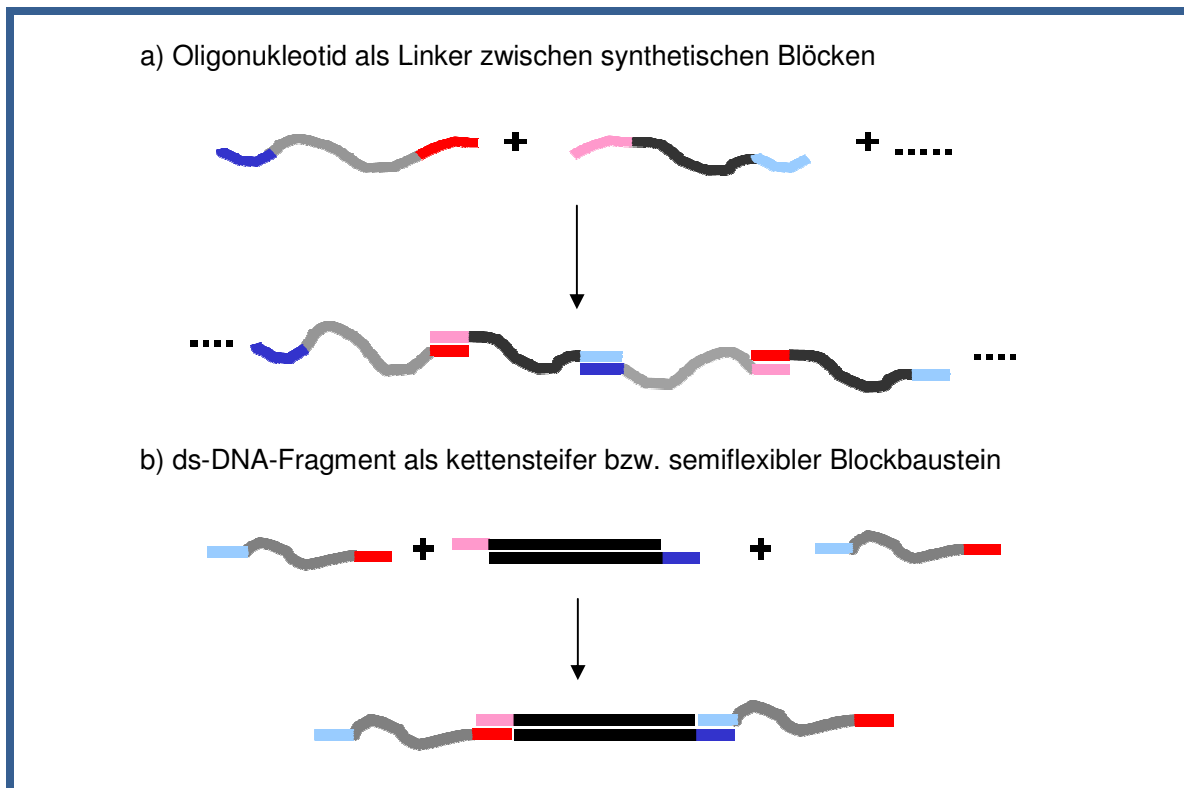


Abb. 4.20: Bildung von Multiblockcopolymeren durch DNA-Hybridisierung. a) Oligonukleotide (blau, rot) als Verbindungsstück zwischen synthetischen Blöcken (grau); b) dsDNA-Fragment (schwarz) als formtreue Komponente im Multiblockcopolymer.

Lineare Hybridmaterialien, bestehend aus DNA, kovalent mit einem organischen Polymer verknüpft, sind von breitem wissenschaftlichem Interesse. Sie finden Anwendung in der Gentherapie, zur DNA-Detektion und zur Aufreinigung von biologischen Materialien [26, 38, 132]. In der Literatur ist nur wenig über den Aufbau komplexer DNA-Multiblockcopolymere aus A-B-A Dreiblockcopolymeren zu finden [42, 44]. Die Bildung diskreter Strukturen war bisher dadurch begrenzt, dass nur symmetrische Dreiblockcopolymere synthetisiert werden konnten, d.h. die DNA-Sequenzen an beiden Seiten des synthetischen Blocks sind identisch

und jeweils über das 5'-Ende mit dem Polymer verknüpft. Folglich konnten diskrete supramolekulare Strukturen nur durch Hybridisierung von einem symmetrischen Dreiblock und zwei Zweiblocken mit komplementärer DNA-Sequenz aufgebaut werden, was maximal zu einem alternierenden Pentablockcopolymer führt [29]. Durch die Hybridisierung zweier Dreiblocke mit komplementären DNA-Sequenzen ist es möglich längere alternierende Polymerstrukturen zu erzeugen, die jedoch wieder einer Verteilung in der Anzahl der Blöcke unterliegen [43]. Durch die in dieser Arbeit vorgestellte Möglichkeit zur Synthese asymmetrischer Dreiblocke (Kapitel 4.1) ist eine eindeutige Adressierbarkeit beider DNA-Blöcke entstanden. Durch Hybridisierung der terminalen DNA-Sequenzen können die einzelnen Polymere miteinander verknüpft werden. Dabei bestehen prinzipiell keine Einschränkungen in Bezug auf Anzahl, Art und Reihenfolge der beteiligten Polymere.

4.2.1 Aufbau linearer Multiblockcopolymerer aus asymmetrischen Dreiblockcopolymeren.

Multiblockcopolymerer sind aufgrund ihrer vielfältigen Strukturbildung in Lösung sowie als Feststoff sehr beliebt. Normalerweise werden diese Blockcopolymerer durch aufwändige lebende Polymerisationstechniken oder durch Blockkopplungen dargestellt. Dabei ist es schwierig die Kontrolle über Molekulargewicht und Polydispersität zu erhalten. Desweiteren sind die Produkte oft mit Homopolymeren verunreinigt. Die Ausnutzung der Selbsterkennung von komplementärer ssDNA zur Bildung von Multiblockcopolymeren bringt mehrere Vorteile mit sich. Die Verunreinigung mit Homopolymeren wird durch die Verwendung gereinigter Einzelstrang-Bausteine verhindert. Die Selbsterkennung erfordert keine inerten bzw. wasserfreien Bedingungen. Die Abfolge der Blöcke kann durch geeignete Wahl der Sequenzen sehr leicht variiert werden. Dies bietet die interessante Möglichkeit, die Strukturbildung als Funktion der Zahl, der chemischen Natur sowie der Reihenfolge der einzelnen Blöcke verfolgen zu können.

Für die Darstellung eines alternierenden Multiblockcopolymerer wurden insgesamt sieben Dreiblocke synthetisiert. Davon enthalten vier monodisperses Polyethylenoxid ($n = 16$, $M = 704$ g/mol). Für die verbleibenden drei wurde Polypropylenoxid ($M_w = 2000$ g/mol) verwendet. Die DNA-Sequenzen der einzelnen Dreiblocke wurden so gewählt, dass durch die Hybridisierung ein alternierendes Multiblockcopolymer entsteht. Die DNA-Sequenzen bestehen aus 23 Basen. Dadurch ist der Schmelzpunkt der DNA hoch genug um bei Raumtemperatur eine stabile Doppelhelix auszubilden. Die Masse von 23 bp ist im Vergleich zur Polymermasse mit ca. 15000 g/mol relativ hoch. Deshalb kann die DNA nicht einfach nur

als Linker betrachtet werden, sondern als eigenständiger Block. Die Eigenschaften des Polymers werden noch stark von den Eigenschaften der DNA abhängen. Durch Hybridisierung entsteht ein Multiblockcopolymer, aufgebaut aus 15 Blöcken der Struktur: $ssA^1-B-A^2-C-A^3-B-A^4-C-A^5-B-A^6-C-A^7-B-ssA^8$

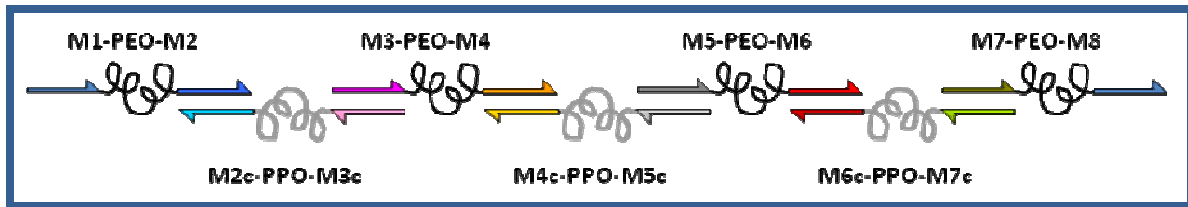


Abb. 4.21: Schematische Darstellung zum Aufbau eines DNA Multiblockcopolymers durch Hybridisierung von Dreiblockcopolymeren. Schwarz: PEO; grau: PPO, bunte Halbpeile: Oligonukleotide.

Die Synthese der Dreiblockcopolymeren erfolgte wie in Kapitel 4.1.2 bzw. 4.1.3 beschrieben. Die Dreiblocke wurden über präparative PAGE gereinigt und in äquimolaren Mengen in 1xTAE-Puffer unter Zusatz von 10 mM $MgCl_2$ gelöst. Im ersten Ansatz wurden etwa 50 μg (3,4 nmol) je Dreiblock verwendet, so dass man 350 μg der Zielstruktur erhalten kann. Die Hybridisierung erfolgte durch Aufheizen auf 95 °C und langsames Abkühlen auf Raumtemperatur über Nacht. Das entstandene Multiblockcopolymer wurde durch ein 1,7 %iges Agarosegel charakterisiert.

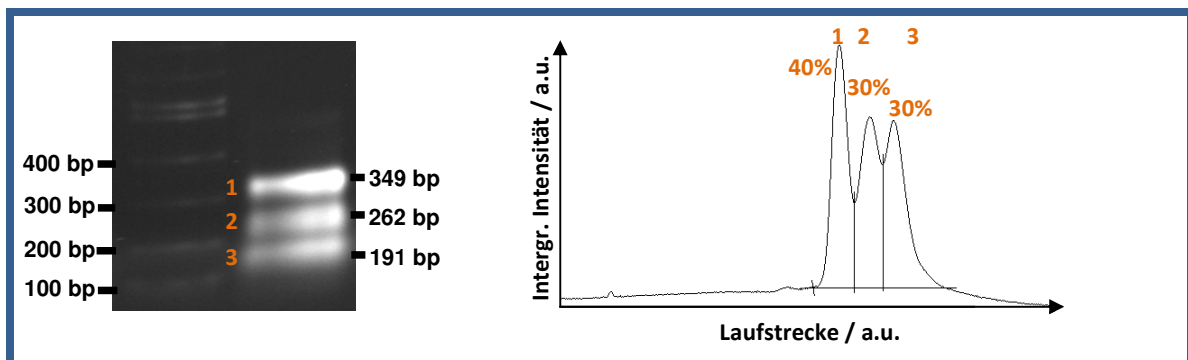


Abb. 4.22: 1,7 % Agarosegel des Multiblockcopolymers. Spur 1: 100 bp Marker; Spur 2: Multiblockcopolymer. Die Lage der Banden wurde mit E-Capt ermittelt und ist rechts von Spur 2 vermerkt. Die Auswertung mit ScionImage (rechts) ergab ein Verhältnis von 40:30:30.

Auf dem Gelbild sind drei Banden mit etwa gleicher Intensität zu erkennen. Die Bandenanalyse mit ScionImage ergab ein Verhältnis von (40:30:30). Die Lage der Banden wurde durch den Vergleich mit der Markerspur mit dem Programm E-Capt ermittelt und liegen zwischen 191 – 349 bp (Abb. 4.22). Die Struktur ist aus insgesamt 161 bp von DNA aufgebaut, hinzu kommen die sieben synthetischen Polymerblöcke. Die sieben Polymerblöcke bewirken, dass die DNA nicht mehr in der semiflexiblen Stäbchenstruktur vorliegt, sondern wesentlich flexibler geworden ist. Durch die gewonnene Flexibilität ist die Bewegung durch die Maschen des Gels erschwert [76]. Hinzu kommt, dass das Verhältnis von Masse zu Ladung

deutlich kleiner ist als bei reiner DNA. Dem entsprechend zeigt die Multiblockcopolymerstruktur eine deutlich geringere elektrophoretische Mobilität, als es für reine DNA vergleichbarer Masse zu erwarten wäre.

Die Tatsache, dass das Multiblockcopolymer in der Gelelektrophorese drei Banden zeigt kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen könnte eine unvollständige Hybridisierung in Betracht gezogen werden, die durch eine unzureichende Stabilität der Zielstruktur oder kinetische Effekte verursacht werden kann. Zum anderen könnte auch die Lower Critical Solution Temperature (LCST) des Polypropylenoxids eine Rolle spielen. Ein Kollaps des Polypropylenoxids aufgrund der LCST würde die Konformation der Zielstruktur beeinflussen und hätte somit Auswirkungen auf die elektrophoretische Mobilität. Hier sind verschiedene Konformationen denkbar, die zu einer verminderten Flexibilität der Multiblockstruktur, bzw. zu einer Kompaktierung und somit zu einer Erhöhung der elektrophoretischen Mobilität führten. In diesem Fall wäre es möglich, dass die drei Banden von drei Multiblockcopolymeren gleicher Länge aber unterschiedlicher Konformation herrühren. Eine Einschätzung, ob die LCST des Polypropylenoxids einen Einfluss auf die Konformation des Multiblockcopolymers haben kann, ist anhand der Messung von Trübungskurven möglich. Am Dreiblockcopolymer sind diese Messungen jedoch nicht durchführbar, da DNA in Wasser gut löslich ist und durch den hohen DNA-Anteil das Dreiblockcopolymer selbst beim Kollabieren des PPOs in Lösung bleibt.

Als Modellverbindungen wurden deshalb temperaturabhängige UV-Messungen am Diaminopolypropylenoxid und am doppelt Tfa-geschützten Diaminopolypropylenoxid ($M_w = 2000 \text{ g/mol}$) durchgeführt. Die Konzentration betrug in beiden Fällen 1 g/L . Die Detektion erfolgte bei 295 nm in Wasser. Es wurden jeweils vier Heiz- und Abkühlzyklen gemessen. Die Mittelwertkurven sind in Abb. 4.23 dargestellt.

Bei Erreichen des Trübungspunktes tritt ein sprunghafter Anstieg der Absorption auf. Die entsprechende Trübungstemperatur kann im Wendepunkt der Kurve abgelesen werden.

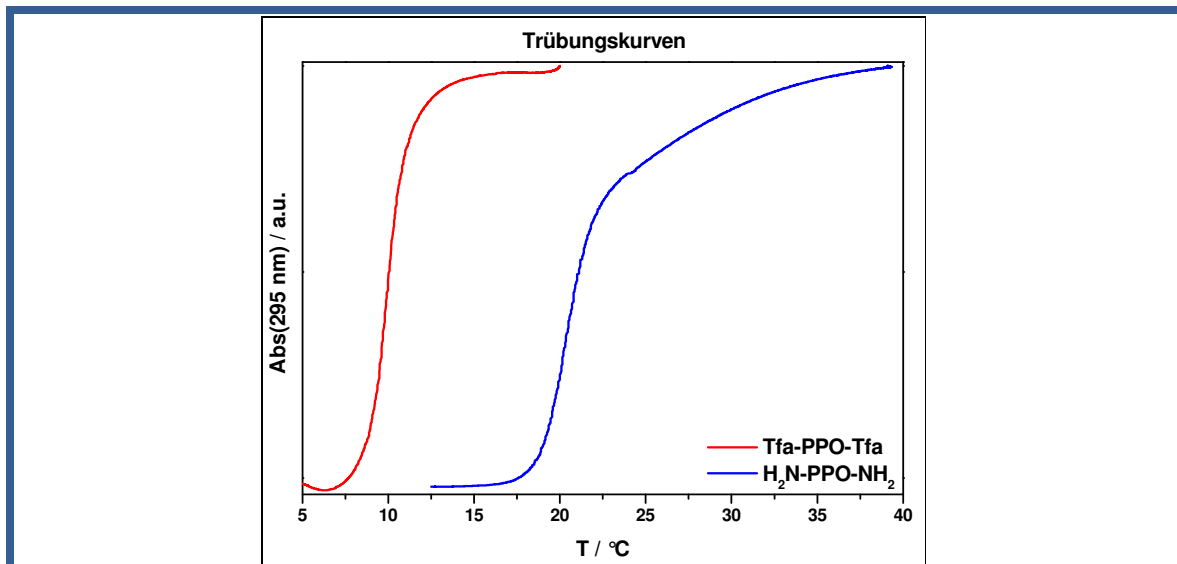


Abb. 4.23: Bestimmung der LCST durch Trübungsmessungen bei 295 nm in Wasser, $c = 1$ g/L von Diamino-PPO (blau, Temperaturzyklus: 10 min bei 10 °C, mit 1 °C/min auf 40 °C, 10 min bei 40 °C, mit 1 °C/min auf 10 °C, 10 min bei 10 °C) und Bis-Tfa-diamino-PPO (rot, Temperaturzyklus: 15 min bei 3 °C, mit 1 °C/min auf 20 °C, 10 min bei 20 °C, mit 1 °C/min auf 3 °C, 15 min bei 3 °C). Trübungspunkt: Diamino-PPO: 20,1 °C; Bis-Tfa-diamino-PPO: 10,1 °C.

Durch das Schützen der Aminogruppen tritt eine Absenkung des Trübungspunktes von 20,1 °C auf 10,1 °C ein. Für das Dreiblockcopolymer bedeutet dies, da dort auch die Aminogruppen des PPO „geschützt“ sind, dass bereits bei 10 °C das PPO kollabieren kann. Prinzipiell wäre also ein Einfluss der LCST auf die Strukturbildung möglich.

Ob es sich tatsächlich um verschiedene Konformationen oder um verschiedene Unterstrukturen aufgrund einer unvollständigen Hybridisierung handelt kann durch die Synthese eines Multiblockcopolymers geklärt werden, bei dem alle PPO-Einheiten durch in Wasser gut lösliche PEO-Einheiten substituiert werden. Zur Untersuchung dieses Sachverhaltes wurden verschiedene Dreiblock-Mischungen angesetzt. Die entsprechenden Zielstrukturen sind in Abb. 4.24 dargestellt. Die Struktur 1 besteht aus allen sieben Dreiblockcopolymeren. Struktur 2 besteht aus sechs Dreiblocken mit jeweils drei alternierenden PPO und PEO-Blöcken. Die Strukturen 3 und 4 bestehen aus jeweils fünf alternierenden Dreiblocken, die sich durch das Verhältnis von PEO zu PPO (3:2 in Struktur 3 bzw. 2:3 in Struktur 4) unterscheiden. Bei den Strukturen 5-7 wurden alle PPO-Einheiten durch PEO ersetzt und die Anzahl der Blöcke zwischen sieben und fünf variiert.

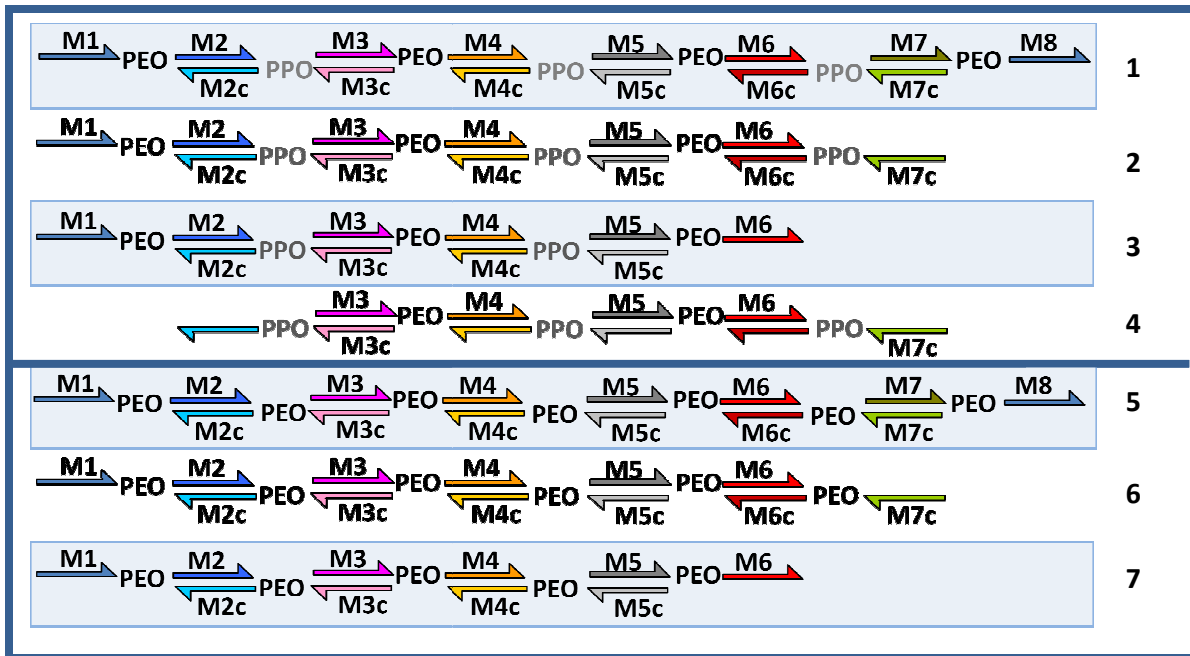


Abb. 4.24: Schematische Darstellung der Zielstrukturen verschiedener Dreiblockcopolymer-Mischungen. Die Strukturen 1-4 bestehen aus unterschiedlich vielen alternierenden Dreiblockcopolymeren mit PEO und PPO. Die Strukturen 5-7 werden aus verschiedenen vielen PEO-Dreiblockcopolymeren aufgebaut.

Die Proben wurden durch Lösen von jeweils 134 pmol jedes Dreiblocks in 20 µl TAE-Puffer mit 10 mM Mg²⁺ hergestellt. Die Hybridisierung der Proben erfolgte im Thermocycler mit dem Programm Hyb90nig. In Abb. 4.25 ist die Charakterisierung der Proben auf einem 2 %igen Agarosegel gezeigt.

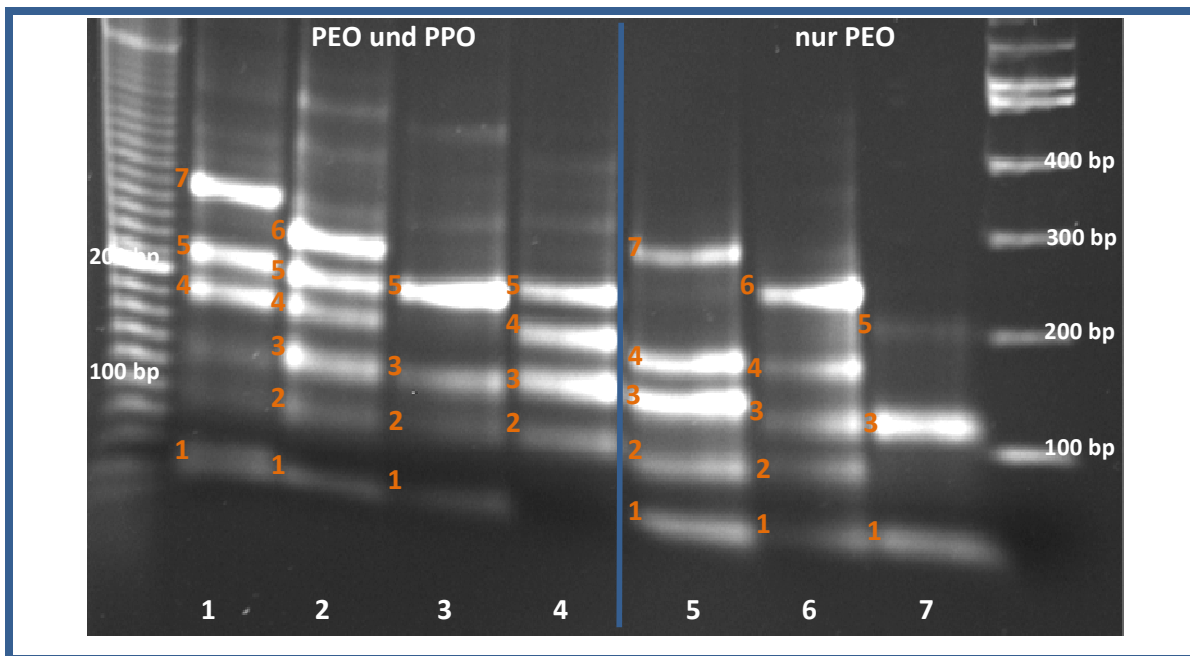


Abb. 4.25: 2 % Agarosegel. Zur Strukturaufklärung wurden verschiedene Mischungen von Dreiblockcopolymeren angesetzt. Die weißen Zahlen unten geben die Struktur entsprechend Abb. 4.24 an. Die orangenen Zahlen links der Banden geben an, wie viele Dreiblockcopolymeren an dieser Bande beteiligt sind.

Die Hybridisierungsprodukte zeigen unabhängig vom PPO-Gehalt vergleichbare Bandenmuster. Neben der eigentlichen Zielstruktur treten weitere Signale auf, die den verschiedenen Unterstrukturen zugeordnet werden können. Besonders deutlich kann diese Zuordnung in Probe 2 erkannt werden. Hier treten sechs Banden auf, deren Trennverhalten recht gut mit dem einer äquidistanten Massenverteilung übereinstimmen, wie es bei typischen DNA-Leitern beobachtet wird. Die Hauptprodukte in der vollständigen Mischung auf Spur 1 können somit klar den Verbindungen aus 4, 5 und 7 Dreiblockcopolymeren zugeordnet werden. Das gleiche Verhalten kann bei den Proben, die kein PPO enthalten, beobachtet werden. Auch hier lassen sich allen sieben Banden entsprechende Unterstrukturen zuordnen. (Die Bande aus fünf Dreiblockcopolymeren ist nur in Probe 7 sehr schwach zu sehen). Aufgrund der kleineren Molmasse des Polyethylenoxids zeigt die Struktur aus sieben Dreiblocken auf Spur 5 eine etwas höhere Mobilität als auf Spur 1. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die LCST des Polypropylenoxids bei der Strukturbildung des Multiblockcopolymers keine Rolle spielt.

Zur weiteren Strukturaufklärung wurde das alternierende Multiblockcopolymer mit Hilfe der Atomic Force Microscopy (AFM) untersucht (Abb. 4.26).

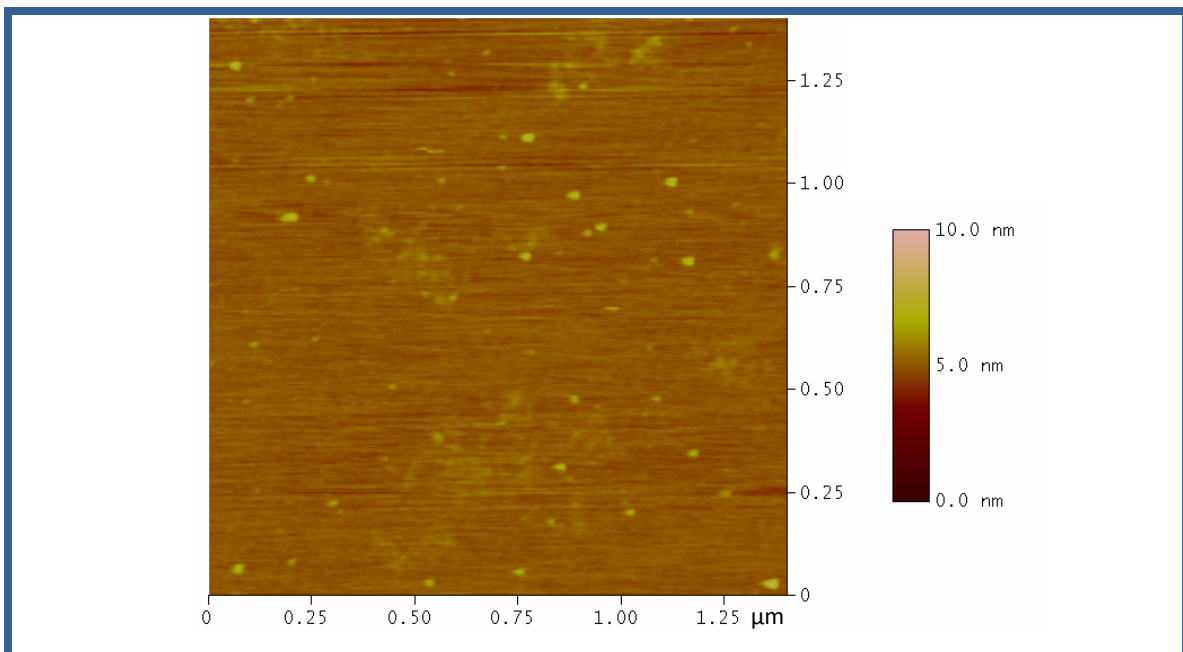


Abb. 4.26: AFM (Höhenbild) des Multiblockcopolymers. Die Probe wird in 10 mM HEPES-Puffer mit 1 mM NiCl_2 auf frisch gespaltenes Mica gegeben. Nach einer Absorptionszeit von 5- 10 min wird das Substrat in die Flüssigzelle eingebaut und mit einer HEPES/ Ni^{2+} Pufferlösung versetzt. Nach einer Äquilibrierungszeit von etwa 30 min wird die Probe im Tapping-Mode abgebildet.

Bei reiner Doppelstrang-DNA mit 161 bp würde man eine Konturlänge von etwa 54 nm erwarten. Durch die Integration der flexiblen Polymereinheiten wird die Helixstruktur jedoch

unterbrochen. Die steifen dsDNA-Abschnitte des Multiblockcopolymeren von 23 Basen, mit einer Dimension von ca. 2 x 7,6 nm (Höhe x Länge) sind dadurch freier beweglich. Das Abknicken der DNA-Segmente gegeneinander führt zu einer gewissen Kompaktierung der Moleküle, d.h. die Strukturen werden kürzer und breiter (runder). Die Dimensionen der im AFM beobachteten leicht elongierten kreisförmigen Strukturen liegen mit 35-43 nm und einer Höhe von 1,8 – 2,6 nm im erwarteten Bereich. Eine intermolekulare Aggregation kann also, auch aufgrund der Ergebnisse der Gelelektrophorese in Abb. 4.25, ausgeschlossen werden.

Für die Strukturbildung bedeuten diese Ergebnisse, dass die verschiedenen Banden nicht durch unterschiedliche Konformationen, resultierend aus dem Kollaps des Polypropylenoxids, zustande kommen, sondern durch unvollständige Hybridisierung. Die verwendeten DNA-Sequenzen sind Teile der Nonamer-Struktur, welche in Kapitel 4.3.3 ausführlich beschrieben wird. In diesem Zusammenhang wurde auch festgestellt, dass die vollständige Hybridisierungsfähigkeit aller verwendeten Sequenzen prinzipiell gegeben ist. Das heißt, die unvollständige Hybridisierung kann nur noch mit der Stabilität der Verknüpfungsstelle zusammenhängen.

Es ist also gelungen Multiblockcopolymeren unterschiedlicher Blockzahl darzustellen. Die Darstellung eines Multiblockcopolymeren aus 15 Blöcken gelang mit einer Ausbeute von 40 %, die Umsetzung zu einer linearen Struktur der Form $ssA^1-B-A^2-C-A^3-B-A^4-C-A^5-B-ssA^6$ aus 11 Blöcken (fünf alternierende Dreiblockcopolymeren) gelang sogar annähernd quantitativ. Durch die Verwendung des modularen Systems aus asymmetrischen Dreiblockcopolymeren erhält man eine große Flexibilität in der Darstellung von Multiblockcopolymeren, was durch die Substitution des PPOs durch PEO gezeigt werden konnte. Durch einfaches Mischen und Hybridisieren der einzelnen Bausteine kann innerhalb kurzer Zeit eine beliebige Struktur synthetisiert werden. Mit den hier vorgestellten Strategien sollte es in zukünftigen Arbeiten gelingen, auch synthetisch inkompatible Blöcke miteinander zu verknüpfen. Ebenso können auf dieser Grundlage weiterführende Untersuchungen zum Einfluss molekularer Parameter auf die Strukturbildung, wie Blocklängenverhältnisse verschiedener synthetischer Blöcke durchgeführt werden.

4.2.2 Polymerisation von Dreiblockcopolymeren

Die reversible Verknüpfung von Molekülen bietet die Möglichkeit Struktur und Eigenschaften des Polymeren in Abhängigkeit verschiedener Faktoren, wie der Flexibilität des Moleküls, der Konzentration der Monomere und der chemischen und physikalischen Umgebung des Systems, zu steuern. Nach den Pionierarbeiten von J.-M. Lehn ist das wissenschaftliche Interesse an reversiblen Polymeren stark gewachsen [133]. Die technische Herstellung dieser Art von Polymeren ist besonders interessant für die Umwelttechnik, da der Abbau dieser Produkte durch geeignete Wahl der Bedingungen beeinflusst werden kann. Die Stabilität der Verknüpfungsstelle ist dabei von entscheidender Bedeutung. Wird diese zu schwach gewählt, ist der Polymerisationsgrad gering und die mechanischen Eigenschaften leiden. Bei zu starker Verknüpfung wird die Dissoziation zu gering und die responsiven Eigenschaften gehen verloren.

Das im vorangehenden Kapitel 4.2.1 vorgestellte modulare System aus asymmetrischen Dreiblockcopolymeren ist auch zur Darstellung reversibler Polymere geeignet. Dabei hat man verschiedene Möglichkeiten bei der Wahl der DNA-Sequenzen zum Aufbau dieser Polymere.

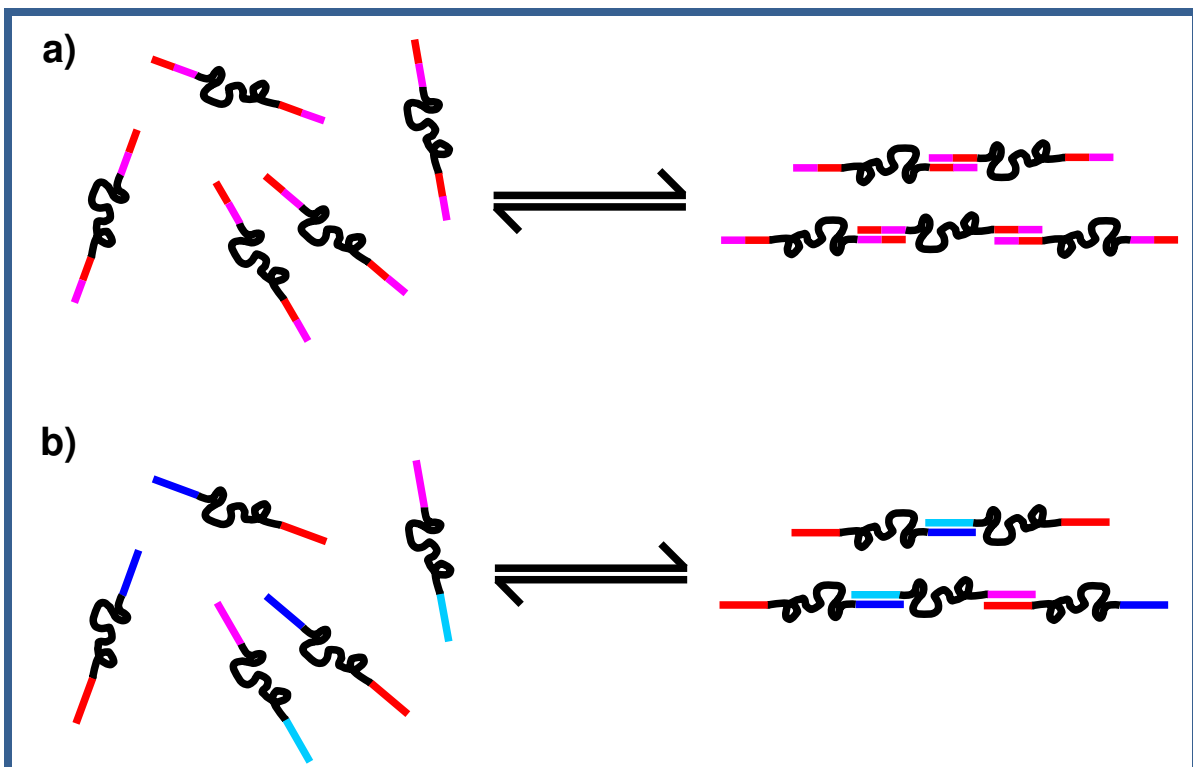


Abb. 4.27: a) Polymerisation eines Dreiblockcopolymeren mit palindromischen bzw. selbstkomplementären Sequenzen; b) Polymerisation von zwei unterschiedlichen Dreiblockcopolymeren mit paarweise komplementären Sequenzen.

Durch die Verwendung palindromischer bzw. selbstkomplementärer Sequenzen auf beiden Seiten des synthetischen Blocks kann die Polymerisation eines monomeren Dreiblocks

verwirklicht werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Polymerisation von zwei verschiedenen Dreiblocken mit paarweise komplementären Sequenzen (Abb. 4.27). Bei der Polymerisation von komplementären Dreiblockcopolymeren könnte man erwarten, dass sich die Monomere zu einer einzigen Kette zusammenlagern, wenn man ausreichend lange wartet, da es keine Initiator-moleküle oder Abbruchreagenzien gibt, die eine Kette starten oder terminieren. Ein Ansatz von S. L. Craig betrachtet die reversible Polymerisation als einen dynamischen Gleichgewichtsprozess, in dem das Polymer seinen thermodynamisch günstigsten Zustand erreicht. Betrachtet man nun, dass die Dreiblocke mit zwei voneinander unabhängigen Oligonukleotiden (ODN^1 bzw. ODN^2) versehen sind, so liegt im Gleichgewicht eine Mischung aus freien Monomeren und verschiedenen Polymeren mit den unterschiedlichen freien Enden (ODN^1 bzw. ODN^2) vor. Der theoretische Polymerisationsgrad kann dann unter Annahme der Polykondensationsstatistik und unter der Voraussetzung, dass die Gleichgewichtskonstante K ein Mittel der beiden einzelnen Gleichgewichtskonstanten ist, entsprechend Gleichung (7) vereinfacht ausgedrückt werden [134] (Die genaue Herleitung ist in den Supporting Informations der Ref 134 zu finden.):

$$DP \approx \sqrt{2KC} \quad (7)$$

Die Gleichgewichtskonstante K kann über die freie Enthalpie ΔG , welche auf Basis der „nearest neighbor Theorie“ errechnet werden kann, mit Hilfe von Gleichung (8) bestimmt werden:

$$K = e^{-\frac{\Delta G}{RT}} \quad (8)$$

Aus Gleichung (7) ergibt sich somit eine Konzentrationsabhängigkeit der Polymerisation. Diese Konzentrationsabhängigkeit wird jedoch vernachlässigbar, wenn die Gleichgewichtskonstante K einen entsprechend hohen Wert aufweist, wie es bei den hier verwendeten Oligonukleotiden der Fall ist (Tabelle 4.1).

Im Rahmen dieser Arbeit dienten zum Aufbau reversibler Polymere jeweils zwei verschiedene Dreiblockcopolymere mit paarweise komplementären Sequenzen (Abb. 4.29). Dabei wurden unterschiedlich lange Oligonukleotide über einen PEG-Spacer mit $n=6$ Wiederholungseinheiten verknüpft. Die Dreiblocke wurden derart aufgebaut, dass ausgehend vom 3'-Ende eine Sequenz von 31 Basen synthetisiert wurde, dann der PEG-Spacer (Sp18) eingebaut wurde und schließlich Sequenzen der Längen 46, 23, 16, 8 Basen angehängt wurden. Dadurch erhält man unterschiedlich lange Dreiblock-Monomere. Bei den 23 Basen

wurde zusätzlich noch eine Sequenz mit einem hohen GC-Gehalt von 83 % (GC83) eingesetzt, um den Einfluss der Sequenzabfolge und der Schmelztemperatur auf die Polymerisation zu beobachten. Die Sequenzen sind in Abb. 4.28 wiedergegeben.

Dreiblockcopolymer-Monomerpaare zur Polymerisation:

46 Basen-Sp18- 31 Basen

46-31: 5'-CGGTAGTACAACGCTCGCAATCCTGAGCACGTTTCGATACTCCGTGGSp18
CGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTT-3'

46c-31c: 5'-CCACGGAGTATCGAACGTGCTCAGGATTGCGAGCGTTGTACTACCGSp18
AAGTTCTGCTATGTGGCGGGTATTATCCCG-3'

23 Basen-Sp18- 31 Basen

23-31: 5'-TGAGCACGTTTCGATACTCCGTGGSp18CGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTT-3'

23c-31c: 5'-CCACGGAGTATCGAACGTGCTCAsp18AAGTTCTGCTATGTGGCGGGTATTATCCCG-3'

GC83-31: 5'-CGTGCACGCCGGGTGGAGCCGCCSp18CGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTT-3'

GC83c-31c: 5'-GGCGGCTCCACCCGGCGTGACGSp18AAGTTCTGCTATGTGGCGGGTATTATCCCG-3'

16 Basen-Sp18- 31 Basen

16-31: 5'-GTTTCGATACTCCGTGGSp18CGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTT-3'

16c-31c: 5'-CCACGGAGTATCGAACSp18AAGTTCTGCTATGTGGCGGGTATTATCCCG-3'

8 Basen-Sp18- 31 Basen

8-31: 5'-CTCCGTGGSp18CGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTT-3'

8c-31c: 5'-CCA CGG AG Sp18 AAGTTCTGCTATGTGGCGGGTATTATCCCG-3'

Abb. 4.28: Sequenzen der fünf zur Polymerisation verwendeten Dreiblockcopolymerpaare (46-31+46c-31c; 23-31+23c-31c; GC83-31+83c-31c; 16-31+16c-31c; 8-31+8c-31c), wobei die Länge eines ODN-Paares variiert wurde. Die Sequenz von 31 Basen ist für alle Paare identisch. Als synthetischer Teil dient der Spacer18 (Sp18 = PEG, n=6).

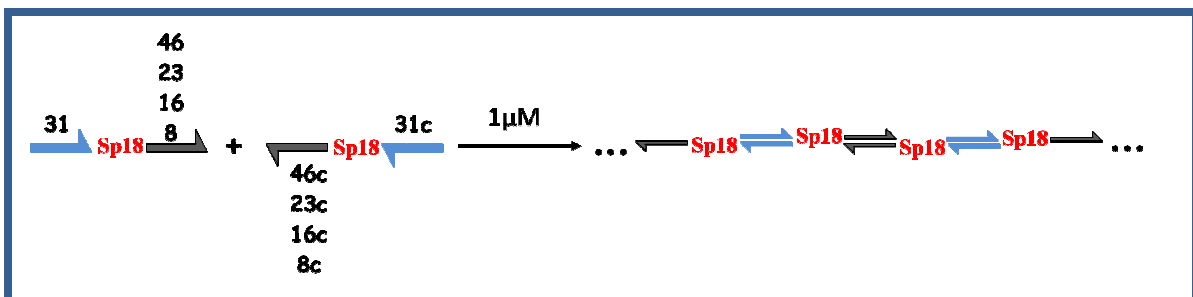


Abb. 4.29: Schematische Darstellung der Polymerisation von Dreiblockcopolymeren. Das Oligonukleotidpaar von 31 Basen ist in allen Ansätzen identisch, die Länge des zweiten Oligonukleotidpaars wurde variiert.

Die entsprechenden komplementären Sequenzen wurden mit einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol/L}$ in 1xTAE mit 10 mM Mg^{2+} gelöst und zur Hybridisierung auf 95 °C erhitzt und dann langsam über Nacht auf Raumtemperatur abgekühlt. Die hybridisierten Proben wurden auf ein 1,7 %iges Agarosegel aufgetragen (Abb. 4.30).

Die Proben mit 23 und 46 Basen (Spur 1, 2, 5) polymerisieren bis in den hochmolekularen Bereich. Die Probe mit 16 Basen (Spur 3) ist nur bis zum Dekamer erkennbar. Da die Probe mit 8 Basen nur eine Bande an der unteren Ausschlussgrenze des Gels zeigt, wurde von dieser Probe noch ein 8 %iges natives Acrylamidgel aufgenommen (Spur 8). Dabei ist zu erkennen, dass ein geringer Teil noch als Monomer vorliegt, bei den anderen Proben hingegen war kein Monomer zu finden. Auch eine breite Dimer-, sowie eine Pentamerbande ist zu finden, jedoch ist die größte Intensität an der oberen Ausschlussgrenze dieses Gels, die keiner genauen Anzahl an Wiederholungseinheiten zugeordnet werden kann. Die Auswertung der Bandenintensitäten erfolgte mit dem Programm ScionImage. Da die Bandenintensität mit steigender Masse an DNA erhöht wird, erhält man aus deren Auswertung eine relative Massenverteilung, diese wurde im Säulendiagramm (Abb. 4.31) gegen die Lage der Banden aufgetragen. Die Lage der Banden in bp wurde durch den Vergleich mit der Markerspur mit dem Programm E-Capt ermittelt. Die Zahlen über den Balken geben die entsprechende Anzahl an Monomereinheiten an. Betrachtet man die Säulendiagramme, so ist es auffällig, dass etwa die Hälfte der Produkte in dimerer oder pentamerer Struktur vorliegt und nur ein geringer Teil zu hohen Molekulargewichten polymerisiert. Ein Grund für den geringen Polymerisationsgrad könnte die Anwesenheit von kettenabbrechenden Spezies sein. Zum Kettenabbruch sind z.B. Fehlsequenzen aus der Festphasensynthese in der Lage. Jedoch wurden alle Proben über PAGE gereinigt und somit alle Fehlsequenzen abgetrennt. Ein weiteres Problem könnte eine intramolekulare Ringbildung sein. Da die Sequenzen nicht selbstkomplementär sind kann die Ringbildung jedoch nur bei einer geraden Anzahl an Monomereinheiten auftreten, da nur dann komplementäre Sequenzen an den Kettenenden vorliegen. Dies ist bei der bevorzugten Struktur von fünf Monomereinheiten nicht der Fall. Außerdem müssten Ringstrukturen ein verändertes Laufverhalten in der Gelelektrophorese zeigen. Die Polymerisationen zeigen allerdings ein Bandenmuster mit äquidistanter Massenverteilung. Studien an puc19 DNA haben gezeigt, dass ringförmige DNA eine niedrigere elektrophoretische Mobilität besitzt als ihr lineares Analogon [135], deshalb wäre ein exakter Nachweis nur durch den Vergleich mit den entsprechenden Ringen möglich.

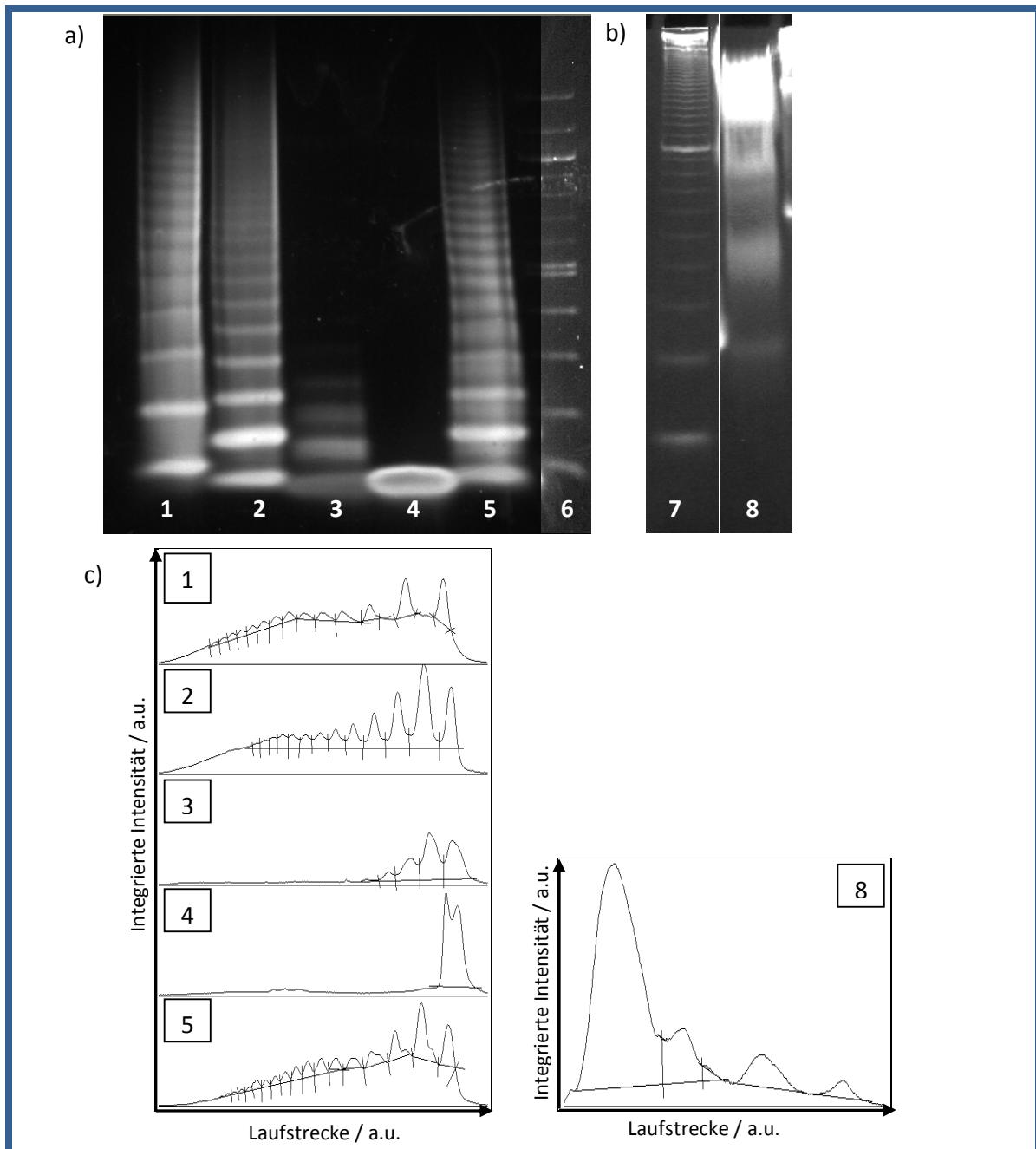


Abb. 4.30: Gelbilder der polymerisierten Dreiblockcopolymerpaare a) 1,7 % Agarosegel. Spur 1: 46-31; 2: 23-31; 3: 16-31; 4: 8-31; 5: GC83-31; 6: 100 bp Marker; b) 8 % PAGE nativ. Spur 7: 10 bp Marker; 8: 8-31. c) Plot der integrierten Intensitäten für die jeweiligen Spuren.

Ein weiterer Punkt, der die Polymerisation stören könnte ist die Ausbildung von Sekundärstrukturen. Dieser Effekt sollte bei kürzeren Sequenzen weniger ausgeprägt sein, als bei langen. Demnach müsste die 16 Basen Sequenz besser polymerisieren, als jene mit 23, 31 oder 46 Basen. In Kapitel 4.4.3 hat sich dieser Trend in der Hybridisierungseffizienz von PCR-Produkten mit sticky-ends gezeigt und wird dort diskutiert. Hier scheint dieser Effekt nicht ausschlaggebend für den geringen Polymerisationsgrad zu sein, da die kürzeren Oligonukleotidsequenzen wesentlich schlechter polymerisieren.

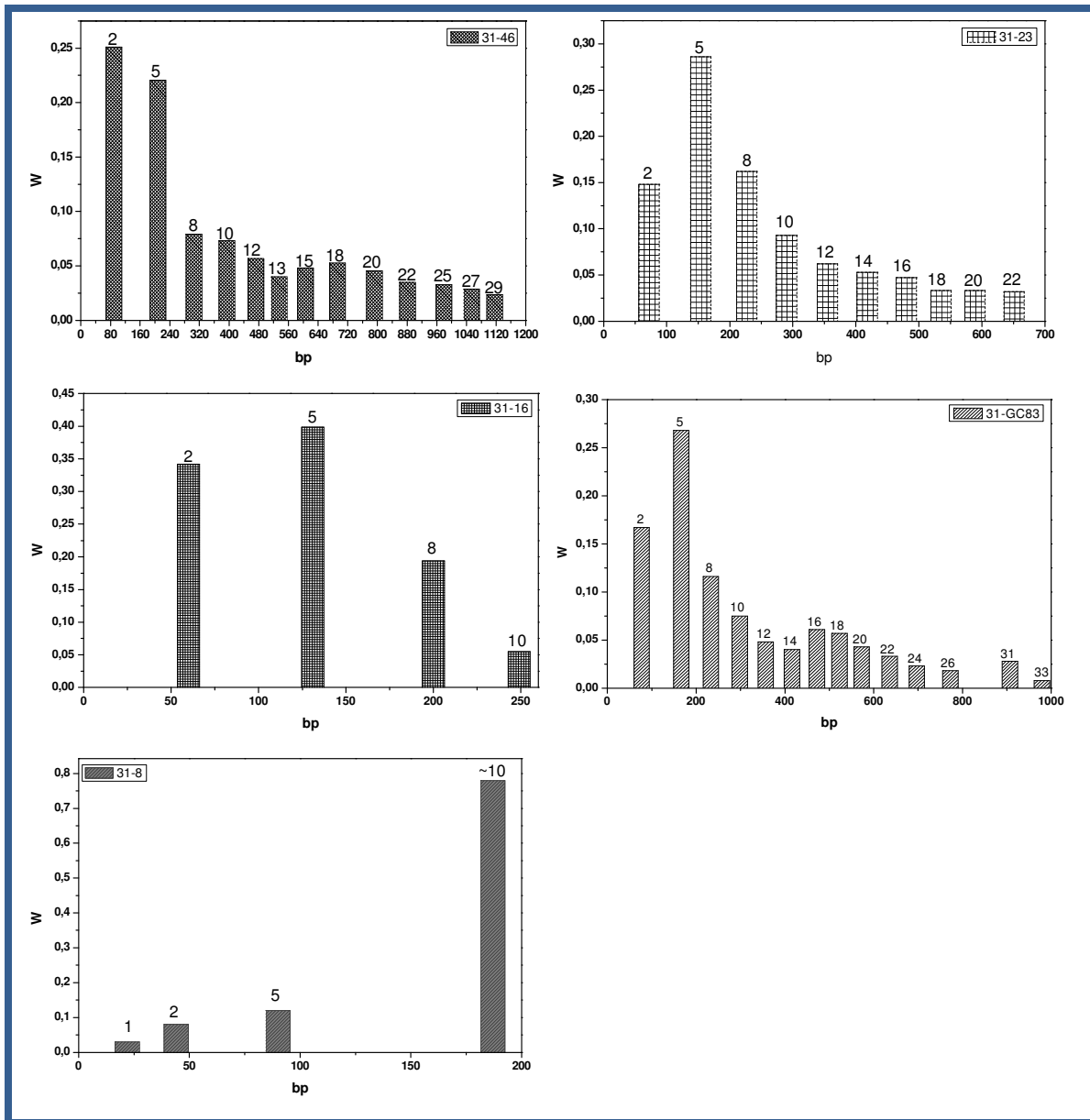


Abb. 4.31: Säulendiagramme der Polymerisationsprodukte. Die relative Massenverteilung ist gegen die Anzahl der Basen aufgetragen, aus der Anzahl der Basen wurde die Anzahl an Monomereinheiten berechnet. Die relative Massenverteilung wurde aus der Intensität der Banden bei der Analyse mit ScionImage ermittelt.

Zudem muss noch die Stabilität der Verknüpfungsstelle betrachtet werden. Die Stabilität der Verknüpfungsstelle nimmt mit der Schmelztemperatur der Oligonukleotidsequenzen zu, d.h. die Stabilität steigt mit der Länge der Sequenz und mit steigendem GC-Gehalt. Vergleicht man die Polymerisationsgrade (Tabelle 4.1) der einzelnen Proben miteinander, so ist der für die sticky-end Länge von 16 Basen relativ gering, wobei der Polymerisationsgrad der Probe mit dem 8 Basen sticky-end aufgrund der schlechten Auflösung der Gelbilder nicht berechnet werden konnte. Die Polymerisationsgrade der anderen Proben bleiben relativ konstant und liegen bei etwa 5. Dies ist weit entfernt von dem theoretisch zu erwartenden Polymerisationsgrad, der sich aus Gleichung (7) ergibt. Demnach müssten aufgrund der hohen

Gleichgewichtskonstanten K, die Oligonukleotide zu einer einzigen Kette polymerisieren. Dies ist allerdings nicht zu beobachten. Die steigende Stabilität der Verknüpfungstelle zeigt sich nur in der Tatsache, dass überhaupt längere Ketten entstehen, wobei sich dieser Trend hauptsächlich in der steigenden Polydispersität bemerkbar macht.

Tabelle 4.1: Links: Berechnung der Gleichgewichtskonstanten K für die zur Polymerisation verwendeten Sequenzen nach Formel (8); die ΔG -Werte wurden mittels IDT- Oligo-Analyzer berechnet [136]. Rechts: Die Gewichts- und Zahlenmittel wurden nach Formel (9) und (10) berechnet. Der Polymerisationsgrad DP folgt dann aus $DP = M_n/M_i$ und die Polydispersität PDI kann dann aus dem Verhältnis $PDI = M_w / M_n$ berechnet werden.

ODN	ΔG kJ/mol	K	M g/mol	Probe	M_i g/mol	DP	M_w g/mol	PDI	M_n g/mol
46	-389,17	1,51E+68	14111,2	46-31	23609	4,7	231035	2,06	112057
23	-189,27	1,44E+33	7055,6	23-31	16554	5,3	134880	1,52	88467
GC83	-244,77	7,61E+42	7067,6	GC83-31	16566	5,3	169435	1,92	88204
16	-125,73	1,06E+22	4888,2	16-31	14386	3,5	68689	1,35	50752
8	-67,89	7,83E+11	2401,6	8-31	11900		102219	1,25	82127
31	-265,78	3,65E+46	9498,2						

Das Gewichtsmittel M_w und Zahlenmittel M_n können aus der relativen Massenverteilung W direkt berechnet werden:

$$M_w = \sum w_i \cdot M_i \quad (9)$$

$$M_n = \frac{\sum w_i}{\sum \frac{w_i}{M_i}} \quad (10)$$

Insgesamt ist in diesen Proben das sticky-end von 31 Basen der limitierende Faktor, da dieses sticky-end in allen Proben vorkommt und somit der Polymerisationsgrad nicht stärker erhöht werden kann, als diese Verknüpfungstelle es zulässt. Ein weiterer Punkt, der beachtet werden muss, ist, dass diese Statistik nur soweit aufgestellt werden konnte, wie die Banden im Gel getrennt voneinander aufgelöst wurden und somit höhere Homologe in der Statistik nicht berücksichtigt werden.

4.3 Integration kettensteifer dsDNA-Blöcke

Auf der Basis von biosynthetischen Dreiblockcopolymeren erhält man Zugang zu definierten Multiblockcopolymeren. Jedoch beträgt die Konturlänge der doppelsträngigen DNA-Fragmente in den beschriebenen Molekülen (Kapitel 4.2) nur etwa 7 nm. Somit kommt der kettensteife bzw. semiflexible Charakter von dsDNA nur wenig zur Geltung. Deshalb sollen lange doppelsträngige DNA-Fragmente als semiflexible Bausteine in supramolekulare Strukturen integriert werden. Die Erzeugung von sticky-ends an Doppelstrangsegmenten ist dabei von entscheidender Bedeutung. Prinzipiell kommen zur Erzeugung von überstehenden Enden zwei Methoden in Frage: die Kombination von teilkomplementären synthetischen Oligonukleotiden oder die Polymerase Kettenreaktion als molekulargenetische Methode. Die einfachere Möglichkeit ist die Verwendung synthetischer Oligonukleotide, da durch die freie Wahl der Sequenzen beliebige teilkomplementäre Kombination gewählt werden können und auf einfachem Wege die sticky-ends sowohl am 3'- als auch am 5'-Ende erzeugt werden können. Dabei hat man die vollständige Kontrolle über Länge und Basenabfolge der Doppelstrangsegmente sowie der sticky-ends. Jedoch unterliegt man bei diesem Verfahren einer Limitierung in der Länge der Oligonukleotide. Durch Festphasensynthese können maximal Oligonukleotide mit einer Länge von 100-150 Basen erzeugt werden [137, 138]. Hochspezialisierte Verfahren ermöglichen die Kopplung von bis zu 300 Nukleotiden [139]. Molekulargenetische Methoden bieten einen wesentlich breiteren Größenbereich bei der Erzeugung von Doppelstrangsegmenten. So können durch PCR-Techniken Doppelstrangsegmente von 30 bp bis 10 000 bp vervielfältigt werden [140]. Hier geht jedoch die freie Wahl der Basenabfolge verloren, da man auf die Replikation einer bestehenden Sequenz angewiesen ist. Auch hier ist es möglich durch die geeignete Primerwahl sticky-ends sowohl am 5'-Ende als auch am 3'-Ende zu erzeugen [48].

4.3.1 Verknüpfung synthetischer dsDNA-Segmente über DNA¹-PEO-DNA² Dreiblockcopolymere als Linker

Die DNA-Polymer-Hybridstrukturen zeichnen sich dadurch aus, dass die DNA-Blöcke absolut monodispers und die Zahl der Blöcke in den Multiblockstrukturen sehr einheitlich sind, wenn man Systeme vermeidet, die zur Polymerisation geeignet sind. Die monodispersen Bausteine eignen sich hervorragend zur Darstellung von Modellverbindungen, um den richtigen Zusammenhang zwischen Theorie und Praxis nachzuweisen. Die Verknüpfung mehrerer dsDNA-Sequenzen über flexible monodisperse Polymerblöcke kann als Modellsystem eines mehrfach gebrochenen Stäbchens dienen. Durch das modulare System ist es möglich, die Länge und die Anzahl der stäbchenartigen dsDNA-Blöcke und der flexiblen Polymerblöcke exakt einzustellen. In dieser Arbeit wurde zum Aufbau einer definierten Struktur aus fünf dsDNA-Fragmenten eine Sequenz von 494 bp eingesetzt. Die Struktur wird aus zehn DNA-Einzelsträngen und vier DNA¹-PEO-DNA²-Dreiblockcopolymeren aufgebaut. Die DNA-Abschnitte der Dreiblockcopolymere sind jeweils 23 Basen lang. Die Sequenzen der fünf DNA-Einzelstränge im oberen Strang bestehen aus jeweils 62 Basen. Im unteren Strang besitzen die Sequenzen 108 Basen, bzw. 85 Basen für die Randstücke. Dadurch entstehen im unteren Strang Einzelstrangüberhänge (sticky-ends) von 23 Basen, die mit den Dreiblockcopolymeren, wie in Abb. 4.32 gezeigt, hybridisiert werden können. Die Sequenzen des oberen Strangs (M1, M3, M5, M7, M2A, M4A, M6A, M8A) sind am 5'-Ende mit einer Phosphat-Gruppe modifiziert, um eine kovalente Verknüpfung durch Ligation zu ermöglichen.

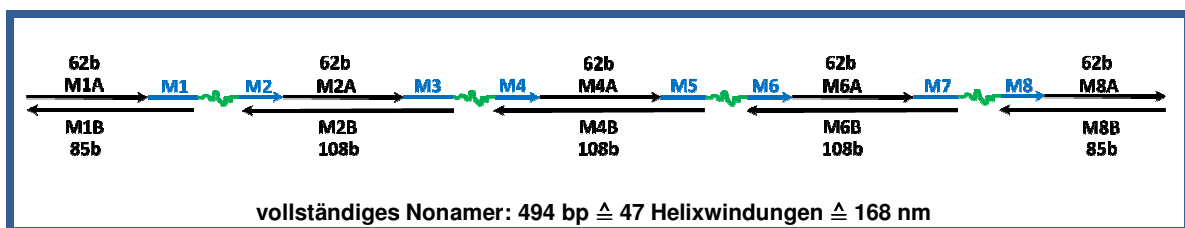


Abb. 4.32: Aufbau eines mehrfach gebrochenen Stäbchens aus Oligonukleotiden. Die Struktur besteht aus fünf dsDNA-Fragmenten von 62 bp mit sticky-ends von 23 b im unteren Strang, die durch Dreiblockcopolymere der Struktur DNA¹-EG16-DNA² verknüpft sind. Zur vollständigen Ligation des oberen Strangs sind die 5'-Enden der Sequenzen M1, M2A, M3, M4A, M5, M6A, M7, M8A mit einer Phosphatgruppe modifiziert.

Die vollständige Struktur besteht aus einem semiflexiblen Doppelstrang von 494 Basen, der an vier Stellen von einem monodispersen Oligoethylenoxid mit 16 Wiederholungseinheiten „unterbrochen“ wird. Unter Vernachlässigung der Oligoethylenoxide entspricht dies einer Konturlänge von ca. 168 nm [74].

Für die erfolgreiche Strukturbildung müssen die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide so gewählt werden, dass keine unerwünschten Basenpaarungen auftreten. Das Design der Sequenzen für eine derart große Struktur kann nicht durch die vollautomatische

Symmetrieminimierung der Sequenzen erfolgen, wie sie von U. Feldkamp et al. eingesetzt wurde [141], da die Rechenzeit exponentiell mit der Sequenzlänge ansteigt. Aus diesem Grund wurde die Sequenz aus 494 bp von N. Heimann in unserer Arbeitsgruppe mit Hilfe des Computerprogramms „SEQUIN“ entworfen [142]. Die Symmetrie des Systems wurde so weit minimiert, dass alle Untersequenzen aus sechs oder mehr Basen nur einmal in der gesamten Struktur auftreten. Außerdem wurde darauf geachtet, dass keine Triplets von gleichen Basen und keine Abfolgen von mehr als vier Purin- bzw. Pyrimidin-Basen enthalten sind. Die optimierte Sequenz wurde in fünf Stücke von jeweils 62 bp aufgeteilt, die über Dreiblockcopolymeren miteinander verknüpft werden können. (Die vollständige Nonamer-Sequenz ist im Anhang wiedergegeben.)

Für eine erfolgreiche Strukturbildung ist außerdem die Abtrennung der Fehlsequenzen von entscheidender Bedeutung, deshalb wurden alle 14 Einzelstränge über denaturierende PAGE gereinigt. Damit die Struktur im Milligramm-Maßstab hergestellt werden kann, wurde die CEE (Continuous Elution Electrophoresis) eingesetzt. Durch die Verwendung dieser Apparatur können bis zu 1,5 mg einer Sequenz in einem Reinigungsschritt von Fehlsequenzen befreit werden.

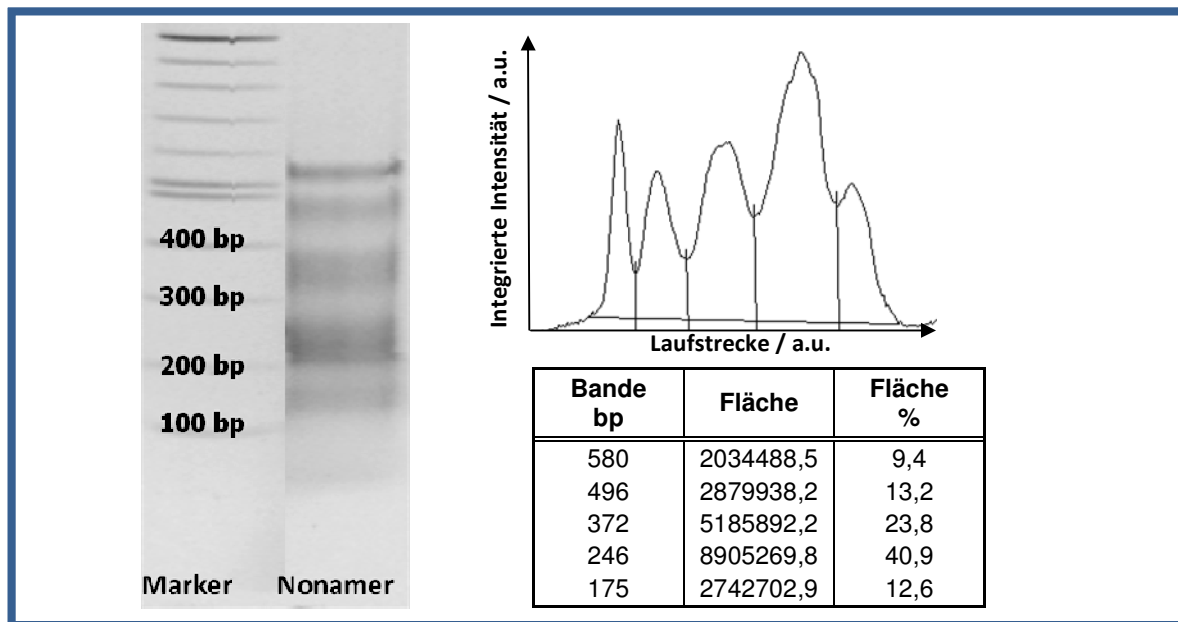


Abb. 4.33: Hybridisierung mit CEE gereinigten Oligonukleotidsequenzen (1,7 % Agarosegel). In einer äquimolaren Mischung werden rund 10 % der Zielstruktur gebildet. Als Nebenprodukte treten vier Unterstrukturen mit höherer Mobilität auf.

Im ersten Versuch wurden 100 µg des Nonamers hergestellt, indem je 328 pmol der 14 Einzelstränge in 1xTAE-Puffer mit 10 mM Mg²⁺ hybridisiert wurden. Die Konzentration betrug 4,4 µmol/l. Mit dem Temperaturprogramm Hyb90nig (Anhang D) wurde das Gemisch

zuerst auf 90 °C erhitzt, um die Stränge vollständig zu denaturieren und dann langsam auf Raumtemperatur abgekühlt, um eine optimale Hybridisierung zu gewährleisten.

Wie in Abb. 4.33 zu sehen, sind bei diesem Hybridisierungsversuch neben der gewünschten Nonamer-Struktur mehrere Unterstrukturen gebildet worden. Die Lage der Banden wurde mit E-Capt ausgewertet und die Intensitätsverteilung der Banden mit Hilfe von ScionImage ermittelt. Das gewünschte Nonamer entsteht zu rund 10 %, daneben haben sich vier Unterstrukturen mit unterschiedlicher Intensität gebildet, wobei die Bande mit der größten Intensität (~41 %) bei etwa 246 bp zu finden ist. Durch den Vergleich mit der Markerspur kann nicht exakt auf die Art der Nebenprodukte geschlossen werden, da es zu viele Möglichkeiten für Strukturen identischer Größe gibt. Durch die PEO-Einheiten wird zusätzlich die Flexibilität der supramolekularen Struktur erhöht, was im Vergleich mit einer Struktur aus reiner DNA zu einer verminderten Mobilität in der Gelelektrophorese führt. Diese Erwartung wird durch das Laufverhalten der vollständigen Nonamer-Struktur in Abb. 4.33 bestätigt. Gründe für die unvollständige Hybridisierung können die Stabilität der Struktur oder die Hybridisierungseffizienz bestimmter Sequenzabschnitte sein. Zur Identifizierung der Unterstrukturen und zum Auffinden kritischer Verknüpfungsstellen wurden parallel 13 Proben, wie in Abb. 4.34 dargestellt, äquimolar angesetzt. Zur Vermeidung der Unsicherheiten bei der Größenbestimmung durch die flexiblen PEO-Einheiten des Synthesewegs wurden an dieser Stelle nicht die Dreiblockcopolymere eingesetzt sondern als Modellsubstanzen die reinen Oligonukleotide M1M2, M3M4, M5M6, M7M8 mit 46 Basen verwendet, welche jeweils den Sequenzen der Oligonukleotide in den Dreiblockcopolymeren entsprechen. In den 13 parallel angesetzten Proben ist, beginnend bei dem komplementären Paar der Sequenzen M1A und M1B, jeweils der nächst folgende Strang zugesetzt bis schließlich in Probe 13 alle Sequenzen enthalten sind. Auffällig ist, dass bei den Proben 3, 6 und 9 ein Sprung in der elektrophoretischen Mobilität der Zielstruktur auftritt, der durch die Addition des 108 Basen Strangs zustande kommt. Die nachfolgenden Proben (4, 5 und 7, 8 bzw. 10, 11), bei denen der Einzelstrangüberhang hybridisiert wird, zeigen jeweils vergleichbare Mobilitäten. Man erkennt, dass bis Probe 5 die Stränge annähernd quantitativ hybridisieren. In den folgenden Ansätzen bildet sich neben den entsprechenden Zielstrukturen eine weitere starke Bande im Bereich der Unterstruktur mit rund 200 bp aus (rote Markierung, Abb. 4.34). Das bedeutet, die Struktur aus zwei Doppelstrangfragmenten, verknüpft durch einen 46 Basen-Linker, scheint eine besonders hohe Stabilität zu besitzen.

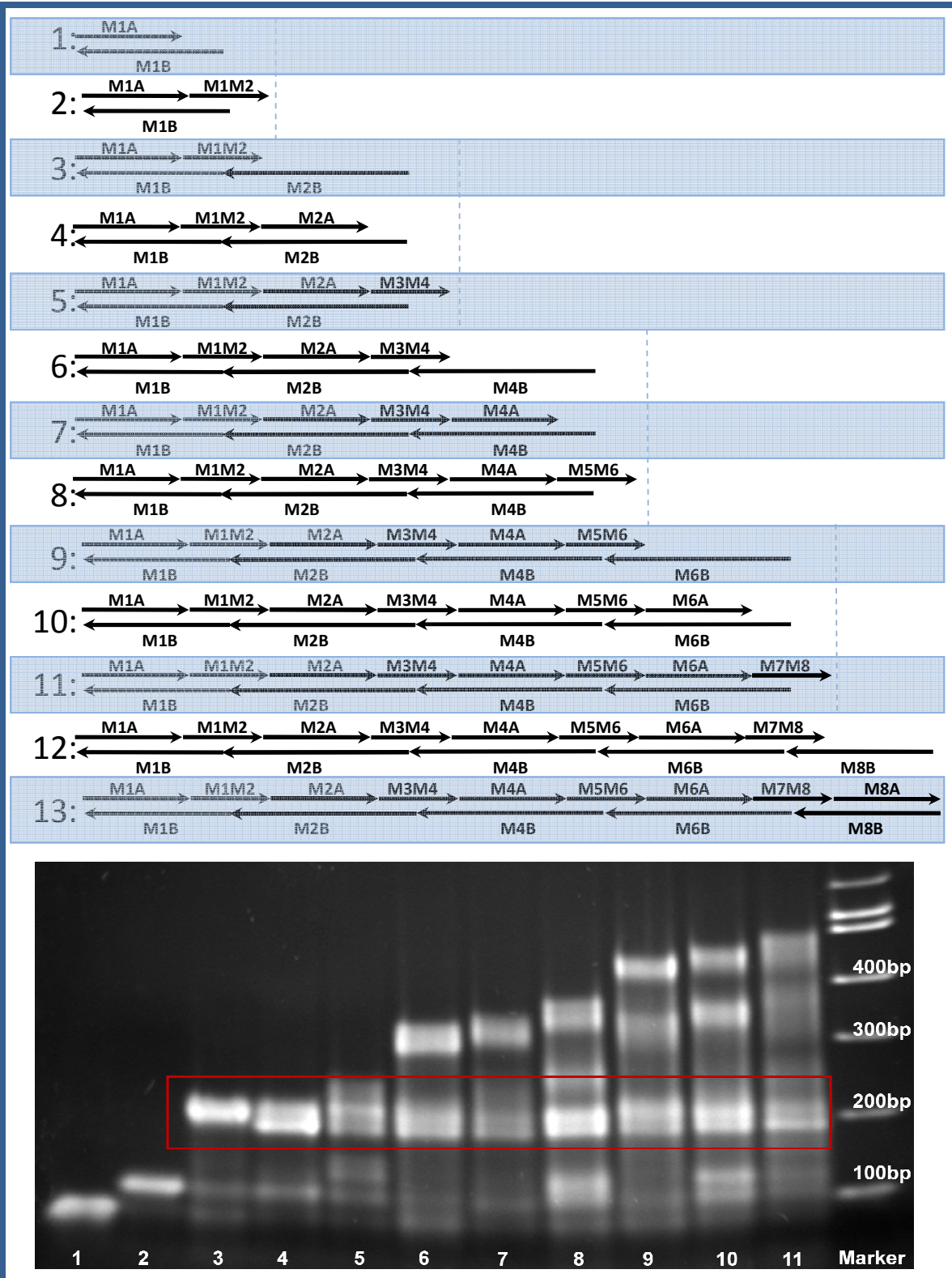


Abb. 4.34: Parallel wurden die oben abgebildeten Strukturen äquimolar mit einer Konzentration von 6 $\mu\text{mol/l}$ angesetzt und mit dem Temperaturprogramm Hyb90nig hybridisiert. Das Ergebnis der Hybridisierung ist unten im 1,7% Agarosegel dargestellt. Zielstrukturen von bis zu fünf Strängen werden quantitativ gebildet. Verwendet man mehr als fünf Sequenzen bilden sich Unterstrukturen aus. Die Kombination von vier oder fünf Einzelsträngen (zwei Doppelstränge mit 46 b linker verknüpft) ist anscheinend sehr stabil. Ab Probe 11 mit zwölf Einzelsträngen sind keine scharfen Banden mehr zu erkennen.

Dieses Strukturelement würde auch zu der intensivsten Bande bei etwa 250 bp (Abb. 4.33) in dem zuvor angesetzten vollständigen Nonamer passen (aufgrund der PEG-Modifizierung ist diese Bande zu größeren Massen verschoben). Ab Probe 12 sind die Banden diffus verbreitert. Dieses Phänomen tritt normalerweise nur bei einer unvollständigen Abtrennung der Fehlsequenzen auf. Die verwendeten Sequenzen wurden jedoch zweimal durch präparative PAGE gereinigt, weshalb hier ein anderer Grund vorliegen muss. Um kinetische Ursachen für die unvollständige Bildung der Zielsequenz ausschließen zu können, wurde eine sehr langsame Hybridisierung über Nacht durchgeführt. Aber auch diese zeigte keine bessere Ausbeute an der Zielstruktur. Um Fehler in der Stöchiometrie vollständig auszuschließen wurde die Synthese unter Ausnutzung der offensichtlich sehr stabilen Kombination aus fünf Strängen wie folgt modifiziert: Im ersten Schritt werden die fünf dsDNA-Fragmente des Nonamers (H1-H5, Abb. 4.35) separat hybridisiert und über PAGE gereinigt, um die richtige Stöchiometrie der beiden Einzelstränge zu garantieren. Anschließend werden jeweils zwei Doppelstrangfragmente mit dem entsprechenden Linker verknüpft (Struktur A & E, Abb. 4.35). Dies entspricht der stabilen Hybridstruktur aus fünf Einzelsträngen. Übrig bleiben das mittlere Doppelstrangfragment und die beiden passenden Linker von 46 Basen. Diese sollen miteinander hybridisiert werden und das Mittelstück M bilden (Abb. 4.35). Die so entstandenen drei Teile des Nonamers werden wieder über PAGE gereinigt, damit auch hier später keine überschüssigen Fragmente auftreten können und die richtige Stöchiometrie innerhalb der Struktur garantiert ist. Aus diesen drei Unterstrukturen soll schließlich das Nonamer zusammengesetzt werden (Abb. 4.35).

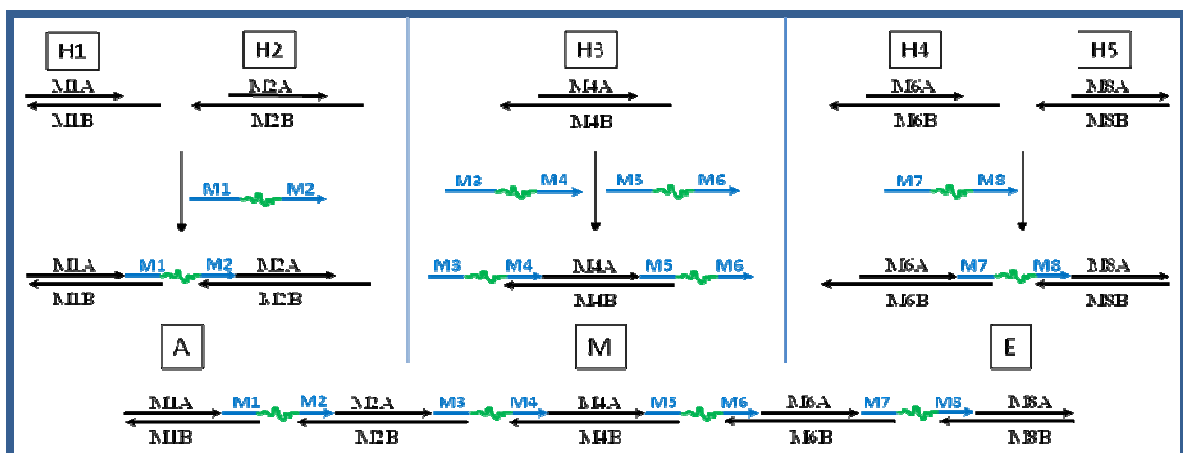


Abb. 4.35: Schematische Darstellung des modifizierten Synthesewegs unter Ausnutzung der stabilen Kombination aus zwei ds Fragmenten verknüpft über einen Linker. Zuerst werden die fünf dsDNA-Fragmente (H1-H5) separat hybridisiert. Anschließend erfolgt die Verknüpfung von zwei Doppelsträngen über einen Linker (A, E), der Mittelteil der Struktur besteht aus einem Doppelstrang, an den zwei Linker hybridisiert werden.

Die hybridisierten Doppelstrangfragmente (H1 – H5) sind in Abb. 4.36 zu sehen. Diese wurden auf 90 °C erwärmt und dann durch langsames Abkühlen über Nacht hybridisiert. Die Doppelstrangbildung erfolgte in allen fünf Fällen vollständig. Trotzdem wurden diese über native PAGE gereinigt, um Störungen durch nicht hybridisierte Einzelstränge, die eventuell auf Grund unzureichender Anfärbung nicht detektiert werden, in den folgenden Schritten ausschließen zu können. Die kleineren Randstücke mit einem sticky-end laufen wie erwartet zwischen 70-80 bp, die drei Doppelstränge mit zwei sticky-ends zwischen 80-90 bp.

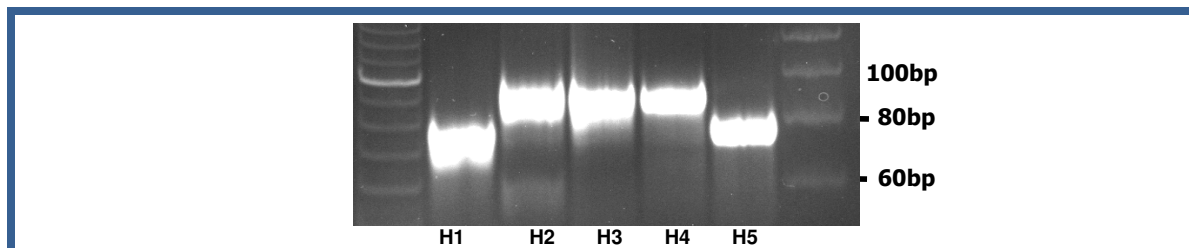


Abb. 4.36: 10 % PAGE nativ: hybridisierte Doppelstrangfragmente: H1, H5: 62 bp mit einem sticky-end von 23 Basen; H2, H3, H4: 62 bp mit zwei sticky-ends von jeweils 23 Basen, vor der PAGE- Reinigung.

In Abb. 4.37 sind die über Linker verknüpften Doppelstrangfragmente zu sehen. Bei diesen Proben wurde zum Hybridisieren das Temperaturprogramm Hyb50 (Anhang D) gewählt, d.h. die Proben werden nur auf 50 °C erhitzt und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Dadurch werden die Doppelstrangfragmente nicht denaturiert, da die Temperatur mindestens 30 °C unterhalb des Schmelzpunktes der 62 bp bleibt. Die Temperatur ist aber ausreichend um die 23 Basen der Linkermoleküle weitestgehend zu schmelzen, da dort der höchste Schmelzpunkt bei etwa 59 °C liegt [143].

Die Hybridisierung wurde mit den Linkermolekülen aus reiner DNA (Spur 1, 4, 5, 6, 7) und den Dreiblockcopolymeren durchgeführt. Bei der Struktur A wurde neben dem monodispersen Polyethylenoxid $n = 16$ (Spur 2) zusätzlich das engverteilte Polyethylenoxid mit $M_w = 3400$ g/mol eingesetzt (Spur 3). Zusätzlich wurden neben den zum Aufbau der Zielstruktur (Nonamer) benötigten Fragmente (A, M, E) noch die beiden anderen Möglichkeiten zur Kombination von Doppelstrangfragmenten (H2 & H3, bzw. und H3 & H4) über Linker verknüpft. Die Verknüpfung von zwei Doppelstrangfragmenten über einen Linker verläuft in allen Fällen annähernd quantitativ. Bei der Hybridisierung von zwei Linkermolekülen an ein Doppelstrangfragment treten jedoch Probleme auf. Die Hybridisierung ist nicht vollständig. Es wird eine zusätzliche Unterstruktur gebildet. Die einzig mögliche Unterstruktur, die auftreten kann, ist die Hybridisierung von nur einem Linkermolekül an den Doppelstrang. Dies stimmt auch bei dem Vergleich der Bande mit dem Marker überein. Die Zielstruktur wird bei 131 bp erwartet, die Unterstruktur bei 108 bp. Eine falsche

Stöchiometrie könnte nur durch fehlerhafte UV-Messung oder Pipettierfehler zustande kommen. Da auf der Grundlage der gleichen Konzentrationsbestimmungen auch die Ansätze H2-M3M4-H3 und H3-M5M6-H4 (Spur 4 & 7) gemacht wurden, bei denen jeweils ein Doppelstrang und ein Linker identisch mit der Struktur M (M: M3M4-H3-M5M6) sind und diese gut hybridisieren, kann kein nennenswerter Fehler in der Stöchiometrie vorliegen. Folglich ist der Grund in diesem Fall eine unvollständige Hybridisierung, die offenbar in Zusammenhang mit der Struktur des Zielkonstrukts steht.

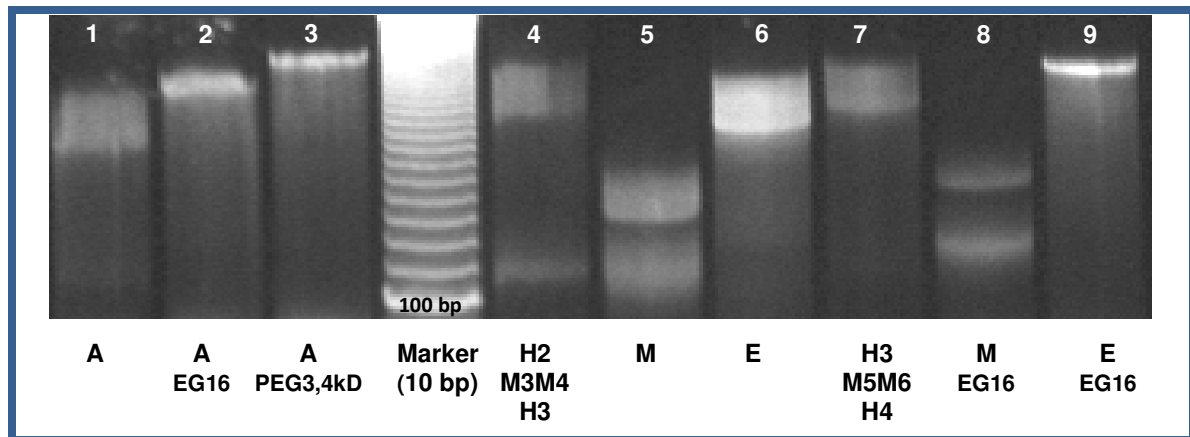


Abb. 4.37: 10 % PAGE nativ: Die Strukturen A, M, E wurden durch Hybridisierung mit Linkern aus reiner DNA und Dreiblockcopolymeren dargestellt. Spur 1, 5, 6: 46 bp DNA-Linker; Spur 2, 8, 9: Dreiblockcopolymer-Linker (monodisperses Oligoethylenoxid, $n=16$); Spur 3: Dreiblockcopolymer-Linker (Polyethylenoxid, $M_w=3400$ g/mol). Zur Überprüfung der Hybridisierungseffizienz wurden zusätzlich die Strukturen H2-M3M4-H3 und H3-M5M6-H4 (Spur 4, 7) mit reinen DNA-Linkern dargestellt, die den beiden anderen Möglichkeiten zur Verknüpfung benachbarter Doppelstrangfragmente entsprechen.

Untersuchungen auf Microarrays haben gezeigt, dass Hybridisierungseffektivitäten von Oligonukleotiden mit annähernd identischen Schmelzpunkten deutlich voneinander abweichen können [141]. Jedoch zeigt die Hybridisierung der Sequenzen als Linker zwischen den entsprechenden Doppelstrangfragmenten (Abb. 4.37 Spur 4 & 7) ebenso eine annähernd vollständige Hybridisierung. Die Basenabfolge in der Sequenz kommt demnach auch nicht als Grund für eine schlechtere Hybridisierungseffizienz in Frage. Die Struktur aus einem Doppelstrang und zwei Linkermolekülen ist offenbar ungünstig und damit instabil. Dieser Effekt wurde weitestgehend untersucht: Wenn man die Hybridisierung als Gleichgewichtsreaktion betrachtet, sollte es möglich sein durch Zugabe eines Überschusses an Linkermolekülen, das Gleichgewicht zur Seite der Zielstruktur zu verlagern und damit den Doppelstrang vollständig zu hybridisieren. Aus diesem Grund wurden Beimischexperimente durchgeführt. Die Probe M (EG16) wurde in separaten Ansätzen mit einem 50%igen Überschuss der beiden Dreiblockcopolymeren M3P16M4, M5P16M6 bzw. mit einem 50%igen Überschuss von jeweils nur einem der beiden versetzt und mit dem Temperaturprogramm

Hyb50 hybridisiert. In Abb. 4.38 sind die Ergebnisse dargestellt (Der Plot der Intensität wird im Anhang F wiedergegeben). Das Beimischexperiment zeigt, dass durch Zugabe eines 50 %igen Überschusses von einem der beiden Linker der Anteil an Zielstruktur erhöht werden kann. Erstaunlicherweise unabhängig von der Wahl des Linkers. Das bedeutet, dass die untere Bande aus dem Gemisch der beiden Teilstrukturen besteht, bei der jeweils nur ein Linker hybridisiert ist. Dies wird auch dadurch bestätigt, dass bei der gleichzeitigen Zugabe der beiden Linker, der Anteil an der Zielstruktur deutlich (auf 72 %) erhöht wird. Jedoch ist es selbst in diesem Fall nicht möglich die Unterstrukturen komplett in die Zielstruktur zu überführen. Die Hybridisierungseffizienz ist demnach in nichtstöchiometrischer Mischung deutlich besser, aber nicht quantitativ. Die Verschiebung des Gleichgewichts war demzufolge in diesem Fall möglich.

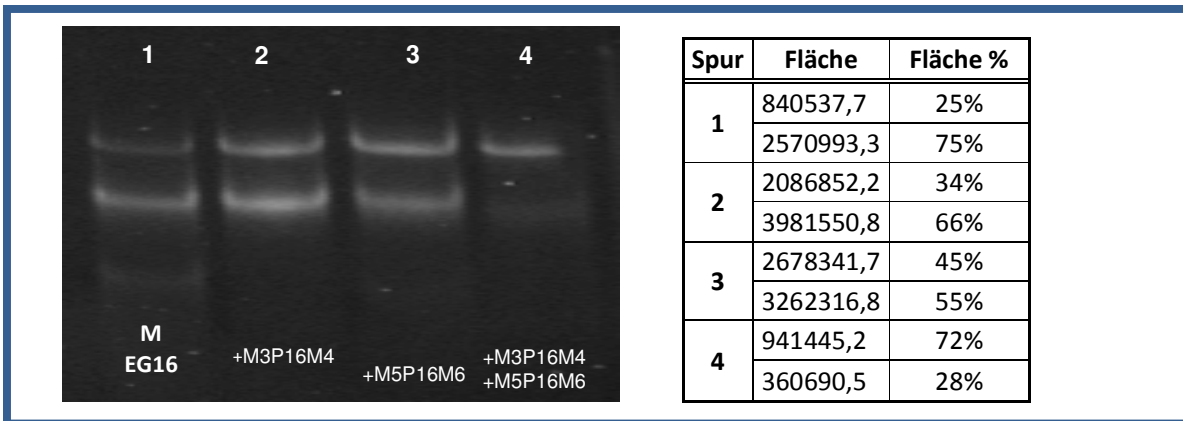


Abb. 4.38: 10 % PAGE nativ der Struktur M (EG16): Spur 1: in stöchiometrischer Mischung; Spur 2+3: Zugabe von je 50 % Überschuss eines Linkers; Spur 4: beide Linker im 50 %igen Überschuss. Das Gelbild wurde mit ScionImage ausgewertet, die Ergebnisse sind in der Tabelle rechts zu finden. In der Tabelle ist jeweils das Verhältnis der beiden Banden angegeben. Die erste Zahl entspricht jeweils der oberen Bande.

Die so erhaltenen Strukturen A, M und E wurden über präparative native PAGE gereinigt und mit dem Temperaturprogramm Hyb50 zum Nonamer hybridisiert. Das Ergebnis der Hybridisierung ist in Abb. 4.39 dargestellt.

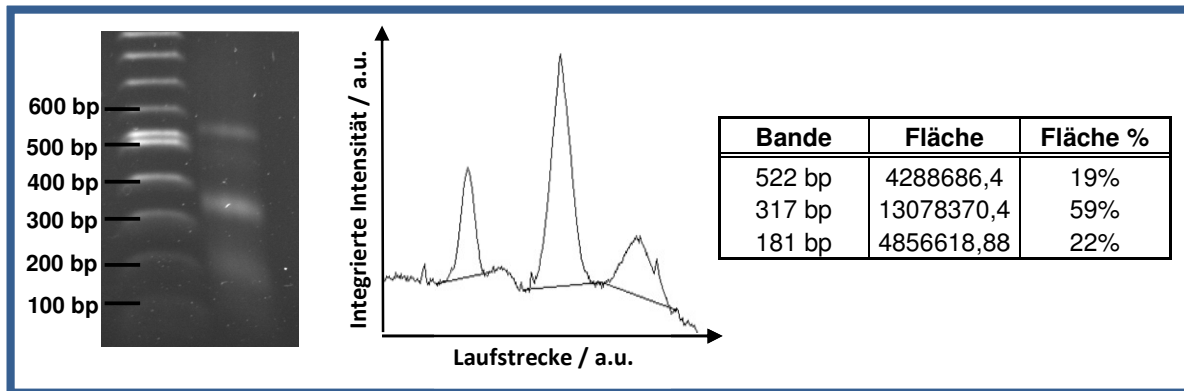


Abb. 4.39: 1,7 % Agarosegel: Nonamer aus den Unterstrukturen A, M, E mit dem Temperaturprogramm Hyb50 hybridisiert. Die Auswertung mit ScionImage ergibt eine Ausbeute von 19 % an Nonamer.

Auch hier ist die Hybridisierung nicht vollständig. Die Auswertung der Banden mit ScionImage ergibt, dass die Ausbeute an Nonamer auf 19 % gesteigert werden konnte. Für die Gesamtausbeute im Vergleich zu der vorherigen Hybridisierung der 14 Einzelstränge (Abb. 4.33) muss noch der Verlust von etwa 30% der Unterstruktur M mit einbezogen werden. Dies bedeutet, dass die Gesamtausbeute bei etwa 16% liegt. Außerdem sind hier lediglich zwei Nebenprodukte zu finden. Somit konnte durch diese Herangehensweise die Zahl der Nebenprodukte halbiert und die Ausbeute an Zielstruktur um etwa 50% erhöht werden. Das Nebenprodukt mit etwa 317 bp kann dem Hybridisierungsprodukt aus den beiden Unterstrukturen (A und M bzw. M und E) zugeordnet werden. Die untere Bande bei 181 bp kann den beiden Strukturen A bzw. E zugeordnet werden. Da keine weitere Bande zu sehen ist, kann davon ausgegangen werden, dass der mittlere Teil M zumindest einseitig vollständig hybridisiert wurde. Dies könnte bedeuten, dass entweder eines der Strukturfragmente A oder E im Überschuss vorliegt, oder die komplementären sticky-ends nicht vollständig hybridisieren. Deshalb wurde auch hier ein Beimischexperiment durchgeführt. Parallel wurden vier Proben angesetzt. Einmal wurden jeweils die beiden Fragmente A und E separat im 50%igem Überschuss zugegeben, dann beide gleichzeitig. Die vierte Probe blieb unverändert wurde jedoch mit dem Temperaturprogramm HybF70 (Anhang D) nochmals hybridisiert. Dabei wird die Probe auf 70 °C erhitzt und anschließend langsam abgekühlt. Dies soll die vollständige Denaturierung der Einzelstrangüberhänge garantieren, da die Schmelzpunkte der sticky-ends zwischen 46 und 59 °C liegen. Mit dem zuvor verwendeten Temperaturprogramm Hyb50 wurde der Schmelzpunkt nicht ganz erreicht. Auch hier wird erwartet, dass durch den größeren Überschuss das Gleichgewicht zum vollständigen Nonamer hin verschoben wird. Die Ergebnisse in Abb. 4.40 zeigen, dass in diesem Fall keine Verschiebung des Gleichgewichts durch die Verwendung eines Überschusses erfolgte. Die Banden wurden mit ScionImage ausgewertet. Der Plot der Intensitäten zeigt deutlich, dass das Verhältnis der oberen beiden Banden konstant bleibt, unabhängig davon welcher Strukturbaustein zugesetzt wird (Abb. 4.41). Die Intensität der unteren Bande nimmt dabei infolge der Zugabe wie erwartet zu. Wenn die mangelhafte Hybridisierungseffizienz auf das Fehlen einer dieser Strukturbausteine zurückzuführen wäre, hätte der Zusatz bei einem Ansatz dazu führen müssen, dass die mittlere Struktur in die Zielstruktur überführt wird. Folglich liegt keiner der Strukturbausteine A oder E im Überschuss vor und die untere Bande besteht aus einer Mischung dieser beiden. Wenn die Hybridisierung durch unzureichendes Schmelzen der sticky-ends bzw. durch Ausbildung von Sekundärstrukturen verhindert wurde,

hätte sich die Erhöhung der Hybridisierungstemperatur eine Auswirkung zeigen müssen, da mit 70 °C die Schmelztemperatur der sticky-ends überschritten wurde.

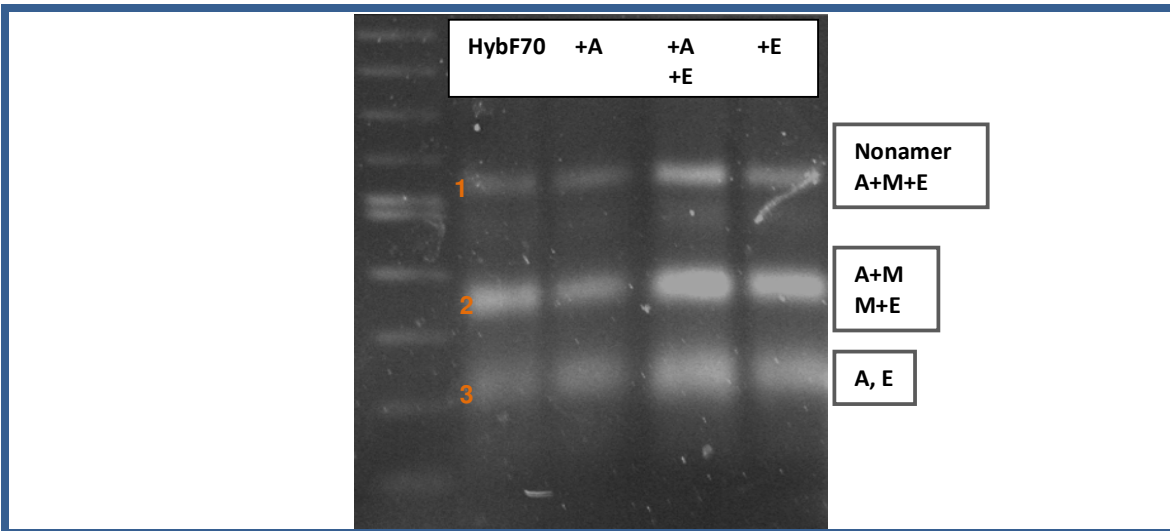


Abb. 4.40: 1,7 % Agarosegel: Beimischexperiment zum Nonamer: Spur 1: 100 bp Marker; Spur 2: in stöchiometrischer Mischung mit HybF70 hybridisiert; Spur 3-5: je 50 % Überschuss an A; A und E; bzw. E mit Hyb50 hybridisiert.

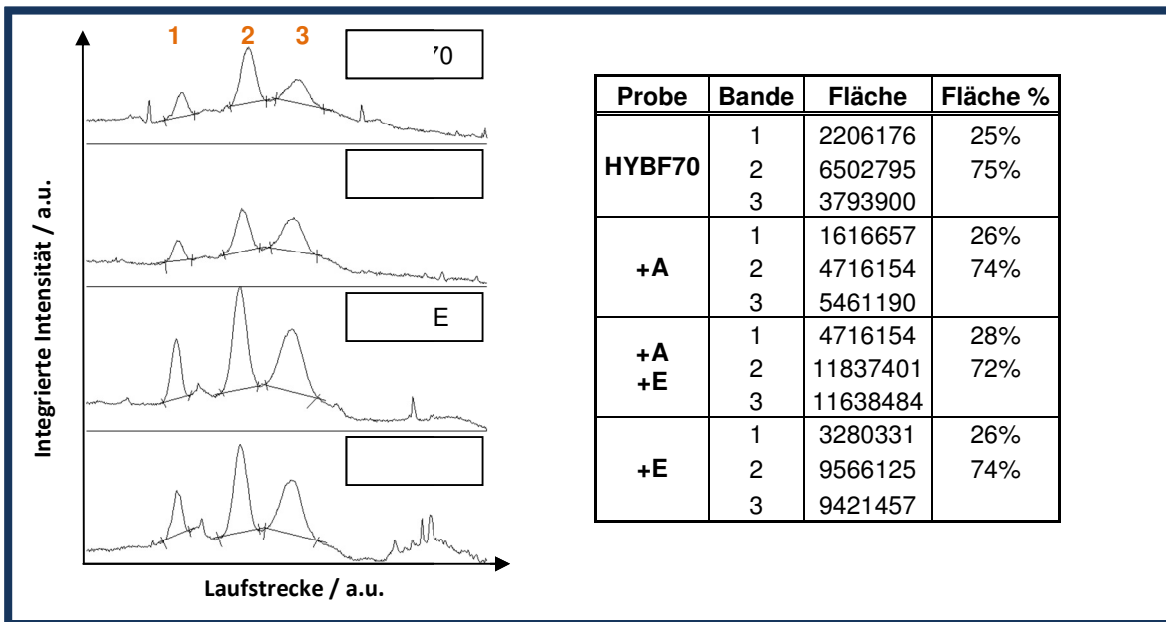


Abb. 4.41: Auswertung des Gelbildes mit ScionImage: links: Plot der integrierten Intensitäten, rechts: Vergleich der Intensitätsverhältnisse der oberen beiden Banden (Nonamerbande und Fragmente AM bzw. ME). Trotz Erhöhung der Menge des fehlenden Fragments bleibt das Verhältnis gleich.

Auch eine Verschiebung des Gleichgewichts nach dem Le Chatelierschen Prinzip konnte nicht erreicht werden, was im Widerspruch zu den vorangegangenen Hybridisierungs- und Beimischexperimenten steht, da es sich hier um die gleichen Sequenzen handelt. Der Grund für diese niedrige Hybridisierungseffizienz muss demzufolge struktureller Natur sein.

Zur Erhöhung der strukturellen Stabilität könnte die Ligation der sticky-ends im oberen Strang von Nutzen sein. Dieser Ansatz wird im folgenden Kapitel verfolgt.

4.3.2 Ligation der supramolekularen Hybridstruktur

Durch Ligation werden benachbarte Oligonukleotide einer hybridisierten Struktur kovalent über eine Phosphordiesterbindung miteinander verknüpft. Dies kann bei der Synthese und der Untersuchung supramolekularer Strukturen hilfreich sein. Durch die kovalente Verknüpfung von Oligonukleotiden wird die Gesamtlänge des entstehenden Einzelstrangs auf die Summe der beiden ligierten Teilstränge erhöht. Dadurch steigt die Schmelztemperatur und somit die thermische Stabilität der Struktur, was zu einer Erhöhung der Ausbeute des Nonamers führen kann. Des Weiteren wird die Untersuchung der supramolekularen Struktur durch denaturierende PAGE ermöglicht. Das Laufverhalten von DNA-Fragmenten, die sowohl Doppel- als auch Einzelstranganteile enthalten, ist in der nativen Elektrophorese extrem schwer vorherzusagen. Dadurch wird die Zuordnung von Banden problematisch. In der denaturierenden PAGE ist der Größenvergleich mit der Markerspur wesentlich zuverlässiger. Bei einer quantitativen Ligation können aus den Längen der ligierten Einzelstränge Rückschlüsse auf deren Anordnung in der zu untersuchenden Struktur gezogen werden. Auf diesem Weg können eventuell kritische Stellen innerhalb des Nonamers lokalisiert werden.

Wie bereits erwähnt sind die Sequenzen (M1, M3, M5, M7, M2A, M4A, M6A, M8A) des oberen Nonamerstrangs zur Ligation am 5'-Ende phosphoryliert. Das bedeutet, dass der komplette obere Strang, bestehend aus fünf Oligonukleotiden mit 62 bp und vier Dreiblockcopolymeren, zu einem einzigen Strang ligiert werden kann.

Im ersten Ligationsexperiment wurden acht, der bereits im letzten Abschnitt erwähnten, 13 parallel angesetzten Proben, zur Identifizierung der Art und Stabilität der gebildeten Unterstrukturen eingesetzt. Es wurden nur die Ansätze verwendet, bei denen ein weiterer ligationsfähiger Strang dazu kam. Zum besseren Verständnis dieses Zusammenhangs sind die verwendeten Proben in Abb. 4.42 dargestellt.

Die Proben wurden mit 10 x Ligasepuffer versetzt, hybridisiert und anschließend mit T4 DNA Ligase über Nacht bei 10 °C ligiert. Anschließend wird das Enzym deaktiviert und erneut hybridisiert. Durch die Hybridisierung sollte eine erneute Gleichgewichtseinstellung erfolgen, da mit der Ligation die bereits hybridisierten 46 Basen Linker mit den 62 Basen zu einem längeren Strang kovalent verknüpft und somit aus diesem Gleichgewicht entfernt werden. Das native Agarosegel (ohne Abbildung) zeigte allerdings keinen Unterschied zu dem bereits im vorherigen Abschnitt gezeigtem Gelbild (Abb. 4.34). Dies bedeutet, dass durch die Ligation mit anschließender Hybridisierung keine Begünstigung der Zielstruktur erreicht wurde und somit keine Verschiebung des Gleichgewichts durch Ligation möglich ist.

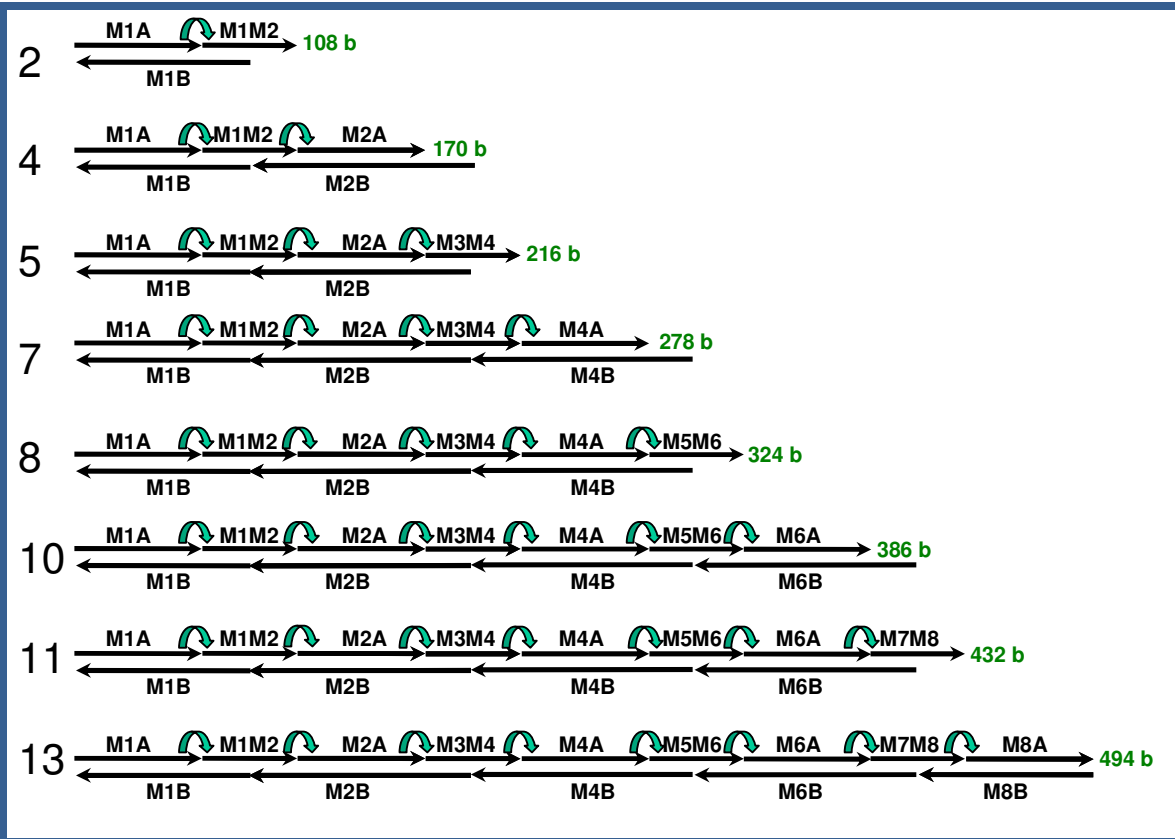


Abb. 4.42: Durch Ligation wurden die abgebildeten Strukturen kovalent verknüpft. Der grüne Pfeil markiert die Ligationsstellen im oberen Strang. Neben der Struktur ist die erwartete Länge bei vollständiger Ligation des oberen Strangs angegeben. Die Sequenzen des unteren Strangs sind nicht phosphoryliert und können nicht ligiert werden.

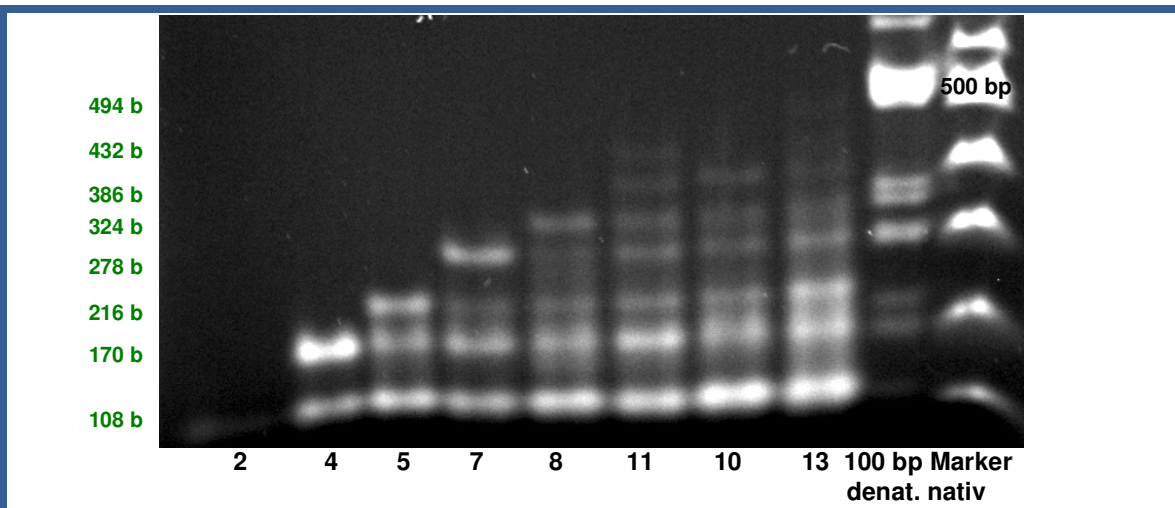


Abb. 4.43: 1,7 % Agarosegel. Die ligierten Proben wurden vorher bei 95 °C denaturiert und in denaturierendem Ladebuffer aufgetragen. Der 100 bp Marker wurde zweimal aufgetragen. Einmal erhielt dieser die gleiche denaturierende Behandlung wie die Proben. In der äußersten Spur rechts wurde er unter nativen Bedingungen aufgetragen. Bei allen Proben wurde die gleiche Stoffmenge aufgetragen. Die Probennummern entsprechen denen des vorherigen Abschnitts. Die grünen Zahlen geben die errechnete Länge des ligierten Strangs an.

Zur weiteren Untersuchung soll noch ein denaturierendes Gel angefertigt werden. Durch die Größe der angesetzten Strukturen kann kein denaturierendes Polyacrylamidgel verwendet

werden, da diese nur eine gute Auflösung bis ca. 200 Basen haben. Deshalb wurden die Proben bei 95 °C denaturiert, auf Eis abgeschreckt und in denaturierendem Ladepuffer in die Geltaschen eines 1,7 %igen Agarosegels gebracht (Abb. 4.43). Bei Agarosegelen muss auf die Verwendung des denaturierenden Harnstoffs verzichtet werden, da dieser die Ausbildung der Agarose-Helix-Struktur stört.

Der Unterschied zwischen 85 und 108 Basen wird im 1,7 %igen Agarosegel nicht mehr aufgelöst, deshalb ist in Struktur 2 nur eine Bande zu sehen. In der unteren Bande laufen folglich die 85 und 108 Basen Stränge des unteren Strangs gemeinsam mit den ligierten Strängen aus einem 62 und einem 46 Basen Strang. Bei Struktur 4 kann man davon ausgehen, dass der obere Strang komplett ligiert wurde, da die Intensität der 170 b Bande entsprechend hoch ist. Diese Probe entspricht wieder der stabilen Struktur aus fünf Einzelsträngen. Bei allen Proben entstehen neben dem längst möglichen Ligationsprodukt immer mehr Nebenprodukte aus den entsprechenden Unterstrukturen. Dabei wird die Intensität der oberen Bande immer schwächer und die Bande mit 170 Basen besitzt durchgängig die größte Intensität. Dies bedeutet, dass die vollständige Ligation prinzipiell möglich ist.

Da die Nonamersynthese durch die gleichzeitige Hybridisierung aller Stränge nicht zu der erwünschten Ausbeute führte, wurde der Strang in drei stabile Teile unterteilt, die schrittweise hybridisiert wurden und durch deren Kombination der Aufbau der pentameren Struktur gelingen sollte. Dadurch konnte die Ausbeute auf 20 % erhöht werden, allerdings wäre eine annähernd quantitative Umsetzung wünschenswert. Aus diesem Grund wurden die drei Fragmente A, M, E ligiert (Abb. 4.44). Durch die Ligation sollte eine Stabilisierung der Struktur erfolgen, die die Hybridisierung bei höheren Temperaturen erleichtert, da dann keine 23 Basen Stränge mit relativ niedriger Schmelztemperatur mehr vorhanden sind. Zuerst wurden die Ansätze aus reiner DNA verwendet. Die Proben wurden mit 10x Ligasepuffer versetzt und mit dem Temperaturprogramm Hyb90 hybridisiert, anschließend folgte die Zugabe der T4 DNA Ligase und die Ligation durch Inkubation bei 10 °C über Nacht. Anschließend wird das Enzym deaktiviert und erneut mit dem Temperaturprogramm Hyb90 hybridisiert. In Abb. 4.45 erkennt man, dass die Ligation nicht vollständig ist, obwohl man in diesem Fall davon ausgehen kann, dass die Strukturen vollständig hybridisiert waren, da sie zuvor über präparative native PAGE gereinigt wurden und auch nach der Aufreinigung der Erhalt der Struktur über Gelelektrophorese kontrolliert wurde. Die Banden des Einzelstrangs aus 108 Basen können in diesem Fall nicht von dem ligierten Strang aus 62 Basen und einem 46 Basen Linker unterschieden werden (Strang 4 und 5). In der Struktur

M sind zwei Banden bei knapp 200 Basen zu erkennen. Diese können nicht direkt identifiziert werden. Allerdings ist die T4 DNA Ligase auch in der Lage glatte Enden (blunt ends) zu ligieren, d.h. DNA Stücke ohne überhängendes Ende. Dies geschieht normalerweise nur bei einer erhöhten Temperatur zwischen 16 und 25 °C. Die Sequenz M3 trägt noch eine Phosphat-Gruppe am 5'-Ende, die noch unberührt bleiben sollte, so dass man nicht ausschließen kann, dass eine unerwünschte Ligation erfolgt ist. Dies würde auch erklären, warum bei 62 Basen keine Bande zu sehen ist, obwohl noch freie Linker bei 46 Basen zur Verfügung stehen. Denn durch die Reinigung der Struktur über Ausschneiden der Bande in der PAGE muss zumindest die Stöchiometrie richtig sein, selbst wenn die Struktur zu einem Zeitpunkt nicht mehr vollständig hybridisiert war.

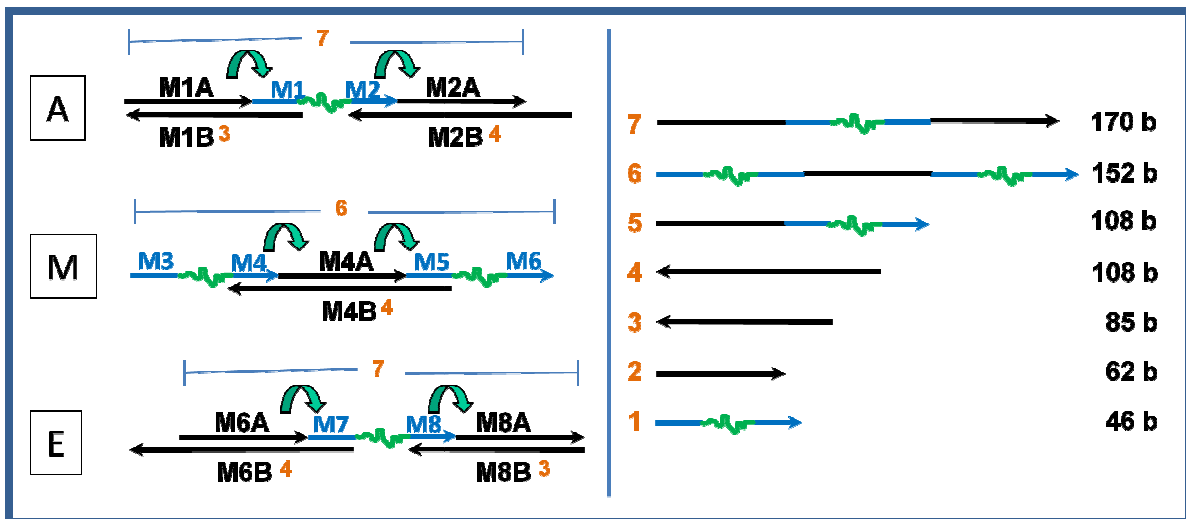


Abb. 4.44: Schematische Darstellung der Ligation der Strukturen A, M, E. Die grünen Pfeile geben die Ligationstellen an. Bei vollständiger Ligation werden für die Strukturen A und E nur die Banden bei 85, 108 und 170 (Nr. 3, 4, 7) Basen und für die Struktur M bei 108 und 152 Basen (Nr. 4, 6) erwartet. Bei unvollständiger Hybridisierung können auch Banden bei 46, 62, 108 Basen (Nr. 1, 2, 5) vorkommen.

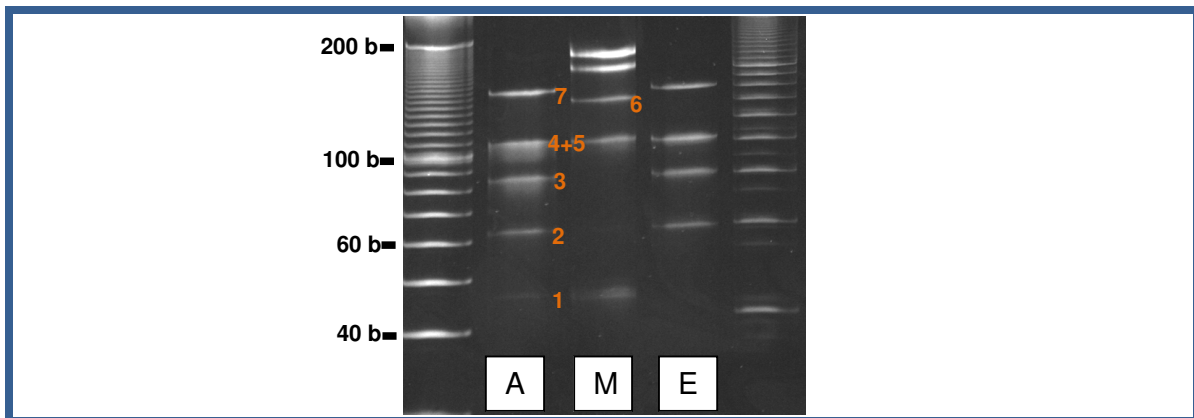


Abb. 4.45: Einzelstrangfragmente der Strukturen A, M, E aus der Ligation. Die erhaltenen Banden können den erwarteten Einzelsträngen zugeordnet werden. Bei vollständiger Ligation werden nur 2 Banden (M) bzw. 3 Banden (A, E) erwartet. Die Ligation war offensichtlich nicht vollständig. Zusätzlich treten bei M noch größere Einzelstränge auf als erwartet. Diese können durch Ligation der 5'-Phosphatgruppe der Sequenz M3 entstehen.

Um weitere unerwünschte Ligationen zu vermeiden, wurde im Folgenden die *E. coli* DNA Ligase verwendet. Diese ist nicht zur Ligation glatter Enden in der Lage, sondern kann nur hybridisierte sticky-ends ligieren. Die Ligation wurde auch mit den Strukturen durchgeführt, die die DNA¹-PEO-DNA²-Dreiblöcke als Linker enthalten. Die PEO-Blöcke verändern das Laufverhalten in der Gelelektrophorese. Bei diesen Proben ist es nun auch möglich den Strang von 108 Basen aus reiner DNA von dem ligierten Strang aus 62 Basen und Dreiblockcopolymer zu unterscheiden (Abb. 4.46). Auch diese Strukturen wurden vor der Ligation über PAGE gereinigt.

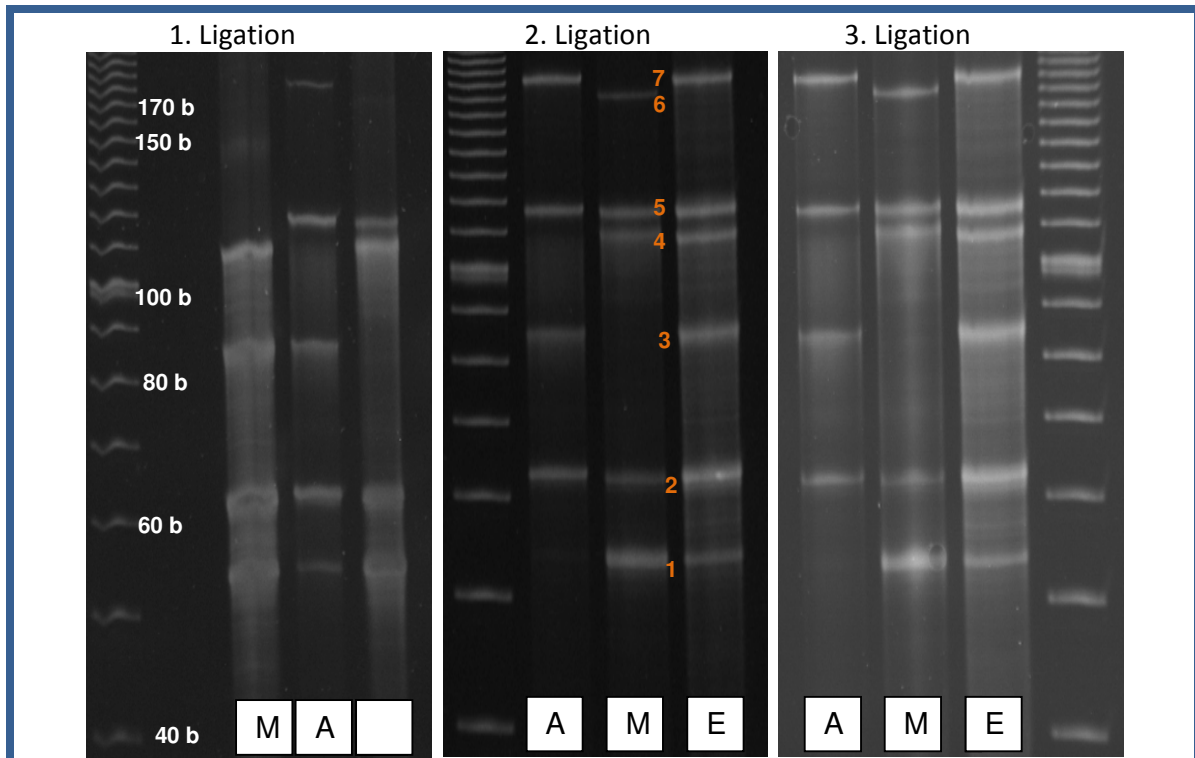


Abb. 4.46: 20 % PAGE denat.: Einzelstrangfragmente der Strukturbausteine A, M, E aus Dreiblockcopolymeren aufgebaut nach 1., 2. und 3. Ligation. Nach der ersten Ligation ist nur bei der Struktur A eine schwache Bande des vollständig ligierten Strangs zu sehen. Nach der zweiten Ligation ist bei allen Strukturen der vollständig ligierte Strang zu sehen. Die dritte Ligation brachte keine Verbesserung. Die Zahlen geben die Lage der vorkommenden Einzelstränge an, die Struktur ist in Abb. 4.44 dargestellt. Bei vollständiger Ligation werden für die Strukturen A und E nur die Banden bei 85, 108 und 170 (Nr. 3, 4, 7) Basen und für die Struktur M bei 108 und 152 Basen (Nr. 4, 6) erwartet. Bei unvollständiger Hybridisierung können auch Banden bei 46, 62, 108 Basen (Nr. 1, 2, 5) vorkommen.

Insgesamt wurde die Ligation dreimal hintereinander durchgeführt. Nach der ersten Ligation ist bei den Strukturen M und E kein vollständig ligierter Strang entstanden. Nur bei der Struktur A ist eine schwache Bande zu sehen. Deshalb wurde versucht durch einen zweiten Ligrationsprozess das Ergebnis zu verbessern. Nach der ersten Ligation wurden die Proben zur Zerstörung des Enzyms 20 min bei 65 °C inkubiert. Da für die zweite Ligation erneut Enzym und Ligasepuffer zugesetzt werden müssen und die Umgebungsbedingungen für die Aktivität

des Enzyms eine entscheidende Rolle spielen, wurden die Proben zuerst durch Gelfiltration (NAP-5) entsalzt. Dann erfolgten die Zugabe des Ligasepuffers und die erneute Hybridisierung der Proben. Dieser Hybridisierungsschritt ist wichtig, da die Ligation nur an hybridisierten Stellen erfolgt. Anschließend gibt man das Enzym zu und inkubiert die Probe bei 16 °C für 16 Stunden.

Das Gelbild der zweiten Ligation zeigt deutlich bessere Ergebnisse. Jedoch ist auch hier die Ligation nicht vollständig. Die Idee ist nun durch erneute Hybridisierung und Ligation immer mehr in die Zielstruktur zu überführen, die dadurch an Stabilität gewinnt. Doch bereits bei der dritten Ligation ist keine Verbesserung mehr eingetreten. Im Gelbild ist nach der dritten Ligation kein Unterschied zur zweiten zu erkennen. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Die Ligation funktioniert nur an hybridisierten sticky-ends, die eine Phosphatgruppe tragen. Um eine optimale Aktivität der Ligase zu erhalten, ist die Inkubationstemperatur von 16 °C erforderlich. Bei DNA-Konzentrationen bis zu 300 µg/ml für eine Linker-Ligation ist die Ligationseffektivität laut Hersteller >95 %. Als Grund kommt also nur in Betracht, dass die Hybridisierung nicht effektiv genug ist oder die Oligos nicht vollständig phosphoryliert sind. Laut Hersteller erfolgt die Ankopplung der 5'-Phosphatgruppe enzymatisch durch die T4-Polynucleotid-Kinase, die Ausbeute sollte >80 % sein. Normalerweise erfolgt die Reaktionskontrolle über MALDI. Im gezeigten war diese Kontrolle jedoch nicht möglich, da die 62 Basen Sequenzen zu groß sind für eine Analyse mittels MALDI-ToF MS. Der Mol%-Anteil an nicht ligierten 62 Basen Sequenzen liegt nach der dritten Ligation bei etwa 30 %. Somit etwas höher als erwartet. Durch die mehrfache Hybridisierung und Ligation ist es auch mit dieser Ligase nicht möglich das Gleichgewicht in Richtung der Zielstruktur zu verschieben.

4.4 Modellsysteme zur Untersuchung der Hybridisierungseffektivität

In den vorangehenden Kapiteln konnte gezeigt werden, wie aus Dreiblockcopolymeren Multiblockcopolymere aufgebaut werden. Auch die Integration kettensteifer Segmente durch die Hybridisierung längerer synthetischer teilkomplementärer Oligonukleotide wurde realisiert. Um semiflexible Bausteine zu erhalten, muss auf molekulargenetische Methoden zurückgegriffen werden, da die Persistenzlänge der DNA etwa 50 nm beträgt, was einer Sequenzlänge von 150 bp entspricht und Sequenzen dieser Länge nicht mehr synthetisch dargestellt werden können. Durch die Polymerase Kettenreaktion (PCR) lassen sich doppelsträngige DNA-Sequenzen von ca. 30 bp bis zu einigen 10 000 bp in vitro vervielfältigen. Prinzipiell kann jede beliebige Doppelstrang-DNA als Templat eingesetzt werden. Größe und Lage des amplifizierten Abschnittes lassen sich ohne Probleme durch die Wahl der verwendeten Primer variieren. Die Reproduzierung der ursprünglichen DNA Sequenz ist annähernd perfekt. Die Wahrscheinlichkeit für die Einführung einer falschen Base liegt bei gängigen Polymerasen im Bereich von 10^{-6} [144]. Ein generelles Problem bei der Verwendung von molekulargenetischen Methoden ist die Tatsache, dass die Techniken zur Manipulation, Aufarbeitung und Trennung von DNA auf Probenmengen im Bereich von einigen Mikrogramm ausgelegt sind. Jedoch sind in der Literatur vereinzelt Ansätze zu finden, die die Polymerase Kettenreaktion als Methode zur Erhöhung des DNA-Anteils in Dreiblockcopolymeren nutzen [145, 146]. In den Arbeiten von A. Herrmann fanden symmetrische Dreiblockcopolymer und Zweiblockcopolymere als gegenläufige Primer in der PCR Anwendung, was zu einer pentameren A-B-A-B-A-Struktur mit drei Polyethylenoxidblöcken (A) und zwei DNA-Blöcken (B) führte. In dieser Arbeit soll die PCR gezielt Modellsubstanzen liefern, um den Einfluss des Doppelstrangsegments und des Linkers auf die Hybridisierung zu untersuchen. Dazu müssen sowohl die Doppelstranglänge als auch die sticky-end Länge gezielt variiert werden können. Die Einführung von sticky-ends während der PCR ist jedoch nicht trivial. Biologische Methoden ermöglichen unter Verwendung von Endonukleasen [147, 148] die Erzeugung überstehender Enden. Hierzu werden spezielle Erkennungsstellen im Templatstrang benötigt und die Überhänge haben in der Regel eine Länge von lediglich 2-4 Basen [149, 150]. Um bei Raumtemperatur stabile Hybridisierungsprodukte zu erhalten, sind jedoch lange überhängende Enden nötig. Die Einführung langer sticky-ends könnte in diesem Fall durch Ligation eines Oligonukleotids an die kurzen Überhänge aus der Restriktion realisiert werden.

Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung teilkomplementärer Primer, die am Ende der „Erkennungssequenz“ eine 2′-Desoxyuridin-Markierung tragen. Bei dieser Methode ist man jedoch ebenfalls auf den Einsatz von Endonukleasen angewiesen. Ein deutlich günstigerer Ansatz zur Erzeugung von überstehenden Enden in der PCR ist das Stoppen der Polymerase kurz vor dem 5′-Ende des Templatstrangs. In der Literatur sind nur wenige Synthesansätze dieser Art beschrieben. Meistens führen diese nur zu einem unvollständigen Abbruch der Polymerisation [151] oder zum Einbau von Sequenzabschnitten, die eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber der hydrolytischen Spaltung des DNA-Rückgrades zeigen [152-154].

Im Rahmen der Dissertation von N. Heimann [48] wurde in unserer Arbeitsgruppe eine Methode entwickelt, die Polymerase kurz vor dem 5′-Ende des Templatstrangs durch den Einbau eines PEG-Spacers in den teilkomplementären Primer zu stoppen (Abb. 4.47). Der Primer wird im ersten Zyklus der PCR am 3′-Ende verlängert. Bei der Synthese des Gegenstrangs im zweiten Zyklus trifft die Polymerase auf den PEG-Spacer. An dieser Stelle stehen keine Templatinformationen zur Verfügung und die Polymerisation bricht ab. In den folgenden Zyklen wird der gewählte Abschnitt exponentiell vervielfältigt. Die Länge der sticky-ends kann beliebig variiert werden, die Sequenz darf nur zu keinem Abschnitt des Templatstrangs komplementär sein.

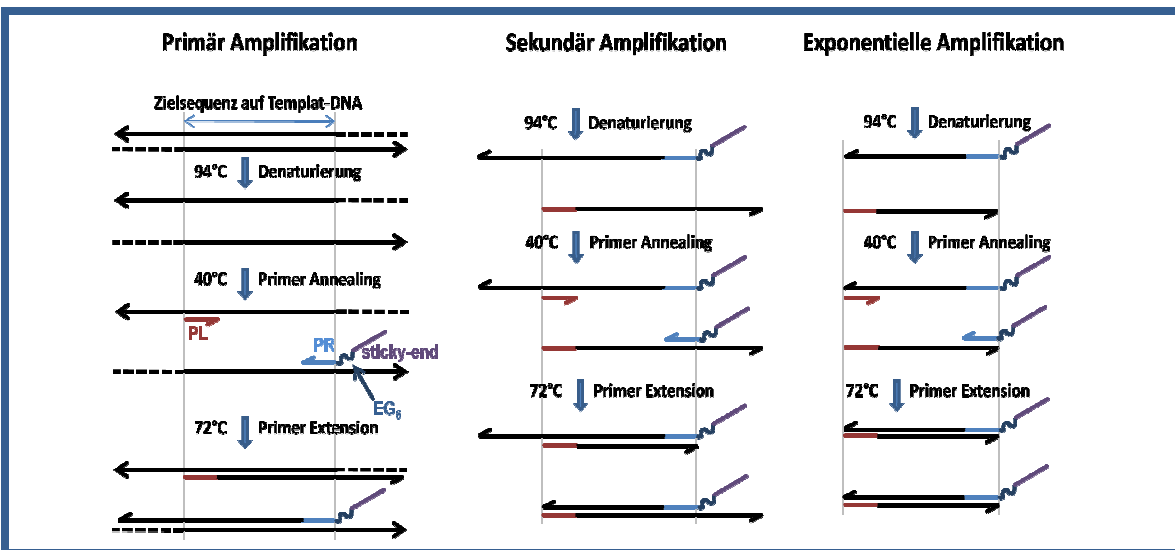


Abb. 4.47: Syntheschema zur Verwendung von PEG-modifizierten Primern: Der modifizierte Primer wird im ersten Zyklus normal verlängert. Im zweiten Zyklus wird die Polymerase durch den PEG-Spacer im Templatstrang gestoppt.

4.4.1 PCR-Produkte mit sticky-ends

Beim Aufbau komplexer Multiblockcopolymerer aus mehreren DNA-Fragmenten und Dreiblockcopolymeren mit synthetischem Polymer tritt immer wieder das Problem der unvollständigen Hybridisierung auf. Dabei wurden sticky-ends von 23 Basen gewählt, da dann der Schmelzpunkt ausreichend hoch ist, so dass eine bei Raumtemperatur stabile Struktur entstehen kann. Verschiedene Hybridisierungsexperimente haben gezeigt, dass die verwendeten Sequenzen prinzipiell hybridisierungsfähig sind. Eine Verschiebung des Gleichgewichts durch den Einsatz einer Überschuskomponente oder durch Ligation war in dem Rahmen, wie man es bei chemischen Reaktionen kennt, nicht ausreichend erfolgreich. Die Hybridisierung längerer DNA-Stränge (62 Basen) erwies sich als stabil, auch die Verknüpfung zweier Fragmente dieser Art über ein Dreiblockcopolymer stellte kein Problem dar. Erst bei der Verknüpfung längerer Fragmente von ca. 200 bp über Dreiblockcopolymer traten Probleme auf. Der Grund für die niedrigen Hybridisierungsausbeuten muss also struktureller Natur sein. Die Idee dabei ist, dass eventuell durch die Verknüpfung größerer Massen die Stabilität der Verknüpfungsstelle herabgesetzt wird. Dies bedeutet, dass kurze DNA-Doppelstränge noch quantitativ über 23 Basen sticky-ends verknüpft werden können, während größere lineare Strukturen eventuell eine stabilere Verknüpfung erfordern.

Zur Untersuchung dieses Problems wurden PCR-Produkte verschiedener Länge synthetisiert, so dass Produkte mit 31, 80, 206 und 600 bp erhalten wurden. Die 206 bp bzw. 80 bp entsprechen dabei in etwa den beim Nonamer zur Verknüpfung gewählten Fragmenten (vgl. Kapitel 4.3: A und E bzw. M, Abb. 4.45), die 31 bp-Abschnitte sind mit der Verknüpfung von Dreiblockcopolymeren vergleichbar und die 600 bp dienen als größeres Fragment, um einen Trend erkennen zu können. Diese Fragmente wurden dann mit unterschiedlich langen sticky-ends versehen und jeweils komplementäre Paare synthetisiert. Die sticky-ends wurden, wie in Abb. 4.47 beschrieben, durch Verwendung von Primern, die einen PEG-Spacer mit $n=6$ Wiederholungseinheiten enthalten, erzeugt. Die sticky-ends haben Längen von 8, 16, 23 und 46 Basen, der GC-Gehalt liegt hier bei etwa 50 %. Als Templat für die PCR diente das linearisierte Plasmid pNEB206A (Anhang C). Da der Schmelzpunkt und somit die Stabilität der sticky-ends nicht nur von der Länge sondern auch vom GC-Gehalt abhängt, wurden darüber hinaus sticky-ends von 23 Basen mit unterschiedlichem GC-Gehalt untersucht. Dadurch kann der Einfluss der Stabilität weitgehend unabhängig von Sekundärstruktureffekten untersucht werden.

Primer-Links:

PL31: 5´-CGG GAT AAT ACC GCG CCA CA-3´

(Primer-Dimer Tm=20 °C, 20b, GC%=60)

PL80: 5´-CTG AGA ATA GTG TAT GCG G-3´

(80bp-PCR Tm=49 °C, 19b, GC%=47)

PL200: 5´-GAT CGT TGT CAG AAG TAA G-3´

(200bp-PCR Tm=39 °C, 19b, GC%=42)

PL600: 5´-GTC TAT TTC GTT CAT CC-3´

(600bp-PCR Tm=44 °C; 17b; GC%=41)

Primer-Rechts:**Sticky-Ends verschiedener Länge:**

PR46: 5´-CGG TAG TAC AAC GCT CGC AAT CCT GAG CAC GTT CGA TAC TCC GTG G **Sp18**
AAG TTC TGC TAT GTG GC-3´

PR46c: 5´-CCA CGG AGT ATC GAA CGT GCT CAG GAT TGC GAG CGT TGT ACT ACC G **Sp18**
AAG TTC TGC TAT GTG GC-3´

PR23: 5´-TGA GCA CGT TCG ATA CTC CGT GG **Sp18** AAG TTC TGC TAT GTG GC-3´

PR23c: 5´-CCA CGG AGT ATC GAA CGT GCT CA **Sp18** AAG TTC TGC TAT GTG GC-3´

PR16: 5´-GTT CGA TAC TCC GTG G **Sp18** AAG TTC TGC TAT GTG GC-3´

PR16c: 5´-CCA CGG AGT ATC GAA C **Sp18** AAG TTC TGC TAT GTG GC-3´

PR8: 5´-CTC CGT GG **Sp18** AAG TTC TGC TAT GTG GC-3´

PR8c: 5´-CCA CGG AG **Sp18** AAG TTC TGC TAT GTG GC-3´

Sticky-Ends von 23 Basen mit unterschiedlichem GC-Gehalt:

PRA23: 5´-AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AA **Sp18** AAG TTC TGC TAT GTG GC-3´

PRT23: 5´-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT **Sp18** AAG TTC TGC TAT GTG GC-3´

PRG23: 5´-GGG GGG GGG GGG GGG GGG GGG GG **Sp18** AAG TTC TGC TAT GTG GC-3´

PRC23: 5´-CCC CCC CCC CCC CCC CCC CCC CC **Sp18** AAG TTC TGC TAT GTG GC-3´

PRGC83: 5´-CGT GCA CGC CGG GTG GAG CCG CC **Sp18** AAG TTC TGC TAT GTG GC-3´

PRGC83c: 5´-GGC GGC TCC ACC CGG CGT GCA CG **Sp18** AAG TTC TGC TAT GTG GC-3´

PRGC17: 5´-TAC ATG TAT TAA ACA AGA TTA TT **Sp18** AAG TTC TGC TAT GTG GC-3´

PRGC17c: 5´-AAT AAT CTT GTT TAA TAC ATG TA **Sp18** AAG TTC TGC TAT GTG GC-3´

Abb. 4.48: Primer zur Synthese verschieden langer PCR-Produkte mit unterschiedlich langen sticky-ends und Variation des GC-Gehaltes. **Sp18** = PEG-Spacer mit 6 Wiederholungseinheiten, Konturlänge ca. 2,25 nm

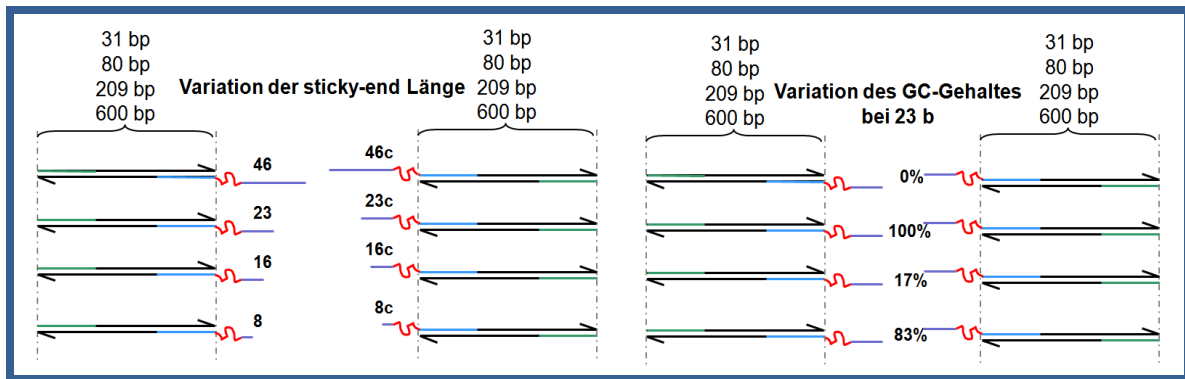


Abb. 4.49: Zur Untersuchung der Hybridisierungseffizienz bei verschiedenen langen PCR-Produkten (31, 80, 209 und 600bp) wurde die sticky-end-Länge (46, 23, 16 und 8b) sowie der GC-Gehalt zwischen 0 % (nur A bzw. nur T) und 100 % (nur G bzw. nur C) variiert.

Die sticky-ends wurden einseitig über den rechten Primer erzeugt. Die Targetsequenz des rechten Primers (blau, Abb. 4.49) auf dem Templatstrang ist mit 17 Basen für alle Strukturen gleich. Alle verwendeten Primer sind in Abb. 4.48 angegeben. Die Sequenz für das sticky-end mit 46 b wurde aus der Nonamer-Struktur genommen, die übrigen wurden durch Verkürzen vom 5'-Ende her erzeugt, d.h. alle sticky-ends beruhen auf der gleichen Sequenz. Wichtig ist dabei, dass die sticky-end Sequenzen zu keinem Abschnitt des Templatstrang komplementär sind. Die Länge des zu vervielfältigenden Abschnitts wurde durch die Lage des linken Primers (Abb. 4.49, grün) auf dem Templatstrang verändert. Für die Synthese des 31 bp PCR-Produktes ist kein Templat erforderlich. Dort werden über sechs komplementäre Basen Primer-Dimere gebildet, die dann verlängert werden.

Die PCR wurde nach dem Standardprotokoll mit thermostabiler Taq-DNA-Polymerase durchgeführt. Das zur Amplifikation verwendete Temperaturprogramm PCRPGEM2.cyc wurde für diese Primer optimiert und ist im Anhang D angegeben. Die Produkte der jeweiligen PCR-Synthesen sind in den Gelen der Abb. 4.50 - 4.53 gezeigt. Bei der PCR ist neben dem gewünschten Produkt immer eine weitere Bande zu finden. Da diese Bande für die jeweilige Doppelstranglänge konstant auf Höhe des Doppelstrangfragments zu finden ist, lässt sich auf ein PCR-Produkt ohne sticky-end schließen. Die verwendeten Primer wurden alle durch Festphasensynthese hergestellt und anschließend über präparative PAGE gereinigt, da Nebenprodukte ohne sticky-end eine exakte Einstellung der Stöchiometrie verhindern. Aufgrund dieser Reinigung ist sichergestellt, dass alle eingesetzten Primer das sticky-end tragen. Eine Instabilität der Primer kann ausgeschlossen werden, da das entsprechende Nebenprodukt auch bei längerer Lagerung nicht in den reinen Primern zu finden ist. Dies bedeutet, dass während der PCR das sticky-end abgespalten wird.

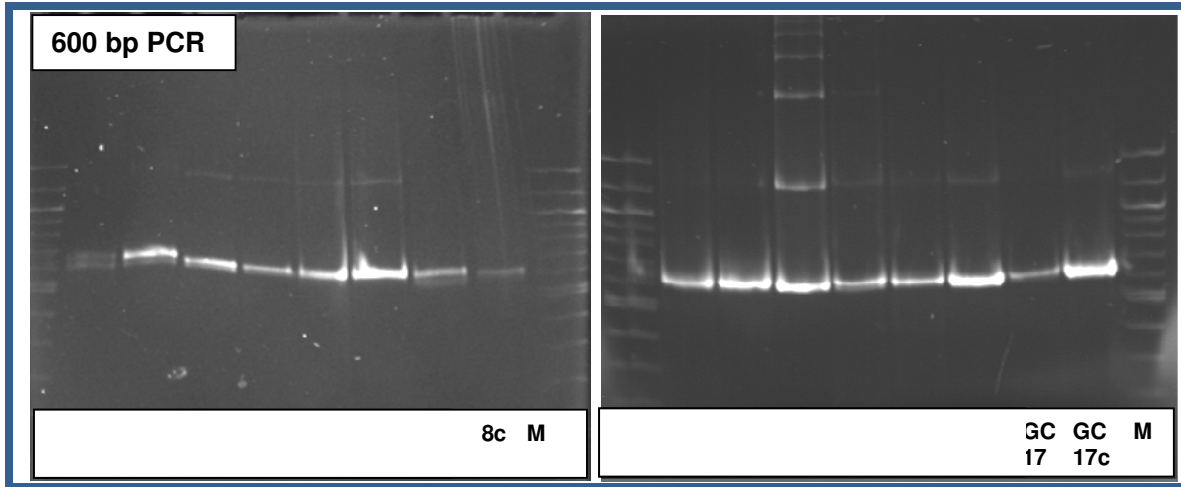


Abb. 4.50: 1,7 % Agarosegel 600 bp PCR: Im linken Gel sind die Produkte mit verschiedenen sticky-ends aufgetragen. Rechts wurde der GC-Gehalt der 23 b sticky-ends variiert. Fast alle Produkte zeigen eine schwache Bande kurz unterhalb des Hauptprodukts bei ca. 600bp. Die Probe mit einem sticky-end aus 23x G zeigt multimere Banden im Abstand von ca. 600 bp.

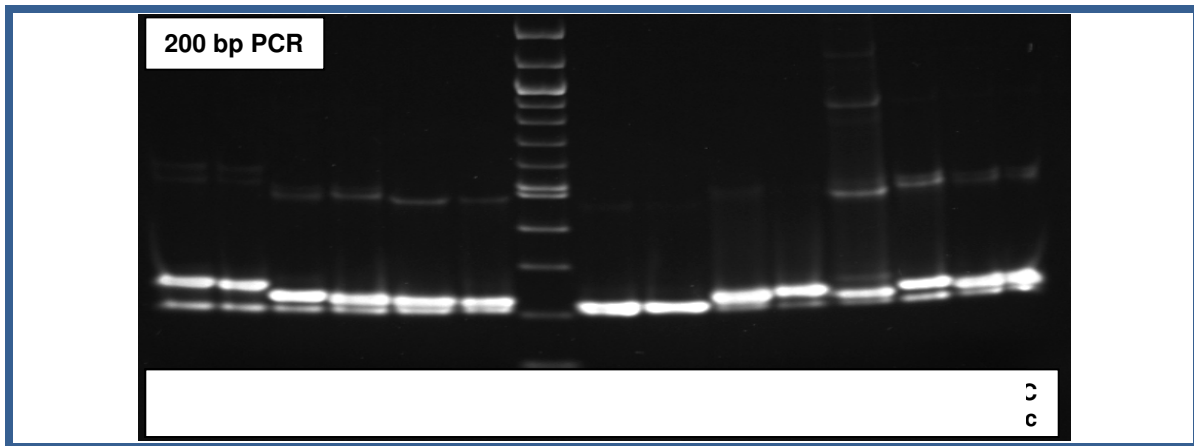


Abb. 4.51: 1,7 % Agarosegel 200 bp PCR: Links vom 100 bp Marker (M) sind die Produkte mit unterschiedlicher sticky-end Länge aufgetragen. Rechts davon wurde der GC-Gehalt variiert. Alle Produkte zeigen eine Bande bei ca. 200 bp, dies entspricht dem PCR-Produkt ohne sticky-end. Auch hier zeigt die Probe mit einem sticky-end aus 23x G multimere Banden.

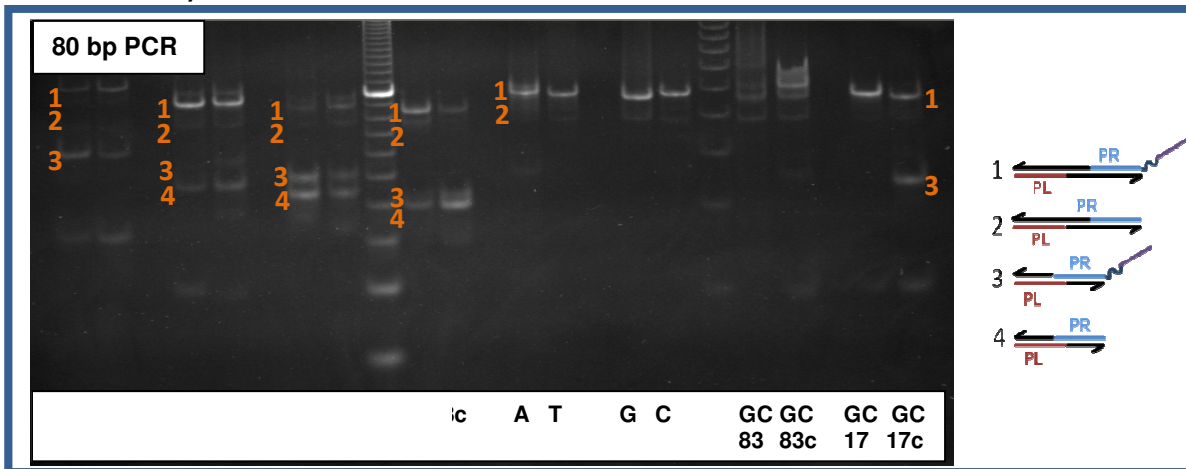


Abb. 4.52: 10 % PAGE nativ: 80 bp PCR. Hier sind Produktbanden mit und ohne sticky-end zu sehen (1, 2). Ebenso findet man Banden, die auf die Entstehung von Primerdimeren, ebenfalls mit und ohne sticky-end (3, 4), schließen lassen.

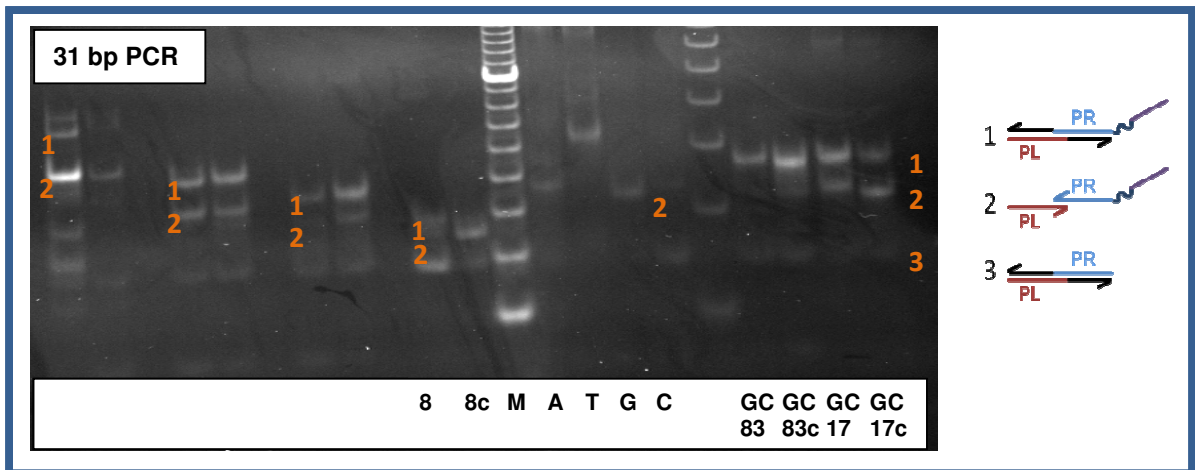


Abb. 4.53: 10 % PAGE nativ: 31 bp PCR. Neben der Produktbande (1) ist auch hier in allen Ansätzen das PCR ohne sticky-end (2) entstanden. Bei der Bande unterhalb der Produktbande (2) handelt es sich wahrscheinlich um nicht verlängerte Primerdimere.

Bei der PCR von 80 bp entstehen außerdem noch Primerdimere, die ebenfalls mit und ohne sticky-end zu finden sind. Die Primerdimere konnten durch einen PCR-Ansatz ohne Templat und durch denaturierende PAGE nachgewiesen werden. Die Entstehung von Primerdimeren kann eventuell durch die Hot-Start-Technik verhindert werden. Deshalb wurden bei der Amplifizierung von 80 bp mehrere Hot Start Methoden getestet. Beim Ansetzen einer PCR-Reaktionsmischung bei Raumtemperatur können sich Primerdimere bilden. Da die Primer nicht komplementär zueinander sind, beruht diese Primerdimerbildung auf einer unspezifischen Hybridisierung von 3–4 Basen. Gibt man nun die Polymerase bei Raumtemperatur zu, können diese Primerdimere verlängert werden. Durch Erhitzen der Probe bevor die Polymerase aktiv wird, sollte diese Primerdimerisierung verhindert werden. Eine Möglichkeit ist, die Polymerase erst bei 95 °C zuzugeben. Desweiteren ist die Verwendung einer Hot Start Polymerase möglich. In diesem Fall wird die Polymerase bei Raumtemperatur zugegeben. Diese ist jedoch durch einen Antikörper blockiert. Durch eine Inkubation von 30 s im ersten Schritt bei 98 °C wird dieser abgespalten und zerstört. Durch diese Methoden wird sichergestellt, dass die Polymerase erst aktiv wird, wenn die Probe vollständig denaturiert ist. Beim Primerannealing sollten nun die Primer spezifisch an den Templatstrang binden. Jedoch konnte auch durch Anwendung dieser Technik die Bildung von Primerdimeren nicht verhindert werden.

Ein weiteres Problem stellt die Aufarbeitung dar. Nach der PCR müssen nicht umgesetzte Primer, dNTPs und die Taq-Polymerase abgetrennt werden. Die quantitative Abtrennung der Primer spielt dabei eine entscheidende Rolle, da die Primersequenzen zu den gebildeten sticky-ends komplementär sind und somit zu Störungen der Hybridisierungsexperimente

führen. Typischerweise erfolgt die Aufarbeitung der PCR-Produkte durch Fällung mit speziellen Zusätzen (NucleoSpin, Roti[®]-PCR Clean). Diese sind jedoch nicht für Produkte unter 100 Basen geeignet und können somit nicht für die 80 bzw. 31 Basen PCRs angewendet werden. Eine mögliche Alternative stellt die Ultrafiltration dar. Es wurde eine vertikale Zentrifugenfiltereinheit mit einem MWCO von 50 kDa (Amicon Ultra, Millipore) verwendet. Diese bietet zumindest bei den 31 bp die Möglichkeit, die Taq-Polymerase mit $M \approx 90$ kDa abzutrennen, die verwendeten Primer bleiben jedoch zurück. Bei den 80 bp liegt das Molekulargewicht (≈ 52000 g/mol) zu nah an der cut off Grenze, um eine vollständige Abtrennung der Primer oder der Taq-Polymerase zu erreichen. Folglich kommt nur die Abtrennung durch präparative Gelelektrophorese in Betracht. Bei den 31 bp ist zudem noch die erzeugte Probenmenge sehr gering, da bei gleicher molarer Ausbeute nur etwa $0,3 \mu\text{g}$ in einem Ansatz erzeugt werden können. Aus diesen Gründen wurde bei den 31 bp auf die Amplifizierung durch PCR verzichtet. Alternativ wurden die entsprechenden Einzelstränge komplett an der Festphase synthetisiert.

Die PCR für 600 bzw. 200 bp verläuft problemlos, abgesehen von der Abspaltung der sticky-ends. Die Aufarbeitung der PCR-Ansätze erfolgte in diesen Fällen mit Roti[®]-PCR Clean. Dies beruht auf einer selektiven DNA-Fällung mit Ethanol, wobei die Fällungszusätze so optimiert sind, dass Moleküle < 100 bp in Lösung bleiben und somit abgetrennt werden können. Auffällig ist auch, dass die PCR-Produkte mit einem sticky-end aus einer Abfolge von 23xG multimere Banden zeigen. Diese Strukturen wurden mittels AFM untersucht (Abb. 4.54).

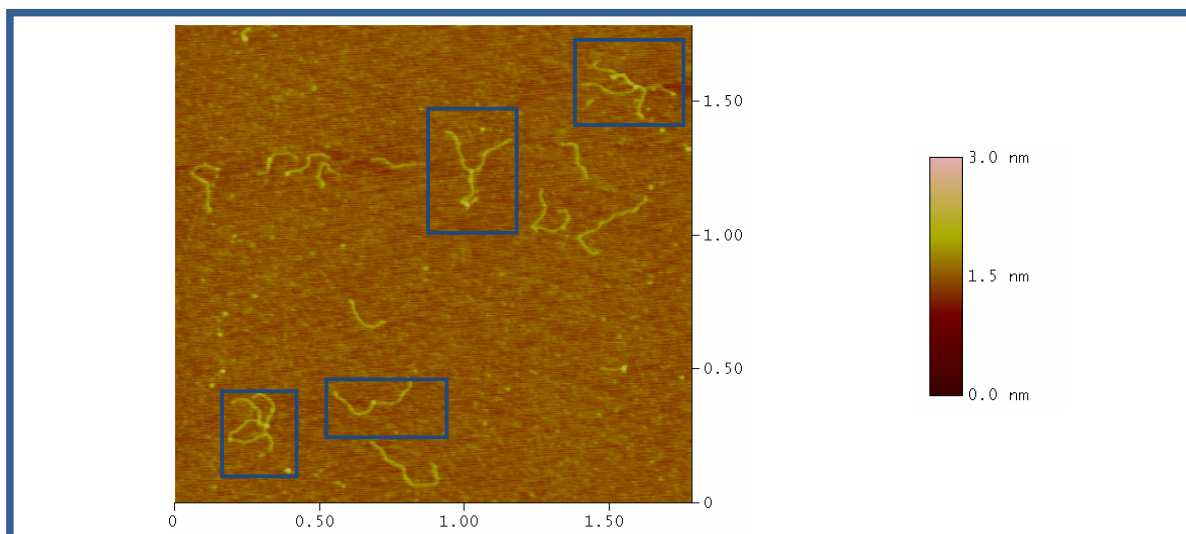


Abb. 4.54: AFM (Höhenbild, Tapping-Mode) des 600 bp PCR-Produktes mit einem sticky-end aus 23xG. Die Proben wird in einer Mg^{2+} -Lösung auf frisch gespaltenes Mica gegeben. Nach einer Absorptionszeit von 5- 10 min wird das Substrat mit Milli-Q-Wasser gespült und mit Stickstoff trockengeblasen.

Im AFM konnten sternartige Strukturen mit bis zu fünf Armen gefunden werden. Jeder Arm ist etwa 200 nm lang, was der erwarteten Länge für einen DNA-Strang aus 600 bp entspricht. Die DNA ist etwa 0,45 nm hoch, der Verknüpfungspunkt der einzelnen Stränge hat eine Höhe von ungefähr 0,74 nm.

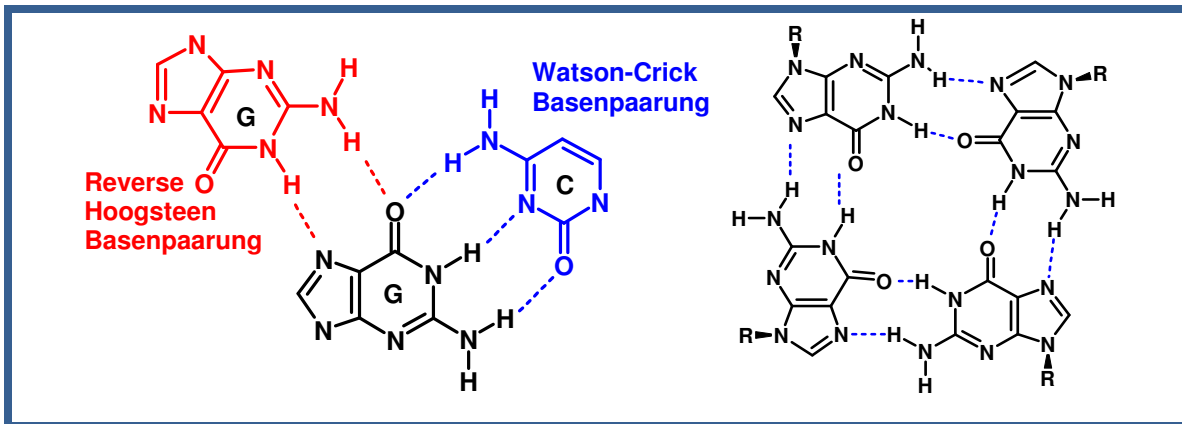


Abb. 4.55: Die Überhänge aus 23 x G können durch Bildung einer reversed Hoogsteen Basenpaarung oder Ausbildung eines G-Quartetts multimere Strukturen bilden.

Diese Strukturen können durch, die von der Watson-Crick Basenpaarung abweichende, Hoogsteen-Basenpaarung erklärt werden (Abb. 4.55). Bei der Hoogsteen Basenpaarung werden im Gegensatz zur Watson-Crick Basenpaarung nur zwei Wasserstoffbrücken ausgebildet. Die DNA ist durch die Hoogsteen Basenpaarung in der Lage Triplex-Stränge zu bilden, wobei der dritte Strang sich in der großen Furche des Doppelstrangs befindet. Auch die Bildung einer viersträngigen DNA ist möglich unter Ausbildung eines G-Quartetts [74, 155]. Da die Ausbildung dieser Strukturelemente eine intermolekulare Hybridisierung verhindern, können diese Produkte nicht zur Untersuchung der Hybridisierungseffizienz genutzt werden. Ebenso problematisch bei der Untersuchung der Hybridisierungseffizienz ist die Entstehung eines Produktes ohne sticky-end. In diesem Fall kann nicht mehr unterschieden werden, ob ein Teil der Probe nicht hybridisiert, oder von vornherein nicht hybridisierungsfähig war, weil kein sticky-end vorhanden ist. Besonders bei den 600 bp PCR-Produkten kann kaum zwischen diesen beiden Produkten unterschieden werden, da das Laufverhalten in der Gelelektrophorese zu ähnlich ist. Deshalb muss das Produkt ohne sticky-end quantitativ entfernt werden. Die Abtrennung durch präparative Gelelektrophorese ist im Falle der 200 und 600 bp- Produkte wegen des geringen Auflösungsvermögens in diesem Bereich nicht quantitative möglich. Deshalb wurde eine Methode entwickelt, die gewünschten Produkte selektiv aus der PCR-Lösung abzutrennen.

4.4.2 PCR mit biotinylierten Primern

Die Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung wird in den verschiedensten Methoden in der Biochemie, Immunologie und Molekularbiologie ausgenutzt. Die Biotin-Streptavidin-Bindung ist eine der stärksten bekannten nichtkovalenten biologischen Bindungen. Die Dissoziationskonstante liegt bei etwa $K_D = 4 \cdot 10^{-14} \text{ M}$ [156]. Die Spaltung dieser Bindung erforderte lange Zeit harte Bedingungen, wie die Behandlung mit Formamid bei 90 °C, was nicht nur die Denaturierung des Streptavidins zur Folge hat. Mittlerweile konnten jedoch Bedingungen gefunden werden unter denen die Bindung reversibel gebrochen werden kann [157]. Dies kann bei der Verwendung von Magnetic Beads ausgenutzt werden. Das Streptavidin ist auf der Oberfläche superparamagnetischer Polyvinylalkoholbeads (Chemagen, M-PVA-SAV2) gebunden. Diese können zur Separation von Biotin-markierten Molekülen genutzt werden. Aus diesem Grund wurden die rechten Primer am 5'-Ende des sticky-end mit Biotin markiert. Dies hat den Vorteil, dass an die Streptavidin-modifizierten Magnetic Beads nur Moleküle binden können, die das sticky-end tragen. Auch hier ist die Primerabtrennung von entscheidender Bedeutung, da alle Primer mit Biotin modifiziert sind und somit an die Magnetic Beads binden können. Die PCR-Lösungen wurden deshalb weiterhin zur Primerabtrennung mit Roti®-PCR-Clean aufgearbeitet.

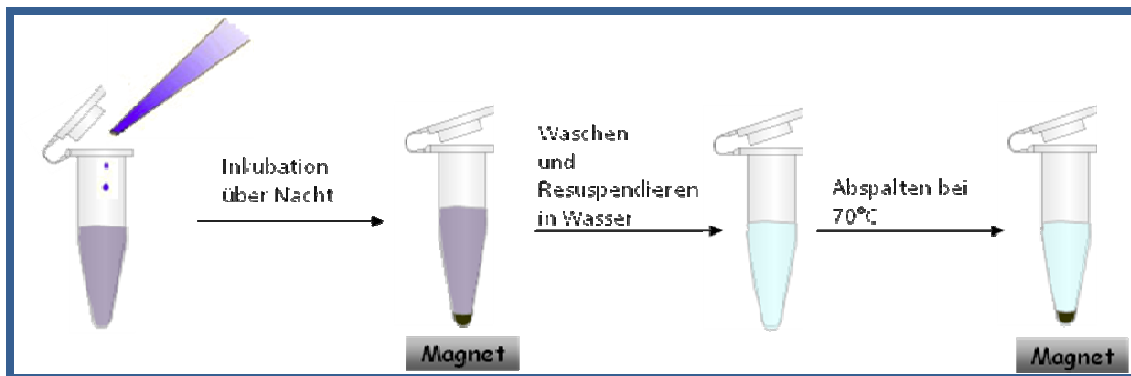


Abb. 4.56: Abtrennung der biotinylierten PCR-Produkte: Die Probe wird zur Suspension der Streptavidin-modifizierten Magnetic Beads gegeben. Nach Inkubation über Nacht werden die Nebenprodukte durch Waschen der Beads abgetrennt. Die gewünschten Produkte werden von den Beads reversibel durch Erhitzen auf 70 °C gespalten. Dadurch werden diese wieder in Lösung gebracht und separiert.

Anschließend werden die PCR-Produkte zu einer Suspension aus Streptavidin-modifizierten Magnetic Beads im Bindungspuffer (Anhang B) gegeben. Nach Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur werden die Magnetic Beads durch einen Magneten (NdFeB) am Gefäßboden gesammelt und die überstehende Lösung mit einer Pipette abgenommen. In dieser Lösung befinden sich nun alle Nebenprodukte der PCR, die nicht Biotin-markiert sind. Die Magnetic Beads werden mit TE-Puffer (10 mM Tris HCl pH 7,5; 1 mM EDTA) gewaschen. Dadurch werden alle Nebenprodukte abgetrennt. Schließlich werden die Magnetic Beads in Milli-Q-

Wasser resuspendiert und auf 70 °C erhitzt. So wird die Biotin-Streptavidin-Bindung reversibel gespalten. Die Beads werden bei 70 °C wieder durch den Magneten am Gefäßboden gesammelt und die überstehende Lösung, die nun die gewünschten PCR-Produkte enthält, wird dekantiert.

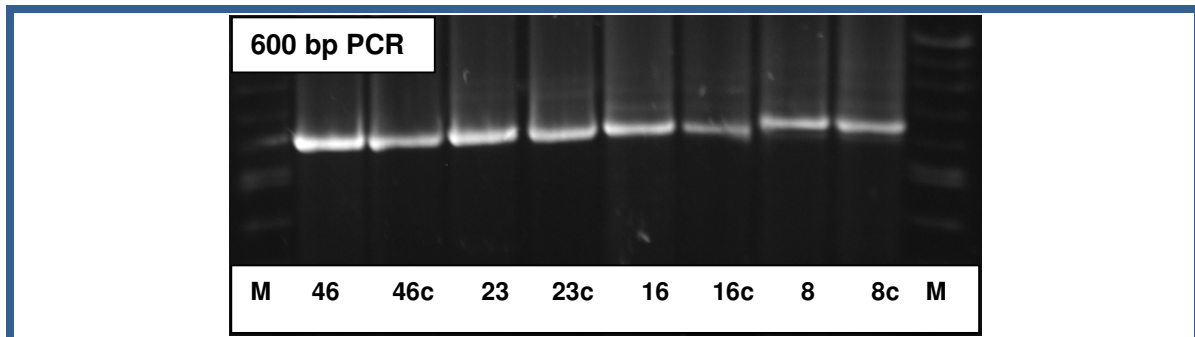


Abb. 4.57: 1,7 % Agarosegel der 600 bp PCR-Produkte nach Reinigung mit Magnetic Beads.

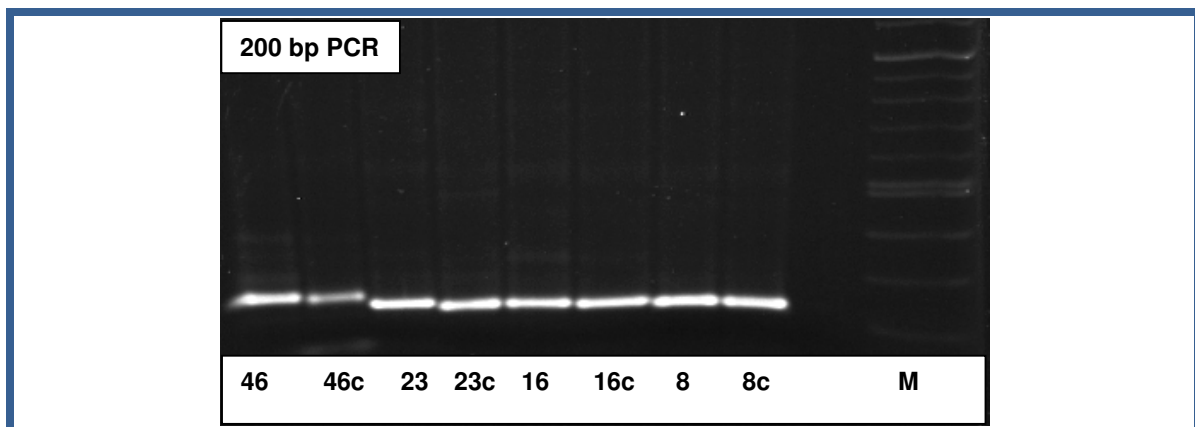


Abb. 4.58: 1,7 % Agarosegel der 200 bp PCR-Produkte nach Reinigung mit Magnetic Beads. Man erhält nun eine saubere Produktbande.

Die Gelbilder (Abb. 4.57; Abb. 4.58) zeigen, dass die Separation der PCR-Produkte von 200 und 600 bp mit sticky-end erfolgreich verläuft. Man erhält jeweils nur noch eine Produktbande.

4.4.3 Hybridisierungseffizienz in Abhängigkeit von Segment- und Linkerlänge

Durch PCR wurden verschieden lange DNA Doppelstränge amplifiziert und durch geeignete Primerwahl mit verschiedenen langen sticky-ends versehen. Die Verfügbarkeit der sticky-ends wurde durch biotinylierte Primer und deren spezifische Selektierbarkeit zu 100 % bzw. Reinigung über PAGE sichergestellt. Nun sollen die komplementären sticky-ends hybridisiert werden und damit die Hybridisierungseffizienz in Abhängigkeit von der sticky-end-Länge und in Abhängigkeit der Größe des Doppelstrangs quantifiziert werden. Die jeweiligen komplementären Paare wurden in 1xTAE/10 mM Mg²⁺ - Puffer langsam hybridisiert, anschließend eingefroren und langsam in Eiswasser aufgetaut. Die Agarosegele liefen im Eiswasserbad bei einer Temperatur von 5-12 °C, die PAGE bei 20 °C.

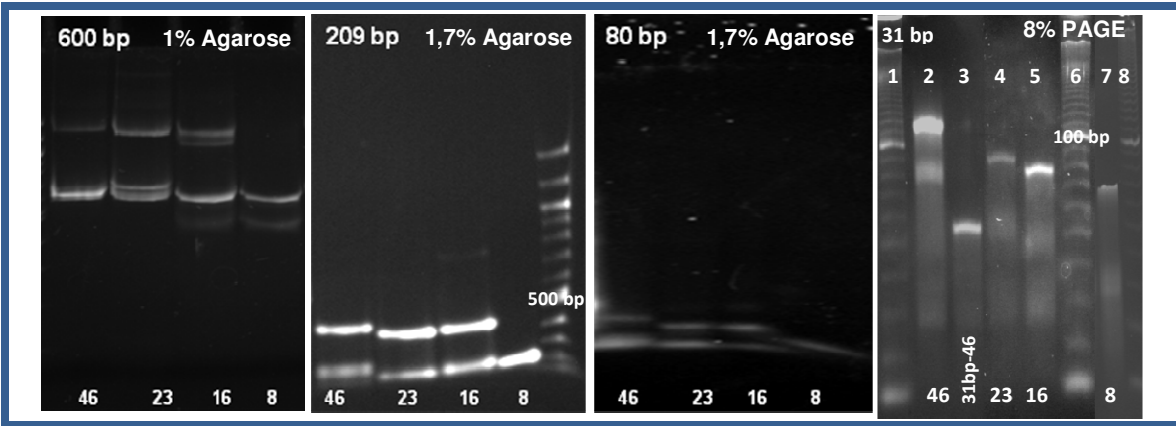


Abb. 4.59: Gelbilder der hybridisierten dsDNA-Fragmente (600, 209, 80, 31 bp) mit verschiedenen langen sticky-ends (46, 23, 16, 8). Im ersten Bild sind die Hybridisierungsergebnisse der 600 bp PCR-Produkte auf einem 1 % Agarosegel zu sehen. Die untere Bande entspricht dem nicht hybridisierten, die obere Bande dem hybridisierten Anteil. Das zweite Bild zeigt die 209 bp Hybridisierung, rechts außen ist der 100 bp-Marker aufgetragen und die Lage der 500 bp Bande markiert. Im dritten Bild sind die Hybridisierungsergebnisse der 80 bp PCR-Produkte auf einem 1,7 % Agarosegel zu sehen. Das vierte Bild stammt von einer 8 % PAGE und zeigt die hybridisierten 31 bp-Produkte. Auf den Spuren 1, 6, 8 ist jeweils der 10 bp Marker zu sehen, in Spur 6 wurde die Lage der 100 bp-Bande markiert. Auf Spur 3 ist zusätzlich das nichthybridisierte 31 bp Fragment mit einem sticky-end von 46 Basen gezeigt. Die Spuren 2, 4, 5 und 8 zeigen von links nach rechts die Hybridisierungen der 46, 23, 16 und 8 bp.

Man erkennt, dass die Hybridisierung bei den DNA-Fragmenten mit 31 bp annähernd quantitativ für alle sticky-ends gelingt. Bei den anderen Proben erkennt man eine Abhängigkeit der Hybridisierungseffektivität von der Länge der sticky-ends.

Tabelle 4.2: Die Gelbilder aus Abb. 4.59 wurden mit ScionImage analysiert. Der Anteil an hybridisierten sticky-ends ist für die jeweilige Länge des Doppelstrangfragments und die Länge des sticky-ends in der Tabelle angegeben:

dsDNA \ sticky-end	600	209	80	31
46	12%	51%	18%	~100%
23	29%	62%	37%	~100%
16	37%	53%	55%	~100%
8	0%	0%	0%	~100%

Durch die Analyse der Gelbilder mit ScionImage erhält man die in Tabelle 4.2 angegebenen Werte für den Anteil an hybridisierten sticky-ends. Dabei ist auf den ersten Blick kein eindeutiger Trend festzustellen. Trägt man die Hybridisierungseffizienzen gegen die sticky-end-Länge bzw. gegen die Länge des Doppelstrangs auf, erkennt man, dass die

Hybridisierung der 209 bp Stränge für alle sticky-end Längen vergleichsweise gut verläuft. Für die 80 und 600 bp Stränge ist die Hybridisierungseffizienz mit 16 b sticky-end am größten. Diese Ergebnisse sind nicht mit einem einzelnen Effekt erklärbar.

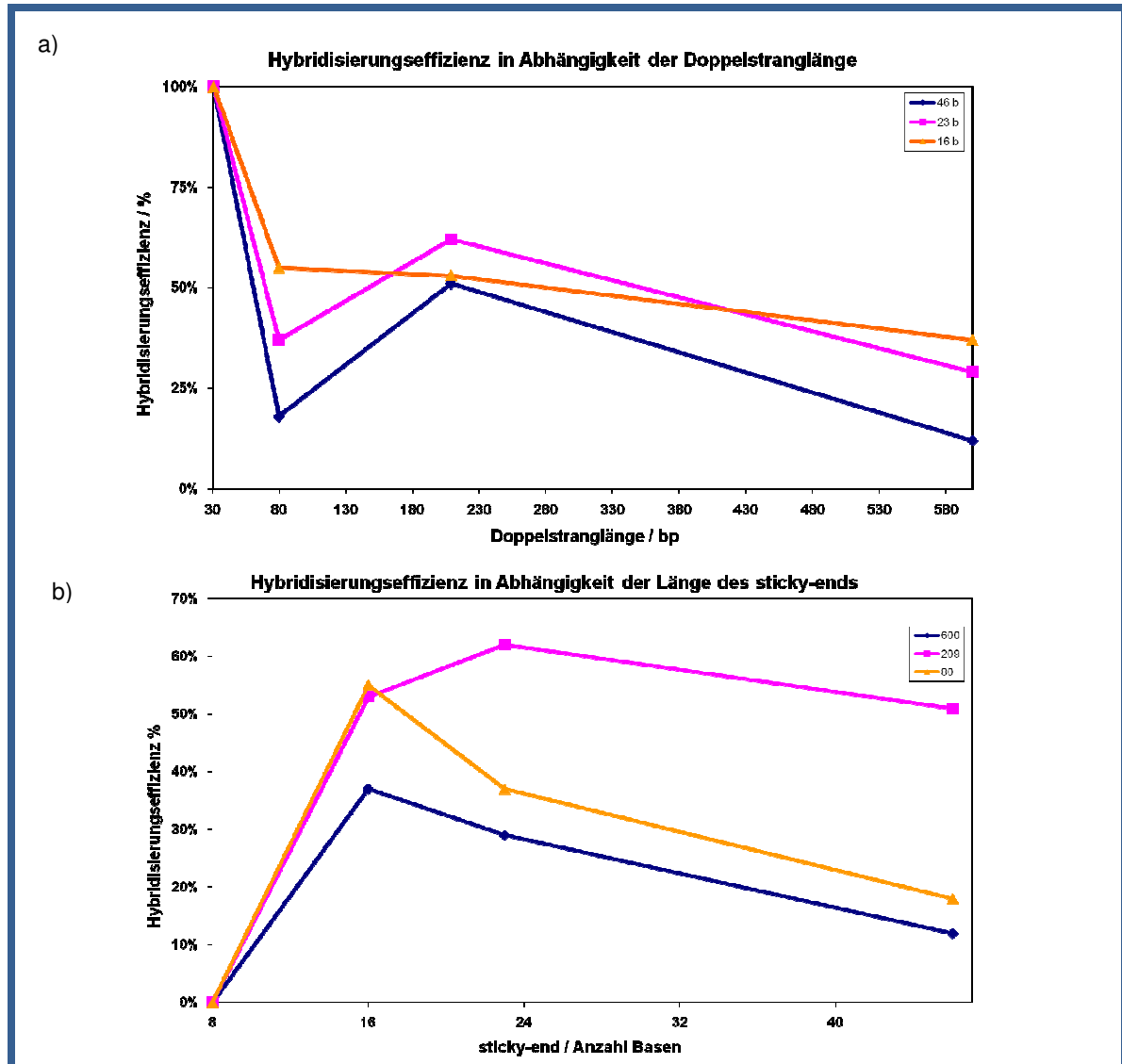


Abb. 4.60: Darstellung der Hybridisierungseffizienz in Abhängigkeit von a) der Länge der Doppelstränge und b) der sticky-end Länge

Für die Interpretation der Ergebnisse müssen im Wesentlichen drei verschiedene Faktoren berücksichtigt werden:

- Kinetik
- Intramolekulare Wechselwirkungen
- Stabilität der Verknüpfungsstelle

Kinetikstudien zur Hybridisierung mit Hilfe von immobilisierten Oligonukleotiden an der Quarzmikrowaage haben gezeigt, dass die Geschwindigkeit und die Lage des Gleichgewichts von der Temperatur, der Ionenstärke und der Kettenlänge der DNA abhängig sind [158].

Demnach ist eine Mindestsalzkonzentration zur Ausbildung eines stabilen Doppelstrangs erforderlich, so dass die Hybridisierung zu 100 % erfolgen kann. Bei der Untersuchung eines Dekamers ($T_M = 37,6 \text{ °C}$) hat sich gezeigt, dass sich das Gleichgewicht bei 30 °C innerhalb einer Minute einstellt, aber die Hybridisierung nur bei 10 % liegt. Die Hybridisierung bei 15 °C erfolgte vollständig, das Erreichen des Gleichgewichts dauerte jedoch 50 min. Bei der Hybridisierung der PCR-Produkte wurde eine Standard-Salzkonzentration von $12,5 \text{ mM Mg}^{2+}$ verwendet und die Hybridisierung erfolgte über Nacht, deshalb können diese beiden Faktoren ausgeschlossen werden. Beim Auftreten intramolekularer Wechselwirkungen, wie zum Beispiel der Ausbildung von Sekundärstrukturen oder Wechselwirkungen des sticky-ends mit dem Doppelstrang, ist eine Abhängigkeit der Hybridisierungseffizienz von der Länge des sticky-ends zu erwarten, da längere Sequenzen eher in der Lage sind solche Strukturen auszubilden als kurze. Da aber die Stabilität der gebildeten Struktur aufgrund der Schmelztemperatur für größere sticky-ends zunimmt, stehen in diesem Fall zwei Gleichgewichtsprozesse, die intra- und die intermolekulare Wechselwirkung, in Konkurrenz zueinander, für die eine gegenläufige Tendenz in Abhängigkeit von der Länge der sticky-ends zu erwarten ist.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Stabilität der Verknüpfungsstelle zur Hybridisierung großer Massen nicht ausreichend ist. Betrachtet man komplementäre Oligonukleotidpaare verschiedener Länge, so hybridisieren diese immer annähernd vollständig. Erst bei der Verknüpfung von Doppelstrangfragmenten über sticky-ends wird die Hybridisierung ineffizient. In diesem Fall könnte die Übertragung der thermischen Energie des Lösemittels auf die PCR-Produkte und die Diffusion der relativ großen DNA-Teilchen im Vergleich zur sticky-end-Länge dazu führen, dass durch die Trägheit der großen DNA-Teilchen, die Verknüpfungsstelle zu stark belastet wird und somit das Gleichgewicht auf Seiten der Einzelkomponenten liegt. In diesem Fall ist eine Abhängigkeit von der Länge des Doppelstrangs zu erwarten.

Betrachtet man nun die Ergebnisse der Hybridisierungsversuche, so kann zunächst festgestellt werden, dass eine Mindestlänge für das sticky-end zur Verknüpfung erforderlich ist. Der im letzten Abschnitt beschriebene Effekt ist dabei klar erkennbar. Die Hybridisierung des kurzen Doppelstrangfragments (31 bp) über das 8 Basen sticky-end ist in der Gelelektrophorese deutlich nachweisbar, erwies sich aber für längere Doppelstrangstücke als ungeeignet. Der GC-Gehalt für diese oktamere Sequenz wurde relativ hoch gewählt, so dass eine Schmelztemperatur von 36 °C zu erwarten wäre. Im Allgemeinen liegen komplementäre

Oligonukleotide ab einer Temperatur von 20 °C unterhalb des Schmelzpunktes vollständig in der Doppelstrangform vor. Die Elektrophorese der 80, 209 und 600 bp-Fragmente erfolgte bei ca. 10 °C, der Schmelzpunkt scheint dort also etwas erniedrigt zu sein. Bei den sticky-ends mit 16, 23 und 46 Basen ist die Abhängigkeit der Hybridisierungseffizienz von der Größe der dsDNA-Fragmente weniger stark ausgeprägt. Man erkennt aber die gleiche Tendenz (Abb. 4.60 a). Mit zunehmender Größe der dsDNA-Fragmente wird die Hybridisierungseffizienz kleiner. Geht man von einer Belastung der Verknüpfungsstelle durch die Trägheit der großen DNA-Teilchen aus, ist dieses Ergebnis auch zu erwarten, da der Effekt am stärksten ausgeprägt sein sollte, wenn man sich in einem Temperaturintervall knapp unterhalb des Schmelzpunktes befindet, da dort auch in den Schmelzkurven ein leichter Anstieg der Absorption aufgrund der Aufweitung der Basenstapelung zu beobachten ist.

Betrachtet man nun die Hybridisierungseffizienz in Abhängigkeit der sticky-end Länge (Abb. 4.60 b), erkennt man, dass die Hybridisierungseffizienz ein Maximum durchläuft. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die intramolekularen Wechselwirkungen anfangen in Konkurrenz zu den intermolekularen Wechselwirkungen zu treten. Bei den 31 bp-Fragmenten kann dieser Effekt nicht beobachtet werden. Offenbar spielt die Länge der sticky-ends erst ab einer kritischen Größe der dsDNA eine Rolle. Die 31 bp Fragmente hybridisieren zu annähernd 100 %, die 600 bp PCR - Produkte hybridisieren am schlechtesten. Dazwischen liegen die 80 bp und 209 bp Produkte.

Zudem muss beachtet werden, dass die Bandenanalyse aus Gelbildern mit Fehlern behaftet ist. Die Größe des Fehlers ist nur schwer abschätzbar und variiert von Gel zu Gel. Störende Einflüsse auf die Gelanalyse haben z.B. Staubpartikel im Gel und Schlieren, die durch das Anfärben zustande kommen und den Hintergrund überlagern. Deshalb soll eine Methode mit freier Kapillarelektrophorese entwickelt werden, wozu bereits erste Versuche durchgeführt wurden.

Zur weiteren Untersuchung der Hybridisierungseffizienz wurden Schmelzkurven aufgenommen [85, 86]. Dabei sollte es möglich sein, das Schmelzen des sticky-ends separat vom Doppelstrangfragment zu beobachten, wenn die Schmelzpunkte ausreichend weit auseinander liegen. Es wurde die Absorptionsänderung in Abhängigkeit der Temperatur im Intervall von 10-90 °C aufgezeichnet. Die Schmelzpunkte werden durch die Ermittlung des Anteils an gebrochenen Basenpaaren Θ_B in Abhängigkeit der Temperatur bestimmt (vgl. Abschnitt 3.2.2)

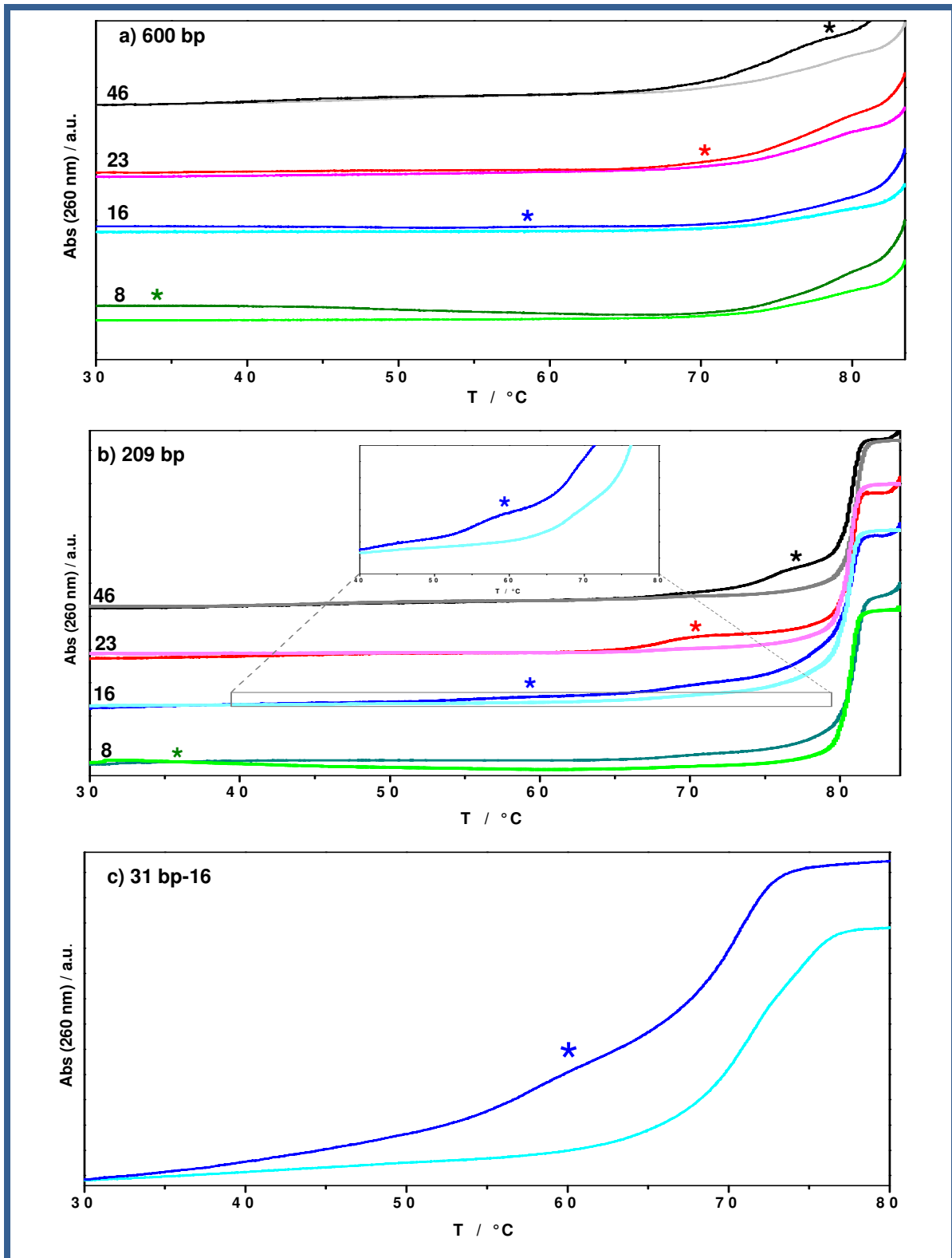


Abb. 4.61: Bestimmung der Schmelzpunkte durch temperaturabhängige Messung der UV-Absorption bei 260 nm in 1xTAE/Mg²⁺-Puffer. Dargestellt sind die Mittelwertkurven aus vier Heiz- & Kühlzyklen (Temperaturzyklus: 15 min bei 10 °C, mit 1 °C/min auf 90 °C, 20 min bei 90 °C, mit 1 °C/min auf 10 °C, 15 min bei 10 °C). Dargestellt sind für alle Messungen die Kurven vor (46: grau; 23: rosa; 16: türkis; 8: hellgrün) und nach der Hybridisierung (46: schwarz; 23: rot; 16: blau, 8: grün) der sticky-ends. Die theoretischen Schmelzpunkte sind durch die Lage der Sternchen (*) markiert. Die Schmelzkurven wurden für folgende Doppelstrangfragment gemessen: a) 600 bp; b) 209 bp; c) 31 bp.

In Abb. 4.61 sind die Schmelzkurven nach Doppelstranglänge geordnet aufgetragen. Zum Vergleich wurden bei allen Proben neben den Schmelzkurven der Hybridisierungsprodukte die der entsprechenden Doppelstränge mit freiem sticky-end aufgetragen.

Bei den 600 bp konnte die Schmelztemperatur des Doppelstrangfragments (theoretisch: 94 °C) mit dieser Apparatur nicht erreicht werden. Des Weiteren tritt nur bei dem 46 b sticky-end ein detektierbarer zweiter Übergang kurz unterhalb des theoretisch erwarteten Schmelzpunktes auf (Abb. 4.61 a). Bei allen anderen ist der beim Schmelzen der Verknüpfungsstelle gebildete Anteil an Einzelstrang offenbar zu klein, um detektiert zu werden (Der Anteil der 23 bp von 1223 bp beträgt 1,9 %). Die Auswertung des zweiten Übergangs der 46 bp liefert eine Schmelztemperatur von 72 °C. Betrachtet man allerdings die Schmelzkurven aller Hybridisierungsprodukte in Abb. 4.61 a) im Bereich von 70 - 80 °C, so zeigen diese einen ähnlichen Verlauf, was die Auswertung der 46 Basen eher fragwürdig erscheinen lässt. Wie es in den Kurvenverläufen der einzelnen PCR-Produkte beobachtet werden kann, ist offenbar in diesem Bereich das Schmelzen der Verknüpfungsstelle von einem partiellen Schmelzen des 600 bp-Fragments überlagert.

Bei den 209 bp-PCR Produkten wird dieses partielle Schmelzen nicht beobachtet (Abb. 4.61 b). In den Hybridisierungsprodukten mit 46 bzw. 23 bp kann man gut voneinander getrennt das Schmelzen der sticky-ends und des Doppelstrangs verfolgen. Im Falle von 16 bp ist der Übergang nur bei starker Vergrößerung zu erkennen. Die ermittelten Schmelztemperaturen sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst.

Tabelle 4.3: Vergleich der theoretisch errechneten Schmelzpunkte mit den über Schmelzkurven bestimmten für die verschiedenen sticky-end Längen des 209 bp PCR Produktes:

Sticky-end	T _m / °C (theoret.)	T _m / °C (gemessen)
46	78,0	74,6
23	70,1	67,3
16	59,2	56,0

Tabelle 4.4: Vergleich der gemessenen Schmelzpunkte der Doppelstrangfragmente mit den theoretischen Werten:

dsDNA	T _m / °C (theoret.)	T _m / °C (gem.)
600	94,3	>85
209	78,0	80,4
31	73,5	70,2

Die Schmelzpunkte der sticky-ends mit 46 bzw. 23 bp (78 bzw. 70 °C) liegen für die 31 bp Fragmente sehr nah am Schmelzpunkt des Doppelstrangs (31bp: $T_M = 73$ °C) und können deshalb nicht separat aufgelöst werden. Der zweite Übergang für die 16 bp ist erkennbar aber immer noch stark von dem Schmelzen der 31 bp überlagert (Abb. 4.61 c). Eine getrennte Auswertung ist deshalb auch hier schwierig, die Lage des zweiten Übergangs kann allerdings aus der Graphik auf etwa 57 °C abgeschätzt werden.

Die gemessenen Schmelzpunkte der sticky-ends, die zur Verknüpfung der unterschiedlichen dsDNA Fragmente eingesetzt wurden liegen im Fall des 209 bp Fragments nur unwesentlich niedriger als die berechneten Werte (Tabelle 4.3). Wenn die Stabilität der Verknüpfungsstelle herabgesetzt wäre, würde sich das in der Erniedrigung der Schmelztemperatur bemerkbar machen und somit in einer Verschiebung des Gleichgewichts zur Eduktseite resultieren. Den Schmelzpunktmessungen zu Folge hat die Verknüpfung großer Massen allerdings keinen Einfluss auf die Stabilität der Verknüpfungsstelle und somit sollte auch das Gleichgewicht noch auf der Seite der Produkte liegen. Dies bedeutet aber, wenn sich das Gleichgewicht aus irgendwelchen Gründen nicht einstellt, dann verhindern diese Effekte wahrscheinlich auch, dass sich die Lage des Gleichgewichts durch Überschuskomponenten verschieben lässt. Die Ergebnisse der Gelelektrophorese haben allerdings ganz klar gezeigt, dass die Größe der dsDNA-Fragmente einen Einfluss auf die Hybridisierungseffektivität hat. Zwei Fragmente mit jeweils 31 bp konnten über sticky-ends von 8, 16, 23 und 46 Basen annähernd quantitativ verknüpft werden. Sobald die Größe der dsDNA auf 80, 209 bzw. 600 bp erhöht wird, ist die Verknüpfung über die 8 bp nicht mehr möglich bzw. bei den thermisch stabileren Verknüpfungsstellen wird die Hybridisierungseffektivität deutlich herabgesetzt. Ein Vergleich mit dem Stand der Literatur ist in diesem Zusammenhang schwierig, da selten so große lineare Strukturen durch einfache Hybridisierung von sticky-ends aufgebaut werden. Zum Aufbau größerer Strukturen werden, wie bereits in der Einleitung erwähnt, meist „Double crossover“ Strukturen benutzt, die eine wesentlich steifere und stabilere Verknüpfungsstelle bieten, was besonders beim Aufbau dreidimensionaler Objekte wichtig ist.

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

5.1 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Hybridmaterialien aus synthetischen Polymeren und Oligonukleotiden hergestellt. Diese flexiblen Strukturelemente konnten erfolgreich zum Aufbau verschiedener alternierender Multiblockcopolymeren eingesetzt werden, wobei die Anzahl und die Art der Blöcke variiert wurden. Durch geeignete Wahl der DNA-Sequenzen konnte zusätzlich das Polymerisationsverhalten dieser Bauelemente untersucht werden. Die Integration kettensteifer Oligonukleotidabschnitte führte zur Darstellung eines mehrfach gebrochenen Stäbchens. Außerdem wurden mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR) semiflexible DNA-Abschnitte erzeugt. Durch die Wahl des Synthesewegs konnte sowohl die Länge der semiflexiblen Einheit als auch die Länge und die Sequenz des sticky-ends variiert werden. Anhand dieser Modellverbindungen wurde dann das Hybridisierungsverhalten in Abhängigkeit der Linker- und Segmentlängen untersucht.

Der effektivste Weg zur Darstellung von DNA-Polymer Hybriden basiert auf einer Kombination von festkörperunterstützter Blockkopplung und der Festphasensynthese des zweiten Oligonukleotids. Bei der festkörperunterstützten Blockkopplung wird ein NHS-funktionalisiertes Oligonukleotid mit einer Aminogruppe des synthetischen Polymers umgesetzt. Der Vorteil dieser Vorgehensweise ist, dass ein großer Überschuss des Polymers benutzt werden kann, was zu einer annähernd quantitativen Umsetzung der funktionalisierten DNA führt. Dieser Überschuss kann anschließend durch einfaches Waschen des Trägers sehr effektiv entfernt werden. Bei der Verwendung von α -Amino- ω -hydroxypolyethylenoxiden fand die Kopplungsreaktion selektiv an der Aminogruppe statt. Das so erhaltene Zweiblockcopolymer besitzt eine freie Hydroxygruppe, die als Startpunkt zur Synthese der zweiten Oligonukleotidsequenz dienen eingesetzt wurde. Anfangs lieferte die Synthese der zweiten Sequenz nur schlechte Ausbeuten, da ungewöhnlich viele Fehlsequenzen entstanden. Dieses Problem konnte allerdings auf das standardmäßig eingesetzte Triethylamin zurückgeführt und behoben werden. Dieser Syntheseweg führt nun zur annähernd quantitativen Umsetzung, wobei nur die aus der etwa 99%igen Kopplungsausbeute resultierenden Fehlsequenzen entstehen. Somit konnten

Dreiblockcopolymere aus monodispersen Oligoethylenoxiden mit $n = 12, 16, 32$ und einem engverteilten Polyethylenoxid ($M_w = 3400 \text{ g/mol}$) erfolgreich und in hohen Ausbeuten dargestellt werden.

Zur Übertragung dieses Verfahrens auf Polypropylenoxide wurden verschiedene Strategien entwickelt, um einen Syntheseweg ausgehend von α, ω -Diaminopolypropylenoxiden zu realisieren. Die Umsetzung des Diaminopolypropylenoxids mit NHS-funktionalisierter DNA auf Trägermaterialien unterschiedlicher Porengröße und Belegungsdichte führte zu Gemischen aus Zweiblockcopolymeren und symmetrischen Dreiblocken. Nach dem Abspalten vom Trägermaterial kann diese Mischung für eine erneute Kopplung mit einem zweiten festkörpergebundenen Oligonukleotid eingesetzt werden, da nur das Zweiblockcopolymer die erforderliche reaktive Gruppe trägt. Die Kopplungsreaktion liefert jedoch in wässrigen Medien deutlich schlechtere Ausbeuten. Eine weitere Möglichkeit ist das Einbringen des trägergebundenen Gemisches aus Zwei- und Dreiblockcopolymeren in die Festphasensynthese, um die zweite DNA-Sequenz an den noch freien Aminogruppen zu starten. Dabei stellte sich heraus, dass die Synthese an der Aminogruppe keine zufriedenstellenden Ausbeuten liefert. Dennoch konnte das resultierende Gemisch aus symmetrischen und asymmetrischen Dreiblockcopolymeren durch aufwendige präparative Maßnahmen getrennt werden. Zum Ziel führte schließlich die Synthese des 6-O-Dmt-hexansäure-NHS-Esters als Linkermolekül zur Einführung der Hydroxygruppe, zusammen mit dem einseitigen Schützen des Diaminopolypropylenoxids durch Trifluoracetat. Der NHS-Ester des Linkermoleküls kann quantitativ mit der freien Aminogruppe am PPO gekoppelt werden, wodurch man orthogonal geschütztes heterobifunktionelles PPO erhält. Durch die selektive Abspaltung der Tfa-Gruppe wird wieder eine Aminogruppe freigesetzt, die nun mit der trägergebundenen NHS-funktionalisierten DNA reagieren kann. Die Dimethoxytritylschutzgruppe bietet dabei den Vorteil, dass sie standardmäßig in der Oligonukleotidsynthese eingesetzt wird und deshalb ohne Probleme im ersten Schritt des Synthesizers freigesetzt wird. Somit steht wieder eine Hydroxygruppe als Ankerpunkt für die Synthese der zweiten Oligonukleotidsequenz zur Verfügung. Auf diesem Weg wurden Dreiblockcopolymere mit PPO ($M_w = 2000 \text{ g/mol}$) als synthetischem Block mit hervorragenden Ausbeuten dargestellt. Mit Hilfe des synthetisierten Linker-Moleküls sollte außerdem eine direkte Übertragung des vorgestellten Konzepts auf beliebige Diaminopolymere möglich sein, wodurch sich ein sehr effektiver Zugang zu den verschiedensten Dreiblockcopolymeren bietet. Im Unterschied zum bisherigen Stand der Wissenschaft hat die Synthese der asymmetrischen

Dreiblockcopolymere den Vorteil, dass man zwei selektiv adressierbare Enden erhält. Dadurch entsteht ein modulares System das zum gezielten Aufbau supramolekularer Strukturen genutzt werden kann, wobei prinzipiell keine Einschränkungen in Bezug auf Anzahl, Art und Reihenfolge der Blöcke bestehen.

Aus den synthetisierten asymmetrischen Dreiblockcopolymeren konnten verschiedene alternierende Multiblockcopolymere aufgebaut werden, wobei die Anzahl der Blöcke und der Anteil an Polyethylenoxid bzw. Polypropylenoxid variiert wurde. Die Darstellung eines Multiblockcopolymeren aus 15 Blöcken, mit einem PEO/PPO-Verhältnis von 4:3 gelang mit einer Ausbeute von 40 %. Die Umsetzung zu einer linearen Struktur der Form $ssA^1-B-A^2-C-A^3-B-A^4-C-A^5-B-ssA^6$ aus 11 Blöcken mit einem PEO/PPO-Verhältnis von 3:2 verlief sogar annähernd quantitativ. Derartige Strukturen sind auf der Grundlage chemischer Synthesen unerreichbar. Die dazu verwendeten Dreiblockcopolymere wurden aus monodispersen Polyethylenoxid ($n = 16$) bzw. Polypropylenoxid ($M_w = 2000 \text{ g/mol}$) aufgebaut. Die Flexibilität dieses modularen Systems konnte gezeigt werden, indem einzelne Blockbausteine zur Strukturaufklärung einfach ausgetauscht oder weggelassen werden konnten. In diesem Zusammenhang wurde festgestellt, dass die LCST des verwendeten Polypropylenoxids in den Dreiblockcopolymeren höher ist als in der freien Form und somit bei Raumtemperatur noch keinen Einfluss auf die Strukturbildung nimmt. Dadurch können in zukünftigen Arbeiten gezielt Untersuchungen zur Strukturbildung bei Temperaturerhöhung durchgeführt werden. Eventuell ist hierfür eine Erhöhung der thermischen Stabilität der dsDNA-Abschnitte durch kovalente Verknüpfung mit Psoralen erforderlich.

Die Dreiblockcopolymere wurden auch zur Darstellung reversibler Polymere genutzt. Es wurden asymmetrische Dreiblockcopolymere mit unterschiedlich langen, paarweise komplementären Sequenzen zur Polymerisation benutzt. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die Proben bei ausreichender Stabilität der Verknüpfungsstelle zwar bis in den hochmolekularen Bereich polymerisieren, jedoch etwa die Hälfte der Moleküle bevorzugt in einer dimeren bzw. pentameren Struktur vorliegen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die biosynthetischen Dreiblockcopolymere nicht nur zur Darstellung von Multiblockcopolymeren sondern auch als Linkermoleküle zur zwischen kettensteifen dsDNA-Blöcke genutzt. Durch die Verwendung teilkomplementärer Oligonukleotide erhält man beliebige Doppelstrangfragmente bis zu einer Größe von etwa 100 bp, bei denen sowohl die Länge als auch die Sequenz der sticky-ends frei variiert werden kann. Nach diesem Konzept wurde ein Nonamer als Modellsystem eines mehrfach

gebrochenen Stäbchens synthetisiert. Die vollständige Nonamer-Struktur besteht aus fünf kettensteifen dsDNA-Abschnitten von jeweils 108 bp, die an vier Stellen über monodisperses Oligoethylenoxid ($n=16$) verbunden sind. Die sticky-end Länge beträgt 23 Basen, was zu einer bei Raumtemperatur stabilen Verknüpfung führt. Insgesamt ist die Struktur aus 14 Einzelsträngen aufgebaut. Bei der äquimolaren Mischung der 14 gereinigten Stränge entsteht durch die Hybridisierung ein Gemisch bestehend aus der Zielstruktur und vier Unterstrukturen, wobei der Anteil an Zielstruktur etwa 10 % beträgt. Durch unterschiedliche Hybridisierungsexperimente hat sich gezeigt, dass die verschiedenen Unterstrukturen aus jeweils zwei Doppelsträngen, die über ein Dreiblockcopolymer verlinkt sind, eine besonders hohe Stabilität aufweisen. Alle Kombinationen von dsDNA-Pärchen des Nonamers konnten annähernd quantitativ erzeugt werden. Deshalb wurde der Syntheseweg so modifiziert, dass die Stabilität dieses Strukturelements ausgenutzt werden kann. Durch die Kombination der beiden Randpärchen mit dem Mittelstück konnte die Ausbeute um etwa 50% erhöht und die Zahl der gebildeten Unterstrukturen halbiert werden. Auf diesem Weg wurde die vollständige Nonamer-Struktur mit einer Ausbeute von 16 % erzeugt.

Da die DNA aufgrund ihrer Persistenzlänge von 50 nm erst ab einer Länge größer 150 bp einen semiflexiblen Charakter aufweist, können semiflexible Strukturelemente nicht durch Festphasensynthese erzeugt werden. Zur Darstellung längerer DNA-Fragmente muss auf molekulargenetische Methoden wie die PCR zurückgegriffen werden. In unserer Arbeitsgruppe wurde eine Methode entwickelt, die es erlaubt durch die Verwendung von Dreiblockcopolymeren als Primer, PCR-Produkte mit sticky-ends zu erzeugen und gleichzeitig ein synthetisches Polymer zu integrieren. Diese Methode wurde genutzt, um Doppelstrangfragmente von 31, 80, 209 und 600 bp zu synthetisieren. Durch geeignete Primerwahl wurden alle PCR-Produkte mit unterschiedlich langen sticky-ends (8, 16, 23, 46 Basen) versehen, die über ein Oligoethylenoxid ($n=6$) mit der DNA verknüpft sind. Ein Problem dieser Methode bestand darin, dass neben den PCR-Produkten mit sticky-end immer ein Teil ohne sticky-end zu finden war. Dieser Anteil kann nicht zur Strukturbildung beitragen und verhindert das Ansetzen stöchiometrischer Mischungen. Besonders bei langen DNA-Fragmenten mit kurzen sticky-ends ist das Laufverhalten in der Gelelektrophorese so ähnlich, dass diese praktisch nicht mehr unterscheidbar sind. Aus diesem Grund ist auch die Abtrennung durch präparative Gelelektrophorese nicht mehr möglich. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Methode entwickelt werden, die PCR-Produkte ohne sticky-ends

abzutrennen. Durch die Modifizierung der Primer mit Biotin am 5'-Ende des Sequenzabschnitts, der als sticky-end dient, kann die starke Biotin-Streptavidin Bindung mit Hilfe von Magnetic Beads zur Selektierung genutzt werden. Durch die Biotin-Modifizierung der Primer am 5'-Ende der sticky-end Sequenz ist sichergestellt, dass nur Moleküle binden können, die das sticky-end tragen. Mit dieser Methode erhält man sehr effizient zu 100 % hybridisierungsfähige semiflexible Strukturelemente. Durch die Synthese von PCR-Produkten mit komplementären sticky-ends auf einer Seite des PCR-Produkts, können diese zu symmetrischen Strukturen hybridisiert werden, die aus zwei semiflexiblen Einheiten, zwei synthetischen Polymeren und einer kettensteifen Einheit in der Mitte bestehen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden solche Strukturen als Modellsysteme synthetisiert, zur Untersuchung der Hybridisierungseffizienz in Abhängigkeit von der Segment- und Linkerlänge. Bei diesen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die Hybridisierungseffizienz mit zunehmender Größe der dsDNA-Fragmente abnimmt. Betrachtet man die Hybridisierungseffizienz in Abhängigkeit der sticky-end Länge, so wird ein Maximum durchlaufen, was durch die gegenläufigen Effekte der wachsenden Stabilität und der intramolekularen Strukturbildung mit steigender sticky-end Länge erklärt werden kann. Durch die Messung von Schmelzkurven an diesen Modellsystemen wurde klar, dass sich die Stabilität der Verknüpfungsstelle durch das Verbinden großer Massen nicht ändert und somit der Effekt der unvollständigen Hybridisierung nicht aus einem Gleichgewichtsproblem resultiert. Die vorliegende Arbeit zeigt also sehr deutlich, dass es neben dem Schmelzpunkt von DNA-Sequenzen und der richtigen Stöchiometrie andere Effekte gibt, die Einfluss auf die Hybridisierungseffizienz ausüben. Die Doppelstrangbildung in komplexen Systemen erfolgt weniger effektiv, als man es aufgrund der Hybridisierung von Oligonukleotiden erwarten würde.

Schließlich wurde gezeigt, dass das hier verwirklichte modulare System zum Aufbau komplexer Strukturen geeignet ist, die mit den klassischen chemischen Synthesemethoden nicht zugänglich sind, auch wenn die Hybridisierungseffektivitäten von diffizileren Zusammenhängen beeinflusst wird, als man es aufgrund der Doppelstrangbildung von Oligonukleotiden erwarten würde.

In weiteren Studien ist es nun leicht durch die Flexibilität des entwickelten modularen Systems, die verschiedenen molekularen Parameter zu variieren und deren Einfluss auf die Eigenschaften komplexer Multiblockcopolymerstrukturen zu untersuchen. Die Synthese und die Verknüpfung der verschiedenen Strukturelemente waren mit unterschiedlichen

Ausbeuten erfolgreich. Die Isolierung der gebildeten Strukturen ist durch präparative Gelelektrophorese möglich. Die einzelnen Bausteine können in ausreichender Menge dargestellt und je nach Art über die verschiedenen Methoden (Continuous Elution Electrophoresis, präparative Elektrophorese bzw. Magnetic Beads) auch aufgereinigt werden.

5.2 Ausblick

Zur Untersuchung der Strukturbildung sollte die Dreiblockcopolymersynthese auf größere Polypropylenoxide und Polyethylenoxide bzw. auf andere Polymere mit thermoresponsiven, hydrophoben oder hydrophilen Eigenschaften ausgedehnt werden. Dies sollte aufgrund des dargestellten Linkermoleküls (6-O-Dmt-hexansäure-NHS-Ester) ausgehend von Diaminopolymeren relativ einfach realisierbar sein. Beim dargestellten Multiblockcopolymer aus alternierenden PEO- und PPO- Einheiten sollte ein temperaturinduzierter Kollaps des Polypropylenoxids aufgrund der LCST beobachtbar sein, der zu einer verminderten Flexibilität bzw. zu einer Kompaktierung des Moleküls führt. In Abb. 5.1 sind zwei Strukturen dargestellt, die in diesem Zusammenhang auftreten können, natürlich sind auch Zwischenstufen denkbar.

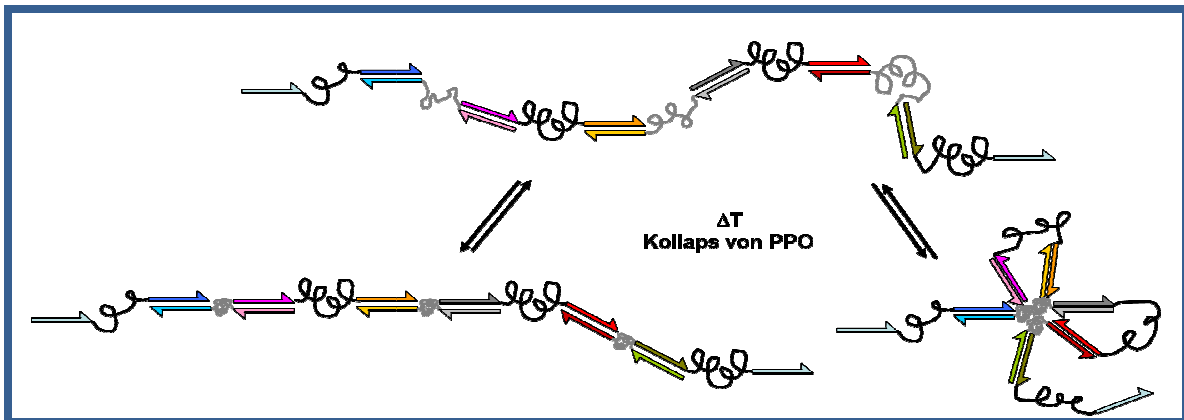


Abb. 5.1: Durch das Kollabieren des Polypropylenoxids (grau) im Multiblockcopolymer wird eine Verminderung der Flexibilität (links), bzw. Kompaktierung (rechts) der Struktur verursacht.

Durch die Verwendung verschieden großer Polypropylenoxide sollten diese Zwischenstufen auch direkt darstellbar sein, da dann der Kollaps bei unterschiedlichen Temperaturen stattfindet.

Eine weitere Möglichkeit für eine temperaturinduzierte Strukturänderung ist die Anlagerung eines komplementären Strangs an eine kovalente ssDNA-Polymer-Hybridstruktur. Ein entsprechendes Strukturelement kann durch die Ligation zweier Dreiblockcopolymeren erhalten werden. Durch die Kombination von Blockkopplung und Festphasensynthese bei der Darstellung der Dreiblockcopolymeren erhält man eine parallele Orientierung der Oligonukleotide. Dadurch entsteht die Möglichkeit zwei Dreiblockcopolymeren durch Hybridisierung an einem entsprechenden Gegenstrang und mit anschließender Ligation kovalent zu verknüpfen (Abb. 5.2). Somit erhält man Multiblockcopolymeren, die bei hoher Temperatur Blöcke aus flexibler ssDNA enthalten. Durch das Abkühlen in Gegenwart des

entsprechenden komplementären Strangs geht die flexible ssDNA in eine stäbchenförmige dsDNA über.

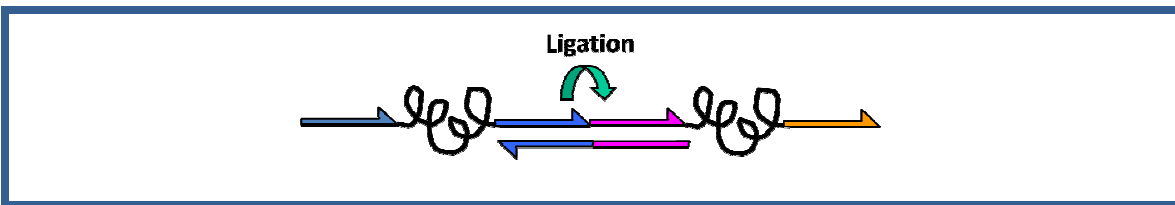


Abb. 5.2: Durch Hybridisierung an einen komplementären Strang können Dreiblockcopolymere durch Ligation kovalent miteinander verknüpft werden.

Die intra- bzw. intermolekulare Strukturbildung kann mit Methoden wie AFM, (Cryo-) TEM oder Lichtstreuung beobachtet werden. Erste Versuche zur Untersuchung des Multiblockcopolymers mittels Lichtstreuung wurden bereits durchgeführt. Das Problem dabei stellten Verunreinigungen in der Probe dar, die sich durch einfache Filtration nicht entfernen lassen. Der Ursprung dieser Verunreinigungen ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Eventuell handelt es sich hierbei um Polymerpartikel aus der präparativen PAGE oder der Gelfiltration über Sephadex™-Säulen. Es gibt aber auch Hinweise, dass es sich um Abrieb des CPGs aus der Oligonukleotidsynthese handeln könnte.

Ein weiteres Problem stellte die unvollständige Hybridisierung dar. Die Synthesen und Reinigungsmethoden wurden zwar soweit optimiert, dass der für DNA große Maßstab im Milligramm-Bereich zugänglich ist, allerdings sind Oligonukleotide auch recht kostenintensiv, weshalb eine vollständige Hybridisierung wünschenswert wäre. Eine Möglichkeit zur Erhöhung der Hybridisierungseffizienz wäre eventuell eine stabile Verknüpfungsstelle zu benutzen. Dies kann zum einen durch Ligation von kürzeren DNA-Fragmenten geschehen, da durch die Ligation der Schmelzpunkt innerhalb der Struktur erhöht wird. Zum anderen können die beiden Stränge der dsDNA durch crosslinking mit Hilfe von Psoralen kovalent verknüpft werden, wodurch ebenfalls die thermische Stabilität erhöht wird. Eine weitere Möglichkeit ist direkt, durch die Verwendung stabilerer Struktur motive die Stabilität der Verknüpfungsstelle zu erhöhen. Beim Aufbau dreidimensionaler DNA-Strukturen hat sich die Integration von Verzweigungspunkte bewährt. Dabei erwies sich die Holliday-Junction als zu flexibel, weshalb man zur Verwendung der stabileren „double crossover“ Verbindung übergegangen ist. Zur Realisierung dieser double crossover Strukturen muss zwischen zwei Kreuzungspunkten ein Vielfaches einer halben Helixwindung (d.h. $n \cdot 5$ bp) liegen, folglich sind die 23 Basen der Dreiblockcopolymere schon ausreichend zur Verknüpfung dieser Art. In Abb. 5.3 ist ein Beispiel zur Verknüpfung von Dreiblockcopolymeren mittels double crossover Motiven mit antiparalleler Orientierung gezeigt.



Abb. 5.3: Verknüpfung von Dreiblockcopolymeren über double crossover Strukturen. Zwischen den Kreuzungspunkten muss ein Vielfaches einer halben Helixwindung liegen.

Die Hybridisierungseffektivität wurde in dieser Arbeit mit Hilfe der Gelelektrophorese ermittelt. Durch die ungleichmäßige Fluoreszenz des Hintergrundes ist diese Methode relativ ungenau und hängt stark von der Qualität des individuellen Gels bzw. der Bandenschärfe ab. Als Alternative bietet sich hier die Verwendung der Kapillarelektrophorese an. Die UV-Detektion ermöglicht eine exaktere Quantifizierung. Ebenso ist die zur Analyse benötigte Trennzeite erheblich kürzer. Eine Methode zur Analyse der Dreiblockcopolymeren, die nur ssDNA enthalten, wurde bereits entwickelt. Dadurch konnte der Umsatz an NHS-funktionalisierter DNA und der Anteil an nicht funktionalisierter DNA ermittelt werden, ebenso war die Trennung von Zweiblock- und Dreiblockcopolymeren erfolgreich. Die Trennung erfolgte hier an negativ geladenen Silica-Kapillaren. Bei der Analyse von Doppelstrangfragmenten hat sich das zur Stabilisierung des Doppelstrangs verwendete Mg^{2+} im Puffer als vermindert auf die Trennleistung dieser Kapillaren herausgestellt. Es wurden bereits verschiedene Puffersysteme und Pufferkonzentrationen getestet. Am sinnvollsten erscheint jedoch die Entwicklung einer neuen Methode an ungeladenen Säulenmaterialien.

6 EXPERIMENTELLER TEIL

6.1 Lösungsmittel und Chemikalien

Standardchemikalien wurden von den Firmen Acros, Carl Roth GmbH, Fluka, Fischer Scientific, Merck, Riedel-deHaën und Sigma-Aldrich in p.a.- bzw. „for Molecular Biologie“ -Qualität bezogen. Sofern nicht explizit angegeben, wurden diese Substanzen ohne weitere Aufarbeitung verwendet.

6.1.1 Reinigung von Reagenzien und Lösungsmitteln

Triethylamin, Dichlormethan, Trifluoressigsäureethylester:

Zur Trocknung werden die Lösemittel mit CaH_2 versetzt und etwa 2 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösemittel unter Argon abdestilliert.

6.1.2 Flash-Säulenchromatographie

Zur Flash Säulenchromatographie wird Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm, Merck) verwendet. Die Säulen werden trocken gepackt und mit Seesand überschichtet. Anschließend wird bis zum Ausheilen des Kieselgels das Laufmittel mit Stickstoff 4.0 (Überdruck ca. 1 bar) durchgedrückt. Die Kieselgelhöhe beträgt etwa 25 cm. Der Säulendurchmesser variiert je nach aufzureinigender Menge zwischen. Die Probe wird in wenig Laufmittel aufgetragen und unter Stickstoff mit dem Laufmittel fraktioniert.

6.2 Synthese von Dreiblockcopolymeren

6.2.1 Darstellung der DNA¹-PEO-DNA²-Dreiblockcopolymeren

Die verwendeten Oligonukleotide (ODN) wurden von der Firma Biomers (Ulm, Deutschland) über Festphasensynthese hergestellt. Die Synthese erfolgt auf inertem Trägermaterial (CPG: Controlled Pore Glass) mit Porengrößen von 500 und 2000 Å. Die Beladungsdichte beträgt 25-35 $\mu\text{mol/g}$ (500 Å CPG), bzw. 10-15 $\mu\text{mol/g}$ (2000 Å CPG). Die zur Kopplung verwendeten Sequenzen bestehen aus 23 Basen und werden mit 10-Carboxy-decyl-(2-cyanoethyl)-(N, N-diisopropyl)-phosphoramidite, N-hydroxysuccinimide ester (Carboxy Modifier C10, Glen Research Corp) modifiziert. Es wurden monodisperse α -Amino- ω -oligoethylenoxide mit $n=12, 16, 32$ verwendet. Diese wurden im Rahmen meiner Diplomarbeit synthetisiert [49].

Desweiteren wurde ein α -Amino- ω -polyethylenoxid der Firma Sunbright (HO-034PA, NOF Corporation, $M_w = 3400$ g/mol, PD = 1,028) verwendet. Zur Kopplung werden die ODN vollständig geschützt auf dem Träger belassen. Der Träger wird zunächst mit Diethylether gewaschen. Dadurch wird das Pulver trocken und lässt sich einfacher in das Reaktionsgefäß überführen. Etwa 1 mg der DNA wird für die Überprüfung mittels Gelelektrophorese zurückbehalten. Die Kopplung mit den α -Amino- ω -polyethylenoxid erfolgt in trockenem Dichlormethan. Dazu wird das trägergebundene ODN mit 1 ml einer Lösung des PEO von 70 mM in Dichlormethan versetzt. Die Kopplung erfolgt bei Raumtemperatur über Nacht. Die optimale Durchmischung wird durch die Verwendung eines Drehmotors erreicht. Anschließend wird die Reaktionslösung dekantiert. Der verbleibende Träger wird dreimal mit 1 ml Dichlormethan und einmal mit 1 ml Diethylether gewaschen. Zur Überprüfung der Kopplung wird wieder etwa 1mg des Trägers zurückbehalten. Das restliche Trägermaterial wird zur Festphasensynthese der zweiten Oligonukleotidsequenz an die Firma Biomers geschickt.

6.2.2 Darstellung der DNA¹-PPO-DNA²-Dreiblockcopolymeren

Die verwendeten Diaminopolypropylenoxide ($M_w = 2000$ g/mol; 4000 g/mol) wurden von Aldrich bezogen. Die Synthese α -Amino- ω -polypropylenoxide wird im Abschnitt 5.3 beschrieben. Die erste Kopplung mit dem NHS-modifizierten ODN erfolgt analog zur Kopplung mit PEO. Die Kopplung der zweiten Sequenz findet in $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer +20 % DMF statt. Die Synthese der zweiten Sequenz an der Festphase wird von der Firma Biomers durchgeführt.

6.2.3 Abspalten der DNA vom Träger

Zum Abspalten der DNA vom Trägermaterial wird dieses mit 2 ml einer 28%igen Ammoniaklösung versetzt. Das Gemisch wird über Nacht bei 45 °C im Heizschrank inkubiert. Dadurch werden außerdem die DNA-Schutzgruppen abgespalten. Anschließend wird der Überstand isoliert. Der Träger wird solange mit destilliertem Wasser gewaschen, bis er nicht mehr nach Ammoniak riecht. Die wässrigen Phasen werden vereinigt und zum Abdampfen des Ammoniaks in eine Vakuumzentrifuge bei 60 °C gestellt.

6.2.4 Reinigung von DNA

Entsalzen der Oligonukleotidlösung über Gelfiltration:

Die Gelsäule (NAP-5, GE Healthcare) wird mit 10 ml Elutionspuffer gespült. Sobald der Elutionspuffer vollständig in das Gelbett eingedrungen ist, können maximal 0,5 ml Probe aufgetragen werden. Nach dem vollständigen Einsinken der Probe wird mit Puffer eluiert und mit der Fraktionierung begonnen. Das gereinigte Oligonukleotid befindet sich im ersten Milliliter. Die Ausbeute der Gelfiltration liegt deutlich oberhalb von 90 %. Mit dieser Methode können auch die Schutzgruppen aus der DNA-Abspaltung vom Träger entfernt werden.

Abtrennen von Fehlsequenzen durch präparative PAGE

Für die präparative PAGE können dieselben Bedingungen wie für analytische Gele eingesetzt werden. Die maximale Probenmenge liegt bei 280 µg pro Gel. Zur Rückgewinnung der DNA aus dem Gel, werden die Banden auf dem UV-Tisch ausgeschnitten, in kleine Stücke zerteilt und über Nacht mit Elutionspuffer (500 mM NH₄OAc / 10 mM Mg(OAc)₂ / 2 mM EDTA) bei RT extrahiert. Anschließend wird der Puffer abgenommen und mit jeweils 800 µl n-Butanol extrahiert, bis das Volumen der wässrigen Phase auf ca. 100 µl reduziert ist. Die Lösung wird mit 1 ml absolutem Ethanol versetzt und 1-2 h auf Trockeneis oder über Nacht bei -20 °C gefällt. Durch Zentrifugation (30 min bei 13000 rpm im Standardrotor für 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße) wird die DNA pelletiert. Die überstehende Lösung wird abgenommen und das Pellet vorsichtig mit kaltem (-20 °C) 70 %igem Ethanol (unvergällt) versetzt und erneut für 15 min bei gleicher Umdrehungszahl zentrifugiert. Nach dem Abnehmen der Lösung kann das Pellet mit der Exsikkatorfunktion des Konzentrators oder durch kurzes Erwärmen auf 50-60 °C von Ethanolresten befreit werden.

6.3 Endgruppenfunktionalisierung des Polypropylenoxids

Die Diaminopolypropylenoxide wurden von Aldrich bezogen. Zur Qualitätskontrolle wurden MALDI-Spektren aufgenommen und GPC gemessen. Man erkennt in beiden Fällen einen Anteil an niedermolekularem PPO, dieser Anteil wurde jedoch nicht quantifiziert.

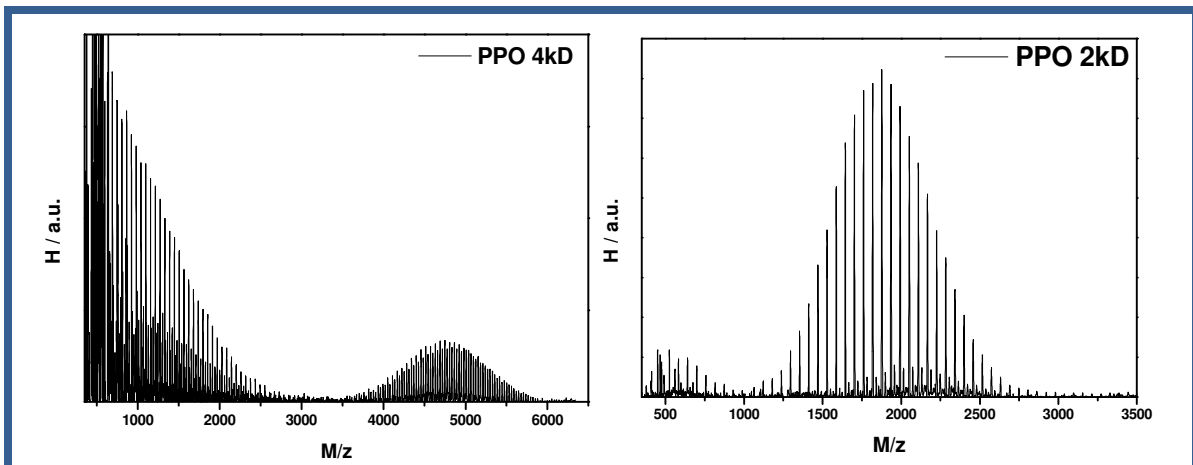


Abb. 6.1: MALDI-ToF-Spektrum von Diaminopolypropylenoxid (Mw= 4kD, links; 2kD, rechts) im Reflektromodus; Matrix: Dithranol, Salz: Silbertrifluoracetat.

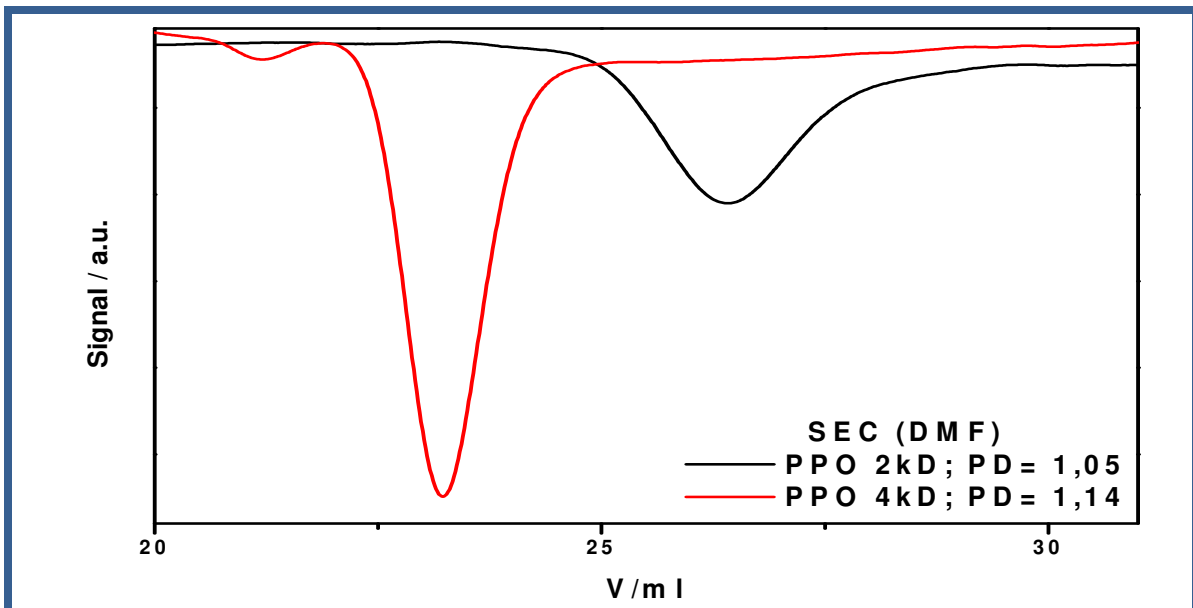


Abb. 6.2: GPC-Eluogramm in DMF (RI-Detektion) der Diaminopolypropylenoxide (PPO2kD: schwarz; PPO4kD: rot). Da die einzelnen Reaktionschritte über Dünnschichtchromatographie (DC) verfolgt werden sollten, wurde das Diaminopolypropylenoxid Mw= 2000 g/mol über Flash Säulenchromatographie in Methanol + 1 % Ammoniakwasser (28 %) von niedermolekularem Anteil befreit.

6.3.1 Mono-Tfa-geschütztes Diaminopolypropylenoxid

40 g (0,2 mol) Diaminopolypropylenoxid ($M_w = 2000$ g/mol) werden in 400 ml trockenem (Molsieb 3 Å) Methanol gelöst. Dazu wird unter Argon eine Lösung aus 3,41 g (2,86 ml; 0,024 mol; 1,2 äq.) trockenem Trifluoressigsäureethylester in 20 ml Methanol in 2h bei Raumtemperatur getropft. Anschließend wird das Lösemittel evaporiert.

Man erhält ein Gemisch aus Mono-, Di- und ungeschützten Diaminopolypropylenoxid. Das Gemisch wird durch Flash-Säulenchromatographie in Methanol aufgetrennt [128].

Ausbeute: Mono-Tfa-diamino-PPO: 18 g (45 % d. Th.)

DC: R_f (MeOH) = 0,28

Man erkennt bei den einzelnen Fraktionen eine Verschiebung der Molekulargewichtsmaxima zu größeren Werten. Dies lässt darauf schließen, dass Fraktion 1 (blau) das doppelgeschützte Derivat ist und Fraktion 2 (rot) das einfach geschützte.

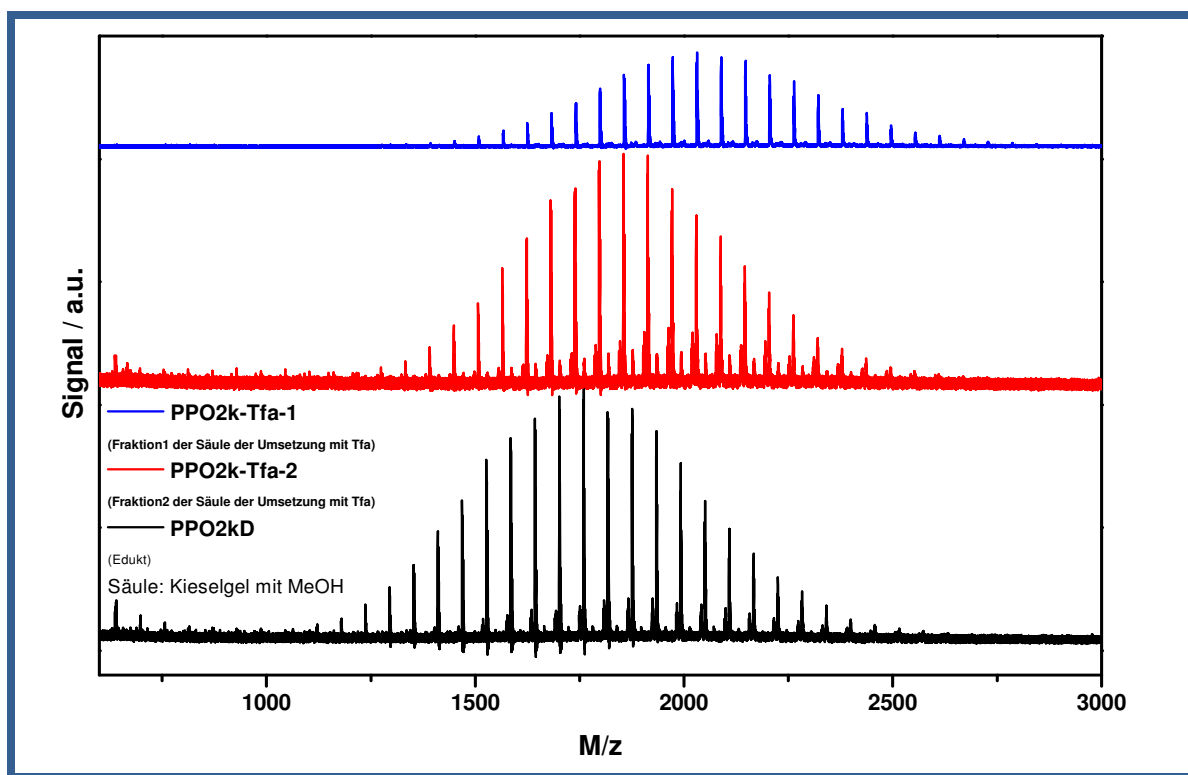


Abb. 6.3: MALDI-ToF-Spektrum der einzelnen Fraktionen der Umsetzung von Diaminopolypropylenoxid ($M_w = 2kD$) mit Trifluoressigsäureethylester im Reflektoren Modus; Matrix: Dithranol, Salz: Silbertrifluoracetat.

6.3.2 α -Fmoc- ω -Tfa-diaminopolypropylenoxid

Zur Identifizierung der Fraktionen aus mono- und di- geschütztem Diaminopolypropylenoxid wurden beide Fraktionen mit einem Überschuss an 9-Fluorenylmethyl-N-succinimidyl-

carbonat (Fmoc-ONSu) versetzt. Dazu wird eine Stammlösung aus 253 mg Fmoc-ONSu in 6 ml Dichlormethan hergestellt und je 1 ml (5 äq.) dieser Lösung auf 50 mg der einzelnen Fraktionen gegeben. Nach 2 Tagen wird die Umsetzung durch Dünnschichtchromatographie überprüft [129]. Die Entwicklung der Dünnschichtchromatographie erfolgt in MeOH auf DC-Kieselgel60-F₂₅₄-platten (Merck). Bei Anregung unter UV-Licht (254 nm) kann eine Fluoreszenz der Faktion 2 und des Edukts beobachtet werden, während Fraktion 1 keine Fluoreszenz zeigt. Durch Anfärben mittels modifiziertem Dragendorff Reagenz konnte alle Produkte sichtbar gemacht werden. Dies bedeutet, dass Fraktion 1 das doppelt Tfa-geschützte Diamino-PPO ist und deshalb keine Umsetzung mit Fmoc-ONSu zeigt. Fraktion 2 ist das mono-Tfa-geschützte Derivat. Der Rf-Wert ist für alle drei Derivate gleich und liegt bei 0,83

Das modifizierte Dragendorff Reagenz ist eine intensiv gefärbte gelbe Lösung, die in Gegenwart von PEO, bzw. PPO-Derivaten einen orangen Niederschlag bildet [159-165]. Das Reagenz ist auch zum Nachweis von Aminen geeignet.

Herstellung des Modifizierten Dragendorff Reagenz :

Lösung A: 1,7 g basisches Bismutnitrat in 20 ml Eisessig lösen, auf 100 ml mit H₂O auffüllen.

Lösung B: 40 g Kaliumiodid in 100 ml H₂O

Lösung C: 100 ml Lösung A mit 140 g Lösung B und 200 ml Eisessig versetzen, auf 1000 ml mit H₂O auffüllen.

Lösung D: 20 g Bariumchlorid in 80 ml H₂O

Modifiziertes Dragendorff Reagenz: 100 ml Lösung C mit 50 ml Lösung D versetzen.

6.3.3 Darstellung von 6-O-Dmt-capronsäure-NHS-Ester

17,1 g ε-Caprolacton (0,15 mol) werden in 300 ml NaOH (2M, 4 äq) für 1h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird der pH-Wert mit NaHSO₄ (2M) auf 2,8 eingestellt. Das Gemisch wird zweimal mit 200 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden einmal mit gesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt und über MgSO₄ getrocknet. Anschließend wird das Produkt filtriert und das Lösemittel evaporiert. Die entstandene Säure wird anschließend über Flash-Säulenchromatographie gereinigt. Als Lösemittelgemisch wird Dichlormethan/ Methanol/ Essigsäure im Verhältnis 20 : 1 : 0,5 verwendet.

Ausbeute : 14,5 g (85 % d. Th.)

1,37 g der Capronsäure werden anschließend in 25 ml Pyridin gelöst. Nach Zugabe von 3,5 g Dimethoxytritylchlorid wird das Gemisch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Dann folgt

die Zugabe von 1,19 g N-Hydroxysuccinimid und 2,13 g DCC. Nach zwei weiteren Tagen wird das Gemisch filtriert, das Lösemittel evaporiert und über Flash Säulenchromatographie in Essigsäureethylester/Hexan (1:1) gereinigt [102, 130].

Ausbeute: 3,5 g (64 % d. Th.)

DC (EE): R_f (6-O-Dmt-Capronsäure) = 0,74

R_f (6-O-Dmt-capronsäure-NHS-Ester) = 0,85

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , TMS)

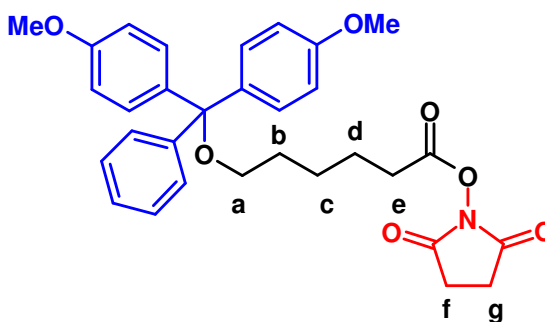
δ_{H} (ppm): 1,45 – 1,68 (m, 6H_{b,c,d})

2,55 – 3,05 (m, 6H_{e,f,g})

3,75 (s, 6H, OMe)

4,09 (m, 2H_a)

6,79 – 7,25 (m, 13H_{aromat.})



6.3.4 Kopplung von 6-O-Dmt-capronsäure-NHS-ester an Mono-Tfa-diaminopolypropylenoxid

1,75 g (1,75 mmol) des Mono-Tfa-diaminopolypropylenoxid und 0,67 (2,5 mmol; 1,43 äq.) des 6-O-Dmt-capronsäure-NHS-esters werden in 25 ml trockenem Dichlormethan gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt. Das Produkt wurde über Flash-Säulenchromatographie gereinigt.

Laufmittel: Toluol/Methanol/ NH_4OH (100 : 300 : 0,5)

Ausbeute: 1,6 g (73 % d. Th.)

DC (EE): R_f = 0,54

6.4 Polymerase Kettenreaktion

Die PCR wurde nach dem Standard Protokoll der jeweiligen Polymerase durchgeführt.

Die PCR-Ansätze werden mit den folgenden Stammlösungen hergestellt:

- Template-DNA (pNEB206A): Verdünnung 1:1000, $c = 20 \mu\text{g/ml}$.
- Primer: Stammlösung von $10 \text{ pmol}/\mu\text{l}$.
- dNTPs (ROTIMIX-PCR1, 2 mM, Roth), Polymerasen und PCR-Puffer werden eingesetzt, wie vom Hersteller erhalten.

Bei der Durchführung von mehreren Ansätzen zur gleichen Zeit wird ein Mastermix hergestellt, worin alle Komponenten bis auf die Polymerase enthalten sind.

Taq DNA Polymerase (100 μl -Ansatz):

10 μl 10 x ThermoPol-Puffer
 10 μl dNTPs (je 20 nmol dATP, dTTP, dCTP und dGTP)
 5 μl Template DNA (0,1 ng pNEB206A)
 5 μl Primer 1 (50 pmol)
 5 μl Primer 2 (50 pmol)
 1,5 μl Taq DNA Polymerase (7,5 Units)
 63,5 μl Milli-Q-Wasser
 Temperaturprogramme: PCR2.CYC, PCRPGEM2.CYC

Phire Hot Start DNA Polymerase (100 μl -Ansatz)

20 μl 5 x Phire Reaction Buffer
 10 μl dNTPs (je 20 nmol dATP, dTTP, dCTP und dGTP)
 5 μl Template DNA (0,05 ng pNEB206A)
 5 μl Primer 1
 5 μl Primer 2
 2 μl Phire Hot Start DNA Polymerase
 53 μl Milli-Q-Wasser
 Temperaturprogramm: Phire.CYC

Nach dem Abtrennen der Primer wird die DNA-Konzentration durch UV-Absorption bestimmt.

Man erhält typischer Weise 5 μg DNA (600 bp) aus 100 μl PCR-Lösung.

6.4.1 Aufarbeitung von PCR-Produkten

Fällung mit Ethanol:

Auf 100 µl eines PCR-Ansatzes wird 1 ml Ethanol gegeben. Es wird dsDNA und ssDNA unabhängig von der jeweiligen Größe ausgefällt. Enzyme, dNTPs und Salze bleiben in Lösung. Nach kurzem Mischen auf dem Vortexer wird der Ansatz mindestens 1 h auf Trockeneis oder über Nacht bei -20 °C gekühlt und anschließend 30 min bei RT und ca. 14000 x g (13000 rpm im Standard Rotor für 1,5 ml Reaktionsgefäße) zentrifugiert. Direkt nach Beendigung der Zentrifugation wird das Fällungsmittel vorsichtig abgenommen und mit 500 µl kaltem (-20 °C) 70 %igem Ethanol (unvergällt) versetzt. Das Pellet sollte hierbei nicht aufgeschüttelt werden. Anschließend wird noch einmal zentrifugiert (5-15 min, RT, ca. 14000 x g), das Fällungsmittel abgenommen und das Pellet im Vakuum getrocknet.

Selektive Fällung mit Roti[®]-PCR Clean:

Diese Methode ist für DNA-Fragmente ≥ 100 bp geeignet. Neben Enzymen, dNTPs und Salzen werden auch kleine DNA-Fragmente wie Primer und Primer-Dimere abgetrennt. Die Rückgewinnungsrate der Fällung liegt bei ca. 90-95 %.

Auf 100 µl PCR-Lösung werden 100 µl Roti-PCR Clean gegeben. Nach kurzem Mischen auf dem Vortexer wird der Ansatz für 10-20 min bei RT inkubiert, anschließend zentrifugiert (30 min, RT, ca. 14000 x g) und die überstehende Lösung abgenommen. Das Pellet wird in 200 µl 70 %igem Ethanol resuspendiert und erneut für 30 min zentrifugiert (RT, ca. 14000 x g). Für sensitive Applikationen (z.B. Sequenzierung, Transformation, Transfektion oder exakte Größenbestimmung in der Gelelektrophorese) sollte dieser Schritt noch einmal wiederholt werden, um die letzten Spuren des Fällungsmittels zu entfernen.

6.4.2 Magnetic Beads

Eigenschaften der Magnetic Beads:

Die Magnetic Beads (M-PVA SAV2, Chemagen) sind Streptavidin funktionalisiert. Das Streptavidin ist auf der Oberfläche superparamagnetischer Polyvinylalkoholbeads kovalent gebunden. Die Beads besitzen eine polydisperse Größenverteilung, die Größe der Beads beträgt 1 – 3 µm. Der Magnetitgehalt beträgt 50-60 %. Die Bindungskapazität liegt bei 300 pmol für biotinylierte Oligonukleotide. Die Konzentration im Lagerpuffer beträgt 25 mg/ml [166].

Immobilisierungsprotokoll:

Die Beads werden in einem Lagerpuffer (PBS-Puffer pH 7,2; 0,1 % Rinderserumalbumin; 0,05 % Natriumazid) geliefert.

- Die Beadsuspension wird gut aufgeschüttelt und die benötigte Menge entnommen. Die Beads werden magnetisch abgetrennt und zweimal mit dem doppelten Volumen Bindungspuffer (10 mM Tris HCl pH 7,5; 1 mM EDTA, 4M NaCl, 0,1 % Tween20) gewaschen.
- Die Beads werden im Bindungspuffer suspendiert in einer Konzentration von 5 mg/ml
- Eine wässrige Lösung der Biotin-markierten PCR-Produkte wird zu der Beadsuspension gegeben. Dabei ist zu beachten, dass die NaCl-Konzentration nicht unter 0,75 mol/L sinkt (maximale Verdünnung 1:4).
- Die Proben werden über Nacht (mind. 2h) auf dem Rüttler (IKA Vortex™ Genius 3) bei Raumtemperatur inkubiert.
- Die Proben werden zweimal mit TE-Puffer (10 mM Tris HCl pH 7,5; 1 mM EDTA) gewaschen, um alle Verunreinigungen der PCR und das Salz des Bindungspuffer zu entfernen.

Reversible Spaltung der Biotin-Streptavidin Bindung [157]:

- Die Beads werden in 50 µl Milli-Q-Wasser resuspendiert.
- Anschließend werden die Proben auf 70 °C geheizt.
- Bei Erreichen der 70 °C werden die Beads magnetisch abgetrennt und die Überstehende Lösung der PCR-Produkte wird mit einer Pipette abgenommen.
- Die Beads werden nochmal in 50 µl Milli-Q-Wasser resuspendiert auf 70 °C geheizt, magnetisch abgetrennt und dekantiert.

6.5 Ligation

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich DNA-Fragmente mit sticky-ends ligiert. Die Proben werden vor der Ligation über NAP-5 Säulchen entsalzt. Anschließend erfolgt die Hybridisierung im Ligase-Puffer. Es wurden zwei verschiedene Ligasen benutzt.

T4 DNA Ligase (Roche, 1 Unit/ μ l)

Für einen Ansatz von 30 μ l Gesamtvolumen wird eine stöchiometrische Mischung der DNA-Fragmente (30 pmol jedes Fragments) mit 3 μ l 10 x Ligase Puffer versetzt und mit Milli-Q-Wasser auf 28 μ l aufgefüllt. Nach gründlichem Durchmischen erfolgt die Hybridisierung im Thermocycler. Anschließend wird die Lösung im Thermocycler bei 10 °C mit 2 μ l T4 DNA Ligase versetzt und über Nacht bei 10 °C inkubiert. Die Ligase wird durch eine Inkubation bei 65 °C für 10 min vollständig inaktiviert. Danach wird erneut hybridisiert. Der Erfolg der Ligation wird auf einem denaturierenden Polyacrylamid Gel kontrolliert. Die T4 DNA Ligase ist nicht nur in der Lage überhängende Enden zu ligieren. Durch Inkubation bei 16-25 °C werden auch glatte Ende ligiert.

E. coli DNA Ligase (NEB, 10 Units/ μ l)

Als optimale Reaktionsbedingungen gelten eine 5'-Enden-Konzentration von 0,12 μ M in 1x Ligase-Puffer mit 20-50 μ l Gesamtvolumen. Der Ansatz muss also so berechnet werden, dass diese Bedingungen erfüllt sind. Nach Zugabe eines Mikroliters der Ligase erfolgt die Inkubation bei 16 °C über Nacht. Anschließend wird die Ligase durch Inkubation für 20 min bei 65 °C inaktiviert. Im Gegensatz zur T4 DNA Ligase kann die E. coli DNA Ligase ausschließlich sticky-ends ligieren.

6.6 Analysen- und Trennmethode

6.6.1 Gelelektrophorese

Acrylamidgele

Es wurde das vertikale Gelelektrophoresesystem PerfectBlue™ Twin L der Firma Peqlab mit einem 0,8 mm Spacersatz verwendet. Die Trennung erfolgt bei konstanter Spannung (Spannungsquelle: Consort EV 215). Die Gelmatrix wird aus einer 40 %igen Stammlösung von Acrylamid / Bisacrylamid (n:n = 19:1) hergestellt. Zum Starten der Polymerisation gibt man 1 Vol% einer 10 %igen (w/v) Lösung von APS in Wasser und anschließend 0,1 Vol% TEMED zu.

Denaturierende PAGE:

Bei denaturierenden Gelen wird die Gellösung mit TBE-Puffer angesetzt und 50 % (w/v) Harnstoff zugegeben. Die Gelkammer wird auf 50 °C temperiert und die Proben vor dem Auftragen im Ladepuffer bei ca. 90 °C für 3-5 min erhitzt und anschließend in kaltem Wasser oder durch Vortexen und Zentrifugieren abgeschreckt. Die Elektrophorese erfolgt bei einer konstanten Spannung von 600 V.

Ladepuffer: 90 Vol% Formamid, 10 mM NaOH, 1 mM Na₂EDTA, 0,1 % (w/v) Bromphenol-blau (3,3',5,5'-Tetrabromphenolsulfonphthalein) in Wasser,

Elektrophoresepuffer: 1 x TBE,

Färbelösung: 85 µl GelRed (10 000 x in DMSO) in 350 ml Wasser.

Native PAGE:

Native Gele werden in TAE-Puffer mit 10 mM Magnesiumacetat angesetzt. Je nach Stabilität der untersuchten Strukturen wird die Gelkammer auf 20 °C bzw. 4 °C temperiert. Die Elektrophorese erfolgt bei konstanter Spannung von 250 V.

Ladepuffer: Gel Loading Buffer (Sigma Aldrich),

Elektrophoresepuffer: 1 x TAE + 10 mM Mg(OAc)₂,

Färbelösung: 250 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) in 500 ml Wasser.

Agarosegele

Für vertikale Gele von 1-1,7 % Agarose wurde standardmäßig das System GENTERphorese™ der Firma GENTERprise Genomics eingesetzt. Für horizontale Gele von 2 - 4 % Agarose wurde die Mini-Sub®CELL GT von BioRad oder für 2,0 - 4,0 % Agarose das E-Gel System iBase™ von Invitrogen verwendet.

Die Agarose wird mit TBE-Puffer angesetzt und in der Mikrowelle durch mehrfaches Aufkochen in Lösung gebracht. Für Gele von 1-1,7 % wurde High Resolution Agarose (Roth) verwendet. Die 2-4 %igen Gele wurden mit Low Melting Agarose (Roth) gegossen. Bei dem System von Invitrogen werden Fertiggele verwendet.

Rückgewinnung von DNA aus Agarosegelen

Das System von Invitrogen bietet die Möglichkeit der Elektroelution. Diese Gele haben zwei Kammreihen. In der oberen Kammreihe wird die zu trennende Probe aufgetragen, wenn das gewünschte Fragment die untere Kammreihe erreicht, kann dort die Probe wieder durch eine Pipette aufgenommen werden.

Gel-dokumentation erfolgte mit dem E-Box-1000/20M-gel Imaging System (Peqlab). Größenbestimmungen wurden mit der PC-Software E-Capt (Vilber Lourmat) und Quantifizierungen der Fluoreszenzintensitäten mit ScionImage (Scion Corporation) durchgeführt.

6.6.2 CEE (Continous Elution Electrophoresis)

Die CEE (Model 491 PrepCell, Bio-Rad) wurde benutzt um Fehlsequenzen der Oligonukleotide in größeren Maßstab abzutrennen.

Mit dieser Apparatur ist es möglich Gelsäulen mit zwei verschiedenen Durchmessern (28 mm und 37 mm) zu benutzen. Für eine 5 cm hohe Gelsäule werden 20 bzw. 40 ml Gellösung benötigt. Die Initiatormenge beträgt 40 bzw. 80 µl APS (0,2 Vol% 10 %ige (w/v) APS-Lösung) und 4 bzw. 8 µl TEMED (0,02 Vol%). Während der Polymerisation wird der Kühlfinger, im Zentrum der Gelsäule auf 22 °C temperiert und das Gel mit ca. 2 ml n-Butanol überschichtet, um die Bildung eines Meniskus zu vermeiden. Nach 1-2 h ersetzt man den Alkohol durch Puffer und lässt das Gel über Nacht polymerisieren. Die Temperatur während der Trennung beträgt 49 °C. Zum Erreichen dieser Temperatur wird der Puffer vorher auf der Heizplatte erwärmt, während der Trennung wird die Temperatur durch einen Thermostaten gehalten (Durchfluss: ca. 80-100 ml/min). Nach dem Auftragen der Probe werden die maximal zulässigen Werte an der Spannungsquelle eingestellt (500 V, 40 mA, 20 W). Die Elektrophorese erfolgt bei einem konstanten Strom von 40 mA. Bei einem Fluss des Elutionspuffers von ca. 1 ml/min werden Fraktionen von jeweils 2 ml gesammelt. Die gereinigte DNA lässt sich durch Ultrafiltration vom Puffer abtrennen und aufkonzentrieren.

Mit dieser Methode konnten 1500 µg eines Oligonukleotids (62 Basen), in einem Trennungsschritt von den Fehlsequenzen abgetrennt werden. Das Auflösungsvermögen der CEE erreicht annähernd das der analytischen PAGE.

6.6.3 NMR-Spektroskopie

^1H -, ^{13}C - und ^{19}F -NMR-Spektren wurden an einem Bruker 300 UltraShield bzw. Bruker Avance DRX 400 gemessen. Die Messung erfolgte in CDCl_3 .

6.6.4 Elektrosprayionisation (ESI)

Die Elektrosprayionisationsmessungen erfolgten an einem Micromass-Q-TOF-Ultima-3-Spektrometer der Firma Waters, Milford (USA).

6.6.5 MALDI-Tof Massenspektrometrie

Die Massenspektren (MALDI-TOF MS) von Polymeren wurden an einem ToFSpec E der Firma Micromass im Reflectron-Mode mit einem Multi-Channel Plate Detector, bei eingeschalteter Matrixunterdrückung aufgenommen. (Matrix: Dithranol, Salz: Silbertrifluoracetat.)

Die Probenpräparation auf dem Träger erfolgte mit 1-2 ml einer Lösung mit 10:10:1 Anteilen einer 5 g/l Polymerlösung in THF, einer 20 g/l Dithranollösung in THF und einer 1 g/l Silbertrifluoracetatlösung in THF.

6.6.6 IR-Messungen

Als IR-Spektrometer wurde das Model Vector 33 von der Firma Bruker verwendet. Die Messung von Flüssigkeiten wurde mit Kochsalzplatten durchgeführt. Feststoffe wurden auf einem Kristall vermessen. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit der Software Opus Version 3.1.

6.6.7 UV/VIS-Messungen

Die UV/VIS-Messungen wurden mit einem Spektrometer Model 100 Bio UV/Vis der Firma Cary durchgeführt und mit der zugehörigen Software Win UV Scan Application Version 9.0 ausgewertet. Als Küvetten dienten Präzisionsküvetten aus optischem Spezialglas (Typ 110-OS, 10 mm) von der Firma Hellma.

6.6.8 Gelpermeationschromatographie (GPC)

Die GPC-Messungen in THF als Laufmittel wurden an Styrol/Divinylbenzol-Copolymersäulen (Hersteller: MZ-Analysentechnik, MZ-Gel SD-plus 5µm) durchgeführt. Die Porengröße betrug für das Oligomersystem 100, 500, 1000 Å. Die Detektion erfolgte mittels eines Waters-2487-

UV/VIS-Detektors bei 254 nm und einem Waters-2410-RI-Detektor bei 40 °C. Die Kalibrierung wurde mit Polystyrol(PS)-Standards durchgeführt.

Die Messungen in Dimethylformamid (DMF mit 1 g/l LiBr oder LiCl) erfolgten an einer Styrol / Divinylbenzolcopolymersäule (Hersteller: MZ-Analysentechnik, SD PLUS 5 µm) mit den Porengrößen 1000, 500 und 100 Å (MZ-Gel SD-plus 5 µm). Die Detektion erfolgte mittels eines Waters 486 UV/VIS- und eines Waters 2414 RI-Detektors bei 40 °C.

Die Kalibrierung wurde mit Hilfe von PS-Standards erhalten.

6.6.9 AFM

Die Untersuchungen der DNA-Strukturen erfolgten im TappingTM-Modus an Luft und in Flüssigkeit, mit einem MultiModeTM Scanning Probe Microscope (Nanoscope IIIa-Controller, Digital Instruments). Die verwendeten Siliciumcantilever zur Messung an Luft stammen von der Firma Nanosensors (Resonanzfrequenz ca. 300 kHz). Für die Probenpräparation wird die Lösung auf eine DNA Konzentration von etwa 1-5 mg/L und 10 mM Mg²⁺ (MgCl₂) eingestellt. Von dieser Lösung werden 7 µl auf frisch gespaltenes Mica aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wird das Substrat mit Milli-Q-Wasser abgespült und mit Stickstoff trocken geblasen.

Für die Messung in Flüssigkeit wurden Siliciumcantilever der Firma Veeco (SNL-10, Silico tip Nitride lever, Backside Top 60 nm Au) verwendet. Für die Probenpräparation werden etwa 30 µl der Probe auf frisch gespaltenes Mica aufgetragen. Nach einer adsorptionszeit von 5 min wird die Probe in der Flüssizelle in 10 mM HEPES-Puffer mit 1 mM Ni²⁺ vermessen.

7 ANHANG

A: Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
AFM	Atomic Force Microscopy
AMP	Adenosinmonophosphat
äq.	Äquivalente
ATP	Adenosintriphosphat
Ac	Acetyl
b	Basen
bp	Basenpaare
C	Cytidin
CEE	Continous Elution Electrophoresis
CPG	Controlled Porouse Glass
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
Dmt	Dimethoxytrityl
denat.	Denaturierend
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
ds	Doppelstrang
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EG	Ethylenglykol
ESI	Elektrospray-Ionisation
Et ₃ N	Triethylamin
Fmoc-ONSu	N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)succinimide
G	Guanosin
GPC	Gelpermeationschromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IR	Infrarot
kD	Kilo Dalton
LCST	Lower critical solution temperature

MALDI-Tof MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry
MWCO	Molecular Weight CutOff
NAD ⁺ /NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMN	Nicotinamid-mononucleotid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NEB	New England Biolabs
ODN	Oligodesoxynukleotide
OH-	Hydroxy-
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PD	Polydispersität
PEG	Polyethylenglykol
PEO	Polyethylenoxid
PNA	Peptide Nucleic Acids
PPO	Polypropylenoxid
PS	Polystyrol
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
ss	Einzelstrang (single strandet)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
THF	Tetrahydrofuran
Tfa:	Trifluoracetat
T _m :	Schmelztemperatur
TNA	Threose-Nukleinsäure
Tris:	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
UV	ultraviolett
Vis	visible

B: Chemikalien, Puffer, Nährmedien und Materialien

Standardchemikalien wurden von den Firmen Fluka, Sigma-Aldrich, Merck und Fischer Scientific in der Qualität „zur Analyse“ oder „reinst“ bezogen. Sofern nicht explizit angegeben, wurden diese Substanzen ohne weitere Aufarbeitung verwendet.

Monodisperse Polymere:

α -Amino- ω -hydroxypolyethylenoxide:

Amino-dPEG12TM-alcohol (n = 12, Quanta BioDesign)

EG16 (n = 16), EG32 (n = 32) [49]

Polydisperse Polymere:

α -Amino- ω -hydroxypolyethylenoxid:

Sunbright HO-034PA (NOF Corporation, Mw = 3400 g/mol, PD = 1,028)

Puffer und Nährmedien:

PCR-Puffer:

10 x ThermoPol Puffer,

5 x Phire™ Reaction Buffer (NEB)

Magnetic Beads:

Bindungspuffer: 10 mM Tris HCl pH 7,5; 1 mM EDTA, 4M NaCl, 0,1 % Tween20

TE: 10 mM Tris HCl pH 7,5; 1 mM EDTA

Ligase Puffer:

10x E. coli Ligase Puffer (30 mM Tris-HCl, 4 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 26 μ M NAD⁺, 50 μ g/ml

BSA pH 8)

10x T4 DNA Ligase Puffer (660 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 10 mM ATP, pH 7,5)

Andere Puffer:

Elutionspuffer: 500 mM NH₄Oac / 10 mM Mg(OAc)₂ / 2 mM EDTA

10 x TAE-Puffer (Roth)

10 x TAE/Mg-Puffer: 10 x TAE-Puffer (Roth) + 100 mM Mg(OAc)₂

10 x TBE-Puffer (Amersham bzw. Roth)

Materialien:

Materialien für die Chromatographie:

Kieselgelfolien: DC-Alufolien 5 x 10 cm, Kieselgel 60 F254 (Merck)

Säulenchromatographie: Kieselgel 60 (0,04-0,063 mm, Merck)

Präparative GPC: Column XK 26/70, i.d. = 26 mm, SephacrylTM S-400 High Resolution (Amersham)

Materialien für die Gelelektrophorese:

Standard Agarose: Agarose, For Routine Use, Molecular Biology Tested (Sigma-Aldrich)

Für kleine Molmassen: Agarose High Resolution (ROTI®GAROSE, Roth)

Agarose für CEE: SeaKem® GTG® Agarose (Lonza Group Ltd.)

Acrylamid / Bisacrylamid- Stammlösung: Rotiphorese® Gel 40 (19:1) (Roth)

PlusOne Ethidiumbromidlösung 10 mg / ml (Amersham)

Gel Red 10000 x in DMSO (Biotium, vertrieben durch Bio Trend Chemikalien GmbH)

Stains-All (Sigma Aldrich)

Polymerasen:

Taq DNA Polymerase (NEB)

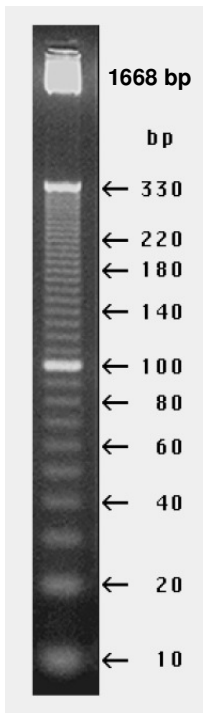
Phire™ Hot Start DNA Polymerase (Finnzymes, vertrieben durch NEB)

Modifikationsenzyme:

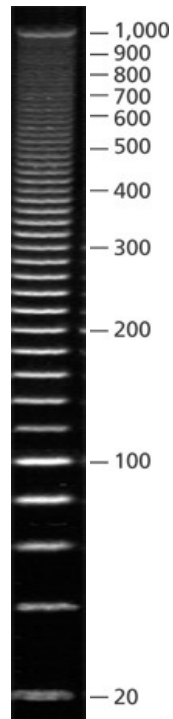
Polynukleotid Kinase, T4 DNA Ligase (Roche)

E. coli DNA Ligase

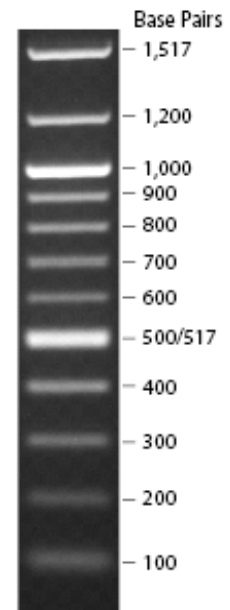
DNA-Marker:



10 bp DNA Ladder
(Invitrogen)



PCR 20 bp Low Ladder
(Sigma Aldrich)



100 bp DNA Ladder
(New England Biolabs)

C: Oligonukleotide

Nonamer:

- M1A: 5'-CAT CTC AGT TGA CTG CTA GTA CCT GAG CAC TGA ATG CGA TGT TGA AGT AGC
TCT GCT CCA TG-3'
- M1B: 5'-CCG GCG ACA ATC GCC ACA TGC TAC ATG GAG CAG AGC TAC TTC AAC ATC GCA
TTC AGT GCT CAG GTA CTA GCA GTC AAC TGA GAT G-3'
- M2A: 5'-**PO₄**-TCT GAT GTG TCC GGT AAG ATG ATC TAT ATG AAT AGG CAG ATA CGA AGA
GCG AGG CTA TGT CG-3'
- M2B: 5'-TAG CGT CGT GCG AGA ACT ATC TAC GAC ATA GCC TCG CTC TTC GTA TCT GCC TAT
TCA TAT AGA TCA TCT TAC CGG ACA CAT CAG ATG TCT TAG GAC AAG TCA CAG
TAA-3'
- M4A: 5'-**PO₄**-TGG TCG AGT AGG CTC ATC GGC CAC GAT GCG TTC GGC ATC CGA TCA ATC
CGC ACT AGA GAC GA-3'
- M4B: 5'-CGC AAT ACG GTC GTT CCA TTG GAT CGT CTC TAG TGC GGA TTG ATC GGA TGC
CGA ACG CAT CGT GGC CGA TGA GCC TAC TCG ACC AAC TCA ACG CGG TAG AAG
CGT GTT-3'
- M6A: 5'-**PO₄**-CAC GGT GCG CGT AGC CAC TTG GCA ATG TCC AGC GTT ATC GAG GAC GTT
ACA GGT GTA GAC TG-3'
- M6B: 5'-TTA GAC GCC AAC GGT ACA GTG GTC AGT CTA CAC CTG TAA CGT CCT CGA TAA
CGC TGG ACA TTG CCA AGT GGC TAC GCG CAC CGT GCA AGC CGT ACA TAC ACT
CAG CAG-3'
- M8A: 5'-**PO₄**-GAT AGG TGA ACA GAT TCC TAC CAG GAT ATG CAG TGA GTA TGA CCT CGT
ACT GCC AGT CGT CG-3'
- M8B: 5'-CGA CGA CTG GCA GTA CGA GGT CAT ACT CAC TGC ATA TCC TGG TAG GAA TCT
GTT CAC CTA TCA TAA GTC CGT CAT TAG TCG CTG A-3'
- M1: 5'-**PO₄**-TAG CAT GTG GCG ATT GTC GCC GG-3'
- M2: 5'-**NHS**-TTA CTG TGA CTT GTC CTA AGA CA-3'
- M1M2: 5'-**PO₄**-TAG CAT GTG GCG ATT GTC GCC GG TTA CTG TGA CTT GTC CTA AGA CA
- M3: 5'-**PO₄**-TAG ATA GTT CTC GCA CGA CGC TA-3'
- M4: 5'-**NHS**-AAC ACG CTT CTA CCG CGT TGA GT-3'
- M3M4: 5'-**PO₄**-TAG ATA GTT CTC GCA CGA CGC TA AAC ACG CTT CTA CCG CGT TGA GT -3'
- M5: 5'-**PO₄**-TCC AAT GGA ACG ACC GTA TTG CG-3'

M6 : 5'-**NHS**-CTG CTG AGT GTA TGT ACG GCT TG-3'
M5M6 : 5'-**PO₄**-TCC AAT GGA ACG ACC GTA TTG CG CTG CTG AGT GTA TGT ACG GCT TG -3'
M7: 5'-**PO₄**-ACC ACT GTA CCG TTG GCG TCT AA-3'
M8: 5'-**NHS**-TCA GCG ACT AAT GAC GGA CTT AT-3'
M7M8: 5'-**PO₄**-ACC ACT GTA CCG TTG GCG TCT AA TCA GCG ACT AAT GAC GGA CTT AT -3'

Multiblockcopolymer:

M1: 5'-TAG CAT GTG GCG ATT GTC GCC GG-3'
M2 : 5'-**NHS**-TTA CTG TGA CTT GTC CTA AGA CA-3'
M3: 5'-TAG ATA GTT CTC GCA CGA CGC TA-3'
M4 : 5'-**NHS**-AAC ACG CTT CTA CCG CGT TGA GT-3'
M5: 5'-TCC AAT GGA ACG ACC GTA TTG CG-3'
M6 : 5'-**NHS**-CTG CTG AGT GTA TGT ACG GCT TG-3'
M7: 5'-ACC ACT GTA CCG TTG GCG TCT AA-3'
M8: 5'-**NHS**-TCA GCG ACT AAT GAC GGA CTT AT-3'
M2c: 5'-**NHS**- TGT CTT AGG ACA AGT CAC AGT AA
M3c: 5'-TAG CGT CGT GCG AGA ACT ATC TA-3'
M4c: 5'-**NHS**- ACT CAA CGC GGT AGA AGC GTG TT
M5c: 5'-CGC AAT ACG GTC GTT CCA TTG GA
M6c: 5'-**NHS**- GTT CGG CAT GTA TGT GAG TCG TC
M7c: 5'-TTA GAC GCC AAC GGT ACA GTG GT

NHS = Succinimidylester (Carboxy Modifier C10, Glen Research Corp.)

Templat-DNA:

pNEB206 (New England Biolabs): Hierbei handelt es sich um ein pUC19 Plasmid, bei dem lediglich die Sequenz der MCS modifiziert wurde. Die Linearisierung erfolgt durch Restriktion mit XbaI. Die Bildung der sticky-ends wird durch die anschließende Erzeugung von Einzelstrangbrüchen mittels Nt.BbvCI erreicht. Die Annealing Sites der verwendeten Primersequenzen PL80, PL200 und PL600 sind farbig hervorgehoben:

```
TCGCGCGTTT CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG
GAGACGGTCA CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG
TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG TCGGGGCTGG CTTAACTATG
CGGCATCAGA GCAGATTGTA CTGAGAGTGC ACCATATGCG GTGTGAAATA
```

CCGCACAGAT GCGTAAGGAG AAAATACCGC ATCAGGCGCC ATTGCGCATT
CAGGCTGCGC AACTGTTGGG AAGGGCGATC GGTGCGGGCC TCTTCGCTAT
TACGCCAGCT GCGGAAAGGG GGATGTGCTG CAAGGCGATT AAGTTGGGTA
ACGCCAGGGT TTTCCCAGTC ACGACGTTGT AAAACGACGG CCAGTGAATT
CGAGCTCAGG CGCGCCTTAA TTAAGCTGAG GGAAAGTCTA GAGGATCCTC
TAGATGTCTC CTCAGCGTTT AAACCCTGCA GGAAGCTTGG CGTAATCATG
GTCATAGCTG TTTCTGTGT GAAATTGTTA TCCGCTCACA ATTCCACACA
ACATACGAGC CGGAAGCATA AAGTGTAAG CCTGGGGTGC CTAATGAGTG
AGCTAACTCA CATTAAATTGC GTTGCCTCA CTGCCCGCTT TCCAGTCGGG
AAACCTGTCTG TGCCAGCTGC ATTAATGAAT CGGCCAACGC GCGGGGAGAG
GCGGTTTGGC TATTGGGCGC TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC TGACTCGCTG
CGCTCGGTCTG TTCGGCTGCG GCGAGCGGTA TCAGCTCACT CAAAGGCGGT
AATACGGTTA TCCACAGAAT CAGGGGATAA CGCAGGAAAG AACATGTGAG
CAAAAGGCCA GCAAAGGCC AGGAACCGTA AAAAGGCCGC GTTGCTGGCG
TTTTTCCATA GGCTCCGCC CCCTGACGAG CATCACAAAA ATCGACGCTC
AAGTCAGAGG TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC CAGGCGTTTC
CCCCTGGAAG CTCCTCTGTG CGCTCTCCTG TTCCGACCCT GCCGCTTACC
GGATACCTGT CCGCCTTTCT CCCTTCGGGA AGCGTGGCGC TTTCTCATAG
CTCACGCTGT AGGTATCTCA GTTCGGTGTA GGTCGTTTCGC TCCAAGCTGG
GCTGTGTGCA CGAACCCCC GTTCAGCCCG ACCGCTGCGC CTTATCCGGT
AACTATCGTC TTGAGTCCAA CCCGGTAAGA CACGACTTAT CGCCACTGGC
AGCAGCCACT GGTAACAGGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GGCGGTGCTA
CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG CCTAACTACG GCTACACTAG AAGAACAGTA
TTTGGTATCT GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA AAAGAGTTGG
TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC AAACCACCGC TGGTAGCGGT GGTTTTTTTTG
TTTGCAAGCA GCAGATTACG CGCAGAAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCCT
TTGATCTTTT CTACGGGGTC TGACGCTCAG TGGAACGAAA ACTCACGTTA
AGGGATTTTG GTCATGAGAT TATCAAAAAG GATCTTCACC TAGATCCTTT
TAAATTAATA ATGAAGTTTT AAATCAATCT AAAGTATATA TGAGTAAACT
TGGTCTGACA GTTACCAATG CTTAATCAGT GAGGCACCTA TCTCAGCGAT
CT**GTCTATTT** **CGTTCATCCA** TAGTTGCCTG ACTCCCCGTC GTGTAGATAA
CTACGATACG GGAGGGCTTA CCATCTGGCC CCAGTGCTGC AATGATACCG
CGAGACCCAC GCTCACCGGC TCCAGATTTA TCAGCAATAA ACCAGCCAGC
CGGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCCTGC AACTTTATCC GCCTCCATCC
AGTCTATTAA TTGTTGCCGG GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT
AGTTTGCGCA ACGTTGTTGC CATTGCTACA GGCATCGTGG TGTCACGCTC

GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TTCCCAACGA TCAAGGCGAG
 TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAAG CGGTTAGCTC CTTCGGTCCT
 CC**GATCGTTG TCAGAAGTAA** GTTGGCCGCA GTGTTATCAC TCATGGTTAT
 GGCAGCACTG CATAATTCTC TTACTGTTCAT GCCATCCGTA AGATGCTTTT
 CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT T**CTGAGAATA GTGTATGCGG**
 CGACCGAGTT GCTCTTGCCC GCGGTCAATA CGGGATAATA **CCGCGCCACA**
TAGCAGAACT T**TAAAAGTGC** TCATCATTGG AAAACGTTCT TCGGGGCGAA
 AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCAGTTCGAT GTAACCCACT
 CGTGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTCACCA GCGTTTCTGG
 GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGGA ATAAGGGCGA
 CACGGAAATG TTGAATACTC ATACTCTTCC TTTTTCATAA TTATTGAAGC
 ATTTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA TACATATTTG AATGTATTTA
 GAAAAATAAA CAAATAGGGG TTCCGCGCAC ATTTCCCCGA AAAGTGCCAC
 CTGACGTCTA AGAAACCATT ATTATCATGA CATTAACTTA TAAAAATAGG
 CGTATCACGA GGCCCTTTCG TC

Primer:**Primer-Links:**

PL31: 5´-CGG GAT AAT ACC GCG CCA CA-3´

(Primer-Dimer Tm=20 °C, 20b, GC%=60)

PL80: 5´-**CTG AGA ATA GTG TAT GCG G**-3´

(80bp-PCR Tm=49 °C, 19b, GC%=47)

PL200: 5´-**GAT CGT TGT CAG AAG TAA G**-3´

(200bp-PCR Tm=39 °C, 19b, GC%=42)

PL600: 5´-**GTC TAT TTC GTT CAT CC**-3´

(600bp-PCR Tm=44 °C; 17b; GC%=41)

Primer-Rechts:

PR46: 5´-CGG TAG TAC AAC GCT CGC AAT CCT GAG CAC GTT CGA TAC TCC GTG G **Sp18**
 AAG TTC TGC TAT GTG GC-3´

PR46c: 5´-CCA CGG AGT ATC GAA CGT GCT CAG GAT TGC GAG CGT TGT ACT ACC G **Sp18**
 AAG TTC TGC TAT GTG GC-3´

PR23: 5´-TGA GCA CGT TCG ATA CTC CGT GG **Sp18** AAG TTC TGC TAT GTG GC-3´

PR23c: 5´-CCA CGG AGT ATC GAA CGT GCT CA **Sp18** AAG TTC TGC TAT GTG GC-3´

PR16: 5´-GTT CGA TAC TCC GTG G **Sp18** AAG TTC TGC TAT GTG GC-3´

PR16c: 5´-CCA CGG AGT ATC GAA C **Sp18** AAG TTC TGC TAT GTG GC-3´

PR8: 5'-CTC CGT GG Sp18 AAG TTC TGC TAT GTG GC-3'

PR8c: 5'-CCA CGG AG Sp18 AAG TTC TGC TAT GTG GC-3'

PRA23: 5'-AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AA Sp18 AAG TTC TGC TAT GTG GC-3'

PRT23: 5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT Sp18 AAG TTC TGC TAT GTG GC-3'

PRG23: 5'-GGG GGG GGG GGG GGG GGG GGG GG Sp18 AAG TTC TGC TAT GTG GC-3'

PRC23: 5'-CCC CCC CCC CCC CCC CCC CCC CC Sp18 AAG TTC TGC TAT GTG GC-3'

PRGC83: 5'-CGT GCA CGC CGG GTG GAG CCG CC Sp18 AAG TTC TGC TAT GTG GC-3'

PRGC83c: 5'-GGC GGC TCC ACC CGG CGT GCA CG Sp18 AAG TTC TGC TAT GTG GC-3'

PRGC17: 5'-TAC ATG TAT TAA ACA AGA TTA TT Sp18 AAG TTC TGC TAT GTG GC-3'

PRGC17c: 5'-AAT AAT CTT GTT TAA TAC ATG TA Sp18 AAG TTC TGC TAT GTG GC-3'

D: Temperaturprogramme

Temperaturprogramme für die PCR

PCR2.CYC:	PCRPGEM2.CYC:	PCR-Phire.CYC:
LIDHT: 110 °C	LIDHT: 110 °C	LIDHT: 110 °C
94 °C 1 min	96 °C 2 min	98 °C 30 s
35 Zyklen: 94 °C 15 s	30 Zyklen: 96 °C 15 s	35 Zyklen: 98 °C 5 s
40 °C 20 s	52 °C 30 s	52 °C 20 s
72 °C 45 s	72 °C 1 min	72 °C 20 s
72 °C 5 min	72 °C 4 min	72 °C 1 min
LIDHT OFF	LIDHT OFF	LIDHT OFF
RAMP 4 °C: 1,5 °C/s	RAMP 4 °C: 1,5 °C/s	RAMP 4 °C: 1,5 °C/s
STORE AT 8 °C	STORE AT 8 °C	STORE AT 8 °C

Temperaturprogramme für die Hybridisierung:

Hyb90.CYC	Hyb90nig.CYC	HybF70.CYC	Hyb50.CYC
LIDTH: 110 °C	LIDTH: 110 °C	LIDHT: 70 °C	50 °C 7 min
90 °C 5 min	90 °C 10 min	70 °C 5 min	45 °C 30 min
65 °C 20 min	85 °C 10 min	60 °C 10 min	40 °C 30 min
LIDTH OFF	80 °C 1 h	LIDHT OFF	35 °C 30 min
55 °C 20 min	75 °C 1 h	50 °C 10 min	30 °C 30 min
45 °C 20 min	70 °C 1 h	40 °C 10 min	25 °C 30 min
37 °C 30 min	65 °C 1 h	30 °C 10 min	20 °C 30 min
23 °C 30 min	LIDTH OFF	STORE AT 23 °C	STORE AT 8 °C
STORE AT 8 °C	60 °C 1 h		
	55 °C 1 h		
	50 °C 1 h		
	45 °C 1 h		
	40 °C 1 h		
	35 °C 1 h		
	30 °C 1 h		
	25 °C 1 h		
	20 °C 1h		
	STORE AT 8 °C		

E: Verwendete Geräte

AFM:

MultiMode™ Scanning Probe Microscope mit Nanoscope IIIa-Contoller, Digital Instruments, Santa Barbara

NMR:

Bruker 300 UltraShield

Bruker Avance DRX 400

IR:

Vektor 33, Bruker

PAGE:

PerfectBlue™ Twin L, vertikales Doppelsystem, 200 x 200 x 0,8 mm, peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Analytische Agarose Gele:

Vertikales Einzelsystem: GENTERphoresis™, 70 x 66 x 2 mm, GENTERpise Genomics, Mainz

Horizontale Systeme: PerfectBlue™ Maxi M, 200 x 250 mm, peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen / Mini-Sub Cell GT, Bio-Rad Laboratories GmbH, München

E-Gel iBase, Invitrogen

Präparative Agarose Gele:

E-Gel iBase, Invitrogen

Elektrophorese mit kontinuierlicher Elution (CEE):

Prep Cell Model 491, Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Thermocycler:

Heizblock-Thermocycler (bis 200 µl Reaktionsvolumen) Primus 25 advanced, peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen / Wasserbad-Thermocycler Autogene II, Grant Instruments Ltd., Cambridge

Zentrifugen:

Konzentrator: Eppendorf Concentrator 5301

Zentrifuge für 1,5 ml Reaktionsgefäße: Biofuge A, Heraeus Sepatech, Osterode am Harz

Zentrifuge für die Ultrafiltration: Rotina 38 (Rotor 1798), Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

Mikro 220R/Mikro22, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

Ultrazentrifuge: Sorvall Discovery M120SE, Kendor, Hanau

UV-Spektrometer:

Carry 100 Bio UV-Vis Spektrophotometer, Varian Inc.

Eppendorf BioPhotometer, Eppendorf

MALDI-TOF MS:

TofSpec E, Micromass

F: Spektren

Charakterisierung der verwendeten monodispersen Oligoethylenoxide $n = 16$ bzw. 32 mittels

Maldi-Tof:

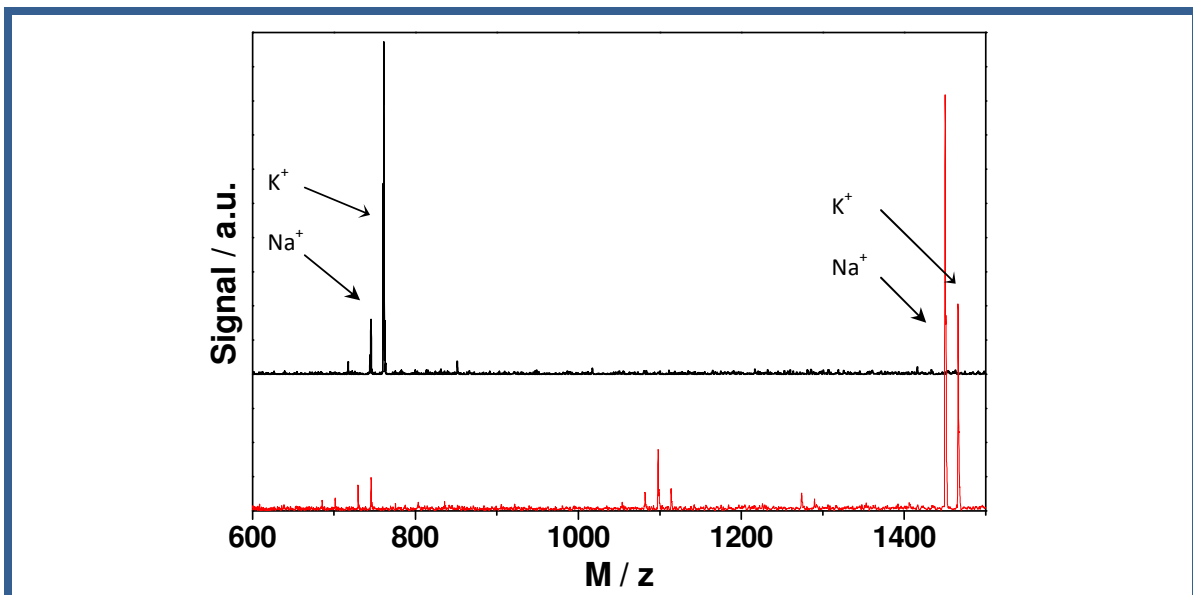


Abb. 7.1. MALDI-ToF Spektrum von $H_2N-EG_{16}-OH$ (schwarz) und $NH_2-EG_{32}-OH$ (rot) im Reflektoren Modus, Matrix: HABA, Salz: Kaliumtrifluoracetat (Matrixpräparation siehe exp. Teil).

Nachweis der Tfa-Gruppe am Polypropylenoxid mittels ^{19}F -NMR und IR-Spektroskopie:

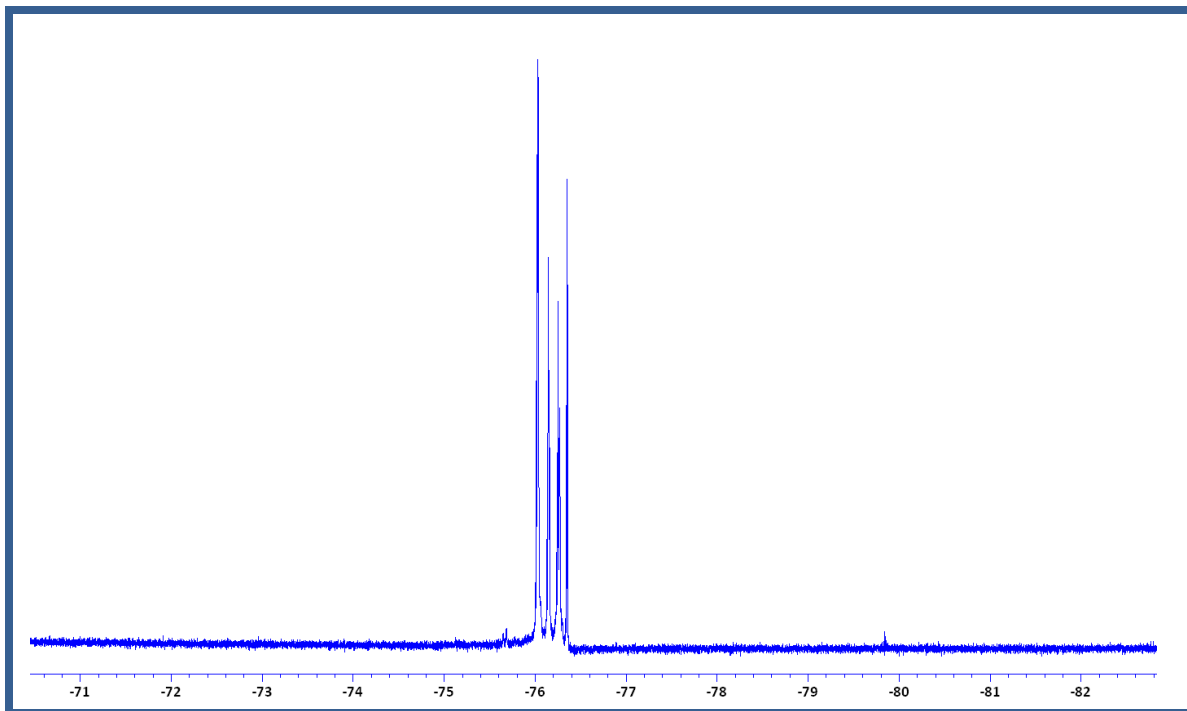


Abb. 7.2. ^{19}F -NMR-Spektrum des Reaktionsgemischs aus der Umsetzung des Diaminopolypropylenoxid mit Trifluoressigsäureethylester δ_{F} (ppm): -76,2.

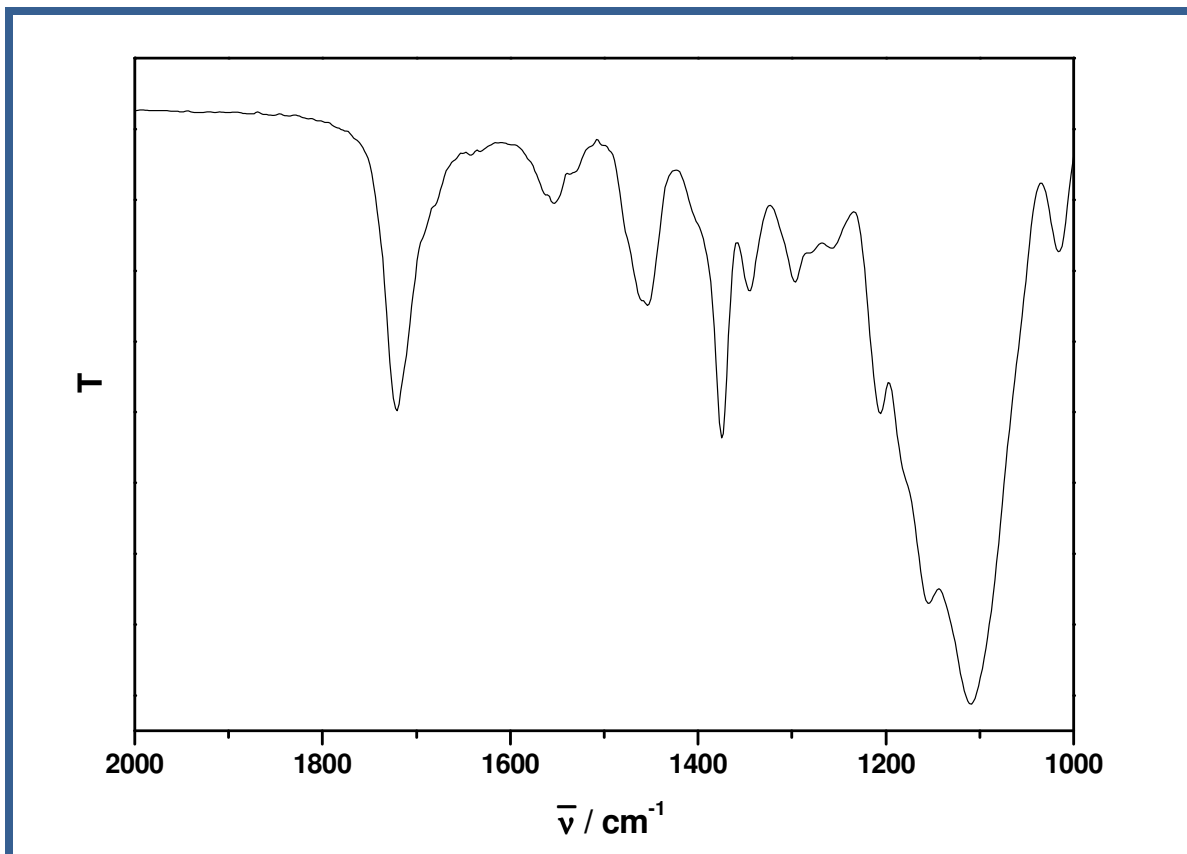


Abb. 7.3. IR-Spektrum zum Nachweis der Tfa-Schutzgruppe am isolierten Mono-Tfa-Diaminopolypropylenoxid.

Plot der Intensitäten zum Beimischexperiment in Abb. 4.38

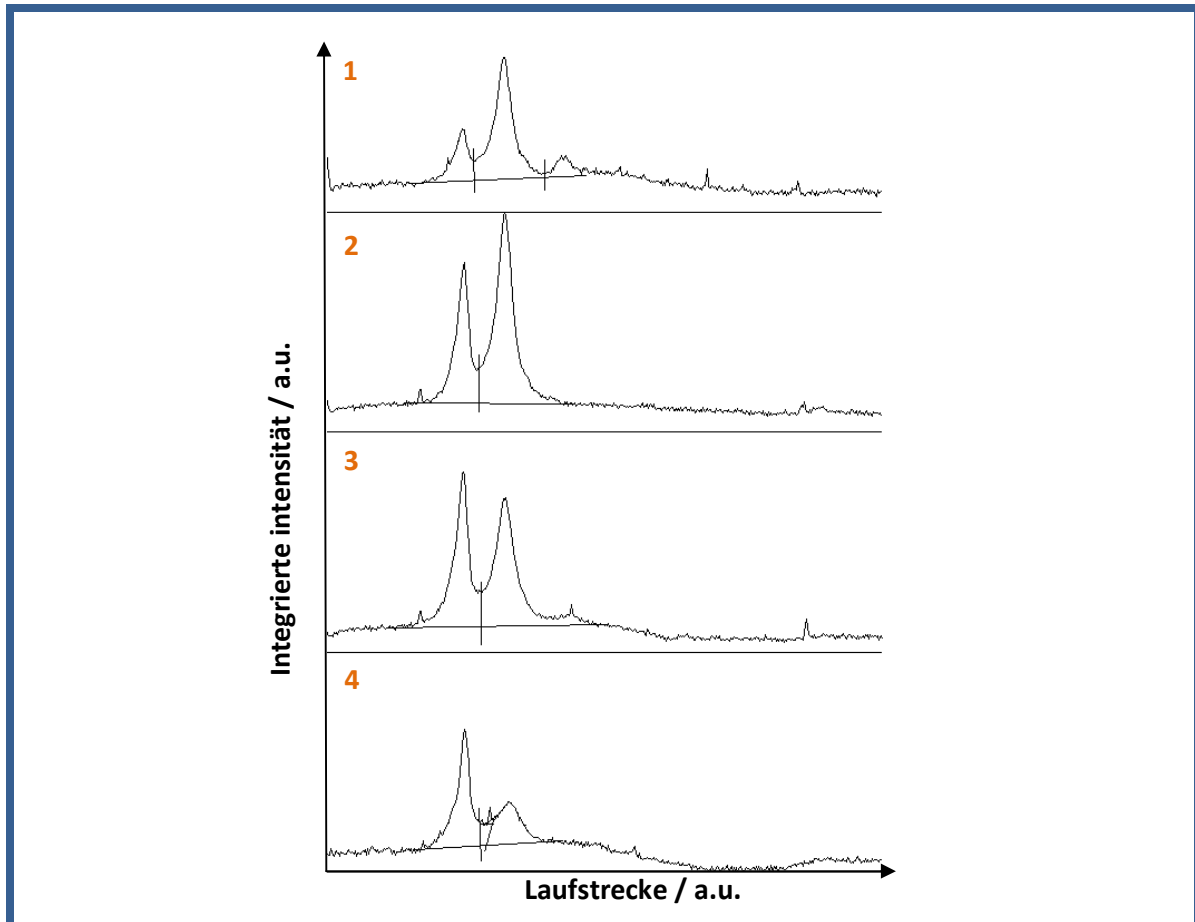


Abb. 7.4. Plot der Intensitäten zur 10% PAGE in Abb. 4.38, die orangenen Zahlen entsprechen der jeweiligen Spur-Nummer.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Seeman, N.C., *DNA in a material world*. Nature, 2003. **421**(6921): p. 427.
2. Seeman, N.C., *Biochemistry and structural DNA nanotechnology: An evolving symbiotic relationship*. Biochemistry, 2003. **42**(24): p. 7259.
3. Seeman, N.C., *Nucleic acid nanostructures and topology*. Angewandte Chemie-International Edition, 1998. **37**(23): p. 3220.
4. Feldkamp, U. and C.M. Niemeyer, *Rational design of DNA nanoarchitectures*. Angewandte Chemie-International Edition, 2006. **45**(12): p. 1856.
5. Simmel, F.C., *Three-dimensional nanoconstruction with DNA*. Angewandte Chemie-International Edition, 2008. **47**(32): p. 5884.
6. Niemeyer, C.M. and M. Adler, *Nanomechanical devices based on DNA*. Angewandte Chemie-International Edition, 2002. **41**(20): p. 3779.
7. Niemeyer, C.M., *Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: Biotechnology meets materials science*. Angewandte Chemie-International Edition, 2001. **40**(22): p. 4128.
8. Seeman, N.C., *Biomolecular Stereodynamics*. R. H. Sarman ed. 1981, New York: Adenine Press.
9. Zhang, Y. and N.C. Seeman, *Construction of a DNA-Truncated Octahedron*. J.Am.Chem.Soc., 1994. **116**(5): p. 1661.
10. Seeman, N.C. and N.R. Kallenbach, *Design of immobile Nucleic Acid Junctions*. BIOPHYS. J., 1983. **44**(201).
11. Chen, J. and N.C. Seeman, *Synthesis from DNA of a molecule with the connectivity of a cube* Nature, 1991. **350**: p. 631.
12. Jaeger, L. and N.B. Leontis, *Tecto-RNA: One-dimensional self-assembly through tertiary interactions*. Angewandte Chemie-International Edition, 2000. **39**(14): p. 2521.
13. Koshkin, A.A. and J. Wengel, *Synthesis of novel 2',3'-linked bicyclic thymine ribonucleosides*. Journal of Organic Chemistry, 1998. **63**(8): p. 2778.
14. Nielsen, P.E., et al., *Sequence-Selective Recognition of DNA by Strand Displacement with a Thymine-Substituted Polyamide*. Science, 1991. **254**(5037): p. 1497.
15. Pitsch, S., et al., *Why Pentose-Nucleic and Not Hexose-Nucleic Acids .7. Pyranosyl-Rna (P-Rna)*. Helvetica Chimica Acta, 1993. **76**(6): p. 2161.
16. Fu, T.J. and N.C. Seeman, *DNA Double-Crossover Molecules*. Biochemistry, 1993. **32**(13): p. 3211.
17. Li, X.J., et al., *Antiparallel DNA double crossover molecules as components for nanoconstruction*. Journal of the American Chemical Society, 1996. **118**(26): p. 6131.
18. Seeman, N.C., *DNA engineering and its application to nanotechnology*. Nanotechnologie, 1999. **17**: p. 437.
19. Seeman, N.C. **Volume**, DOI: <http://seemanlab4.chem.nyu.edu/cross.html>
20. Kuzuya, A., et al., *Six-helix and eight-helix DNA nanotubes assembled from half-tubes*. Nano Letters, 2007. **7**(6): p. 1757.
21. Mathieu, F., et al., *Six-helix bundles designed from DNA*. Nano Letters, 2005. **5**(4): p. 661.
22. Rothmund, P.W.K., *Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns*. Nature, 2006. **440**: p. 297.
23. Yan, H., et al., *Directed nucleation assembly of DNA tile complexes for barcode-patterned lattices*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(14): p. 8103.

24. Douglas, S.M., J.J. Chou, and W.M. Shih, *DNA-nanotube-induced alignment of membrane proteins for NMR structure determination*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(16): p. 6644.
25. Shih, W.M., J.D. Quispe, and G.F. Joyce, *A 1.7-kilobase single-stranded DNA that folds into a nanoscale octahedron*. Nature, 2004. **427**(6975): p. 618.
26. Zhang, Z., P. Fullhart, and C.A. Mirkin, *Reversible and Chemically Programmable Micelle Assembly with DNA Block-Copolymer Amphiphiles*. Nano Letters, 2004. **4**(6): p. 1055.
27. Park, S.Y., et al., *DNA-programmable nanoparticle crystallization*. Nature, 2008. **451**(7178): p. 553.
28. Li, Z., et al., *Reversible and chemically programmable micelle assembly with DNA block-copolymer amphiphiles*. Nano Letters, 2004. **4**(6): p. 1055.
29. Alemdaroglu, F.E., et al., *DNA multiblock copolymers*. Chemical Communications, 2007(13): p. 1358.
30. Alemdaroglu, F.E. and A. Herrmann, *DNA meets synthetic polymers - highly versatile hybrid materials*. Organic & Biomolecular Chemistry, 2007. **5**(9): p. 1311.
31. Immoos, C.E., S.J. Lee, and M.W. Grinstaff, *DNA-PEG-DNA Triblock Macromolecules for Reagentless DNA Detection*. J. Am. Chem. Soc., 2004. **126**(35): p. 10814.
32. Watson, K.J., et al., *DNA-Block Copolymer Conjugates*. J. Am. Chem. Soc., 2001. **123**(23).
33. Gibbs, J.M., et al., *Polymer-DNA Hybrids as Electrochemical Probes for the Detection of DNA doi:10.1021/ja046931i*. Journal of the American Chemical Society, 2005. **127**(4): p. 1170.
34. Gibbs, J.M., et al., *DNA Hybrids as Electrochemical Probes for the Detection of DNA*. Journal of the American Chemical Society, 2005. **127**(4): p. 1170.
35. Ding, K., et al., *Engineering the structural properties of DNA block copolymer micelles by molecular recognition*. Angewandte Chemie-International Edition, 2007. **46**(7): p. 1172.
36. Ballico, M., et al., *Postsynthetic Conjugation of Biopolymers with High Molecular Mass Poly(ethylene glycol): Optimization of a Solution Process Tested on Synthetic Oligonucleotides*. Bioconjugate Chem., 2003. **14**: p. 1038.
37. Jeong, J.H. and T.G. Park, *Novel Polymer-DNA Hybrid Polymeric Micelles Composed of Hydrophobic Poly(D,L-lactic-co-glycolic Acid) and Hydrophilic Oligonucleotides*. Bioconjugate Chem., 2001. **12**(6): p. 917.
38. Jeong, J. and T. Park, *Novel Polymer-DNA Hybrid Polymeric Micelles Composed of Hydrophobic Poly(D,L-lactic-co-glycolic Acid) and Hydrophilic Oligonucleotides*. Bioconjugate Chem., 2001. **12**(6): p. 917.
39. Alemdaroglu, F.E., et al., *DNA-Templated Synthesis in Three Dimensions: Introducing a Micellar Scaffold for Organic Reactions*. 2006.
40. Ding, K., et al., *Engineering the Structural Properties of DNA Block Copolymer Micelles by Molecular Recognition*. Angew. Chem. Int. Ed., 2007. **46**: p. 1172.
41. Alemdaroglu, F.E., et al., *Cellular Uptake of DNA Block Copolymer Micelles with Different Shapes*. Macromol. Rapid Commun., 2008. **29**: p. 326.
42. Ergen, E., et al., *Twin probes as a novel tool for the detection of single-nucleotide polymorphisms*. Chemistry-a European Journal, 2006. **12**(14): p. 3707.
43. Fogleman, E.A., et al., *Modular, well-behaved reversible polymers from DNA-based monomers*. Angewandte Chemie-International Edition, 2002. **41**(21): p. 4026.

44. Immoos, C.E., S.J. Lee, and M.W. Grinstaff, *DNA-PEG-DNA triblock macromolecules for reagentless DNA detection*. Journal of the American Chemical Society, 2004. **126**(35): p. 10814.
45. Xu, J., E.A. Fogleman, and S.L. Craig, *Structure and Properties of DNA-Based Reversible Polymers*. Macromolecules, 2004. **37**: p. 1863.
46. Alemdaroglu, F.E., *DNA Block Copolymers- Synthesis, Morphologies and Applications*, in *Johannes Gutenberg Universität*. 2007, Johannes Gutenberg Universität: Mainz.
47. Bergmann, F. and W. Bannwarth, *Solid Phase Synthesis of Directly Linked Peptide-Oligodeoxynucleotide Hybrids Using Standard Synthesis Protocols*. Tetrahedron Letters, 1995. **36**(11): p. 1839.
48. Heimann, N., *Strukturbildung durch Selbstorganisation von Oligonukleotiden*. 2008, Mainz: Mainz.
49. Kiefer, T., *Synthese monodisperser heterobifunktionaler Polyethylenoxide als Blockbausteine für Oligonukleotid-PEO-Blockcopolymere*, in *Institut f. phys. Chemie*. 2006, Johannes Gutenberg-Universität: Mainz.
50. Lin, C.X., et al., *DNA tile based self-assembly: Building complex nanoarchitectures*. Chemphyschem, 2006. **7**(8): p. 1641.
51. Gothelf, K.V. and T.H. LaBean, *DNA-programmed assembly of nanostructures*. Organic & Biomolecular Chemistry, 2005. **3**(22): p. 4023.
52. Mann, S., *Self-assembly and transformation of hybrid nano-objects and nanostructures under equilibrium and non-equilibrium conditions*. Nature Materials, 2009. **8**(10): p. 781.
53. Cao, Y.C., et al., *Raman Dye-Labeled Nanoparticle Probes for Proteins*. Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(48): p. 14676.
54. Keren, K., et al., *DNA-templated carbon nanotube field-effect transistor*. Science, 2003. **302**(5649): p. 1380.
55. Lodge, T.P., *Block Copolymers: Past Successes and Future Challenges*. Macromol. Chem. Phys., 2003. **204**: p. 265.
56. Matsen, M.W. and F.S. Bates, *Unifying Weak- and Strong-Segregation Block Copolymer Theories*. Macromolecules, 1996. **29**(4): p. 1091.
57. Elias, H.G. Makromoleküle - Band 1. Vol. 5. Auflage. 1990, Basel, Heidelberg, New York: Hüthig & Wepf Verlag. 791.
58. Discher, D.E. and A. Eisenberg, *Polymer Vesicles*. Science, 2002. **297**(967): p. 967.
59. Jain, S. and F.S. Bates, *On the Origins of Morphological Complexity in Block Copolymer Surfactants*. Science, 2003. **300**(460): p. 460.
60. Israelachvili, J.N., D.J. Mitchell, and B.W. Ninham, *Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers*. J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2, 1976. **72**: p. 1525.
61. Kataoka, K., A. Harada, and Y. Nagasaki, *Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2001. **47**: p. 113.
62. Lindahl, T., *Instability and decay of the primary structure of DNA*. Nature, 1993. **362**: p. 709.
63. Lindahl, T. and B. Nyberg, *Rate of Depurination of Native Deoxyribonucleic Acid*. Biochemistry, 1972. **11**(19): p. 3610.
64. Joyce, G.F., *RNA evolution and the origins of life*. Nature, 1989. **338**: p. 217.
65. Nelson, K.E., M. Levy, and S.L. Miller, *Peptide nucleic acids rather than RNA may have been the first genetic molecule*. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 2000. **97**(8): p. 3868.
66. Orgel, L., *A Simpler Nucleic Acid*. Science, 2000. **290**(5495): p. 1306.

67. Pace, N.R., *Origin of Life - Facing Up to the Physical Setting*. Cell, 1991. **65**: p. 531.
68. Steger, G., *Bioinformatik: Methoden zur Vorhersage von RNA- und Proteinstrukturen*. 2003, Basel, Boston, Berlin: Birkhäuser Verlag.
69. Yakovchuk, P., E. Protozanova, and M.D. Frank-Kamenetskii, *Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix*. Nucleic Acids Research 2006. **34**(2): p. 564.
70. Vologodskaia, M. and A. Vologodskii, *Contribution of the intrinsic curvature to measured DNA persistence length*. Journal of Molecular Biology, 2002. **317**(2): p. 205.
71. Taylor, W.H. and P.J. Hagerman, *Application of the method of phage T4 DNA ligase-catalyzed ring-closure to the study of DNA structure : II. NaCl-dependence of DNA flexibility and helical repeat*. Journal of Molecular Biology 1990. **212**: p. 363.
72. Bowater, R.P., *DNA Structure*. Encyclopedia of the Human Genome. 2003.
73. Hoogsteen, K., *The crystal and molecular structure of a hydrogen-bonded complex between 1-methylthymine and 9-methyladenine*. Acta Cryst., 1963. **16**: p. 907.
74. Sinden, R.R., *DNA- Structure and Funktion*. 1994, San Diego: Academic Press.
75. Munk, *Genetic*. 2010: Georg Thieme Verlag KG.
76. Owczarzy, R., *Melting temperatures of nucleic acids: Discrepancies in analysis*. Biophysical Chemistry, 2005. **117**(3): p. 207.
77. Owczarzy, R., et al., *Effects of Sodium Ions on DNA Duplex Oligomers: Improved Predictions of Melting Temperatures*. Biochemistry, 2004. **43**(12): p. 3537.
78. Wetmur, J.G. and N. Davidson, *Kinetics of Renaturation of DNA*. J. Mol. Biol., 1968. **31**: p. 349.
79. Marmur, J. and P. Doty, *Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature*. Journal of Molecular Biology, 1962. **5**(1): p. 109.
80. Marky, L.A. and K.J. Breslauer, *Calculating Thermodynamic Data for Transitions of any Molecularity from Equilibrium Melting Curves*. Biopolymers, 1987. **26**: p. 1601.
81. Wartell, R.M. and A.S. Benight, *Thermal denaturation of DNA molecules: A comparison of theory with experiment*. Physics Reports, 1985. **126**(2): p. 67.
82. Worcesteryz, B.H.a.D., *The Denaturation Transition of DNA in Mixed Solvents*. Biophysical Journal, 2006. **91**: p. 2237.
83. Wu, P. and N. Sugimoto, *New thermodynamic characterization and transition mechanism of DNA duplex formation*. Nucleic Acids Symposium Series, 2000. **44**: p. 15.
84. Zhou, J., et al., *Conformational Changes in Single-Strand DNA as a Function of Temperature by SANS*. Biophysical Journal, 2006. **90**: p. 544.
85. Benight, A.S., et al., *Calculating sequence-dependent melting stability of duplex DNA oligomers and multiplex sequence analysis by graphs* *Methods in Enzymology*, in *Drug-Nucleic Acid Interactions*, J.B.C.a.M.J. Waring, Editor. 2001, Academic Press. p. 165.
86. Marky, L.A. and K.J. Breslauer, *Calculating Thermodynamic Data for Transitions of any Molecularity from Equilibrium Melting Curves*. Biopolymers, 1987. **26**: p. 1601.
87. Eppendorf. [Bedienungsanleitung:] [cited.
88. *Definitions and Physical Models*. [Applications / Instructions (Hyperlink "Definitions" in OligoAnalyzer 3.1)] [cited; Available from: <http://eu.idtdna.com/Analyzer/Applications/Instructions/Default.aspx?AnalyzerDefinitions=true>.
89. Saffran, W.A., M. Goldenberg, and C.R. Cantor, *Site-Directed Psoralen Crosslinking of DNA*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences, 1982. **79**(15): p. 4594.

90. Kallansrund, G. and B. Ward, *A Comparison of Measured and Calculated Single- and Double-Stranded Oligodeoxynucleotide Extinction Coefficients*. Anal. Biochem., 1996. **236**: p. 134.
91. Murphy, J.H. and T.L. Trapane, *Concentration and Extinction Coefficient Determination for Oligonucleotides and Analogs Using a General Phosphate Analysis*. Anal. Biochem., 1996. **240**(273-282).
92. Devor, E.J. and M.A. Behlke. *Oligonucleotide Yield, Resuspension, and Storage*. [Technical Bulletin] 2005 [cited; Available from: http://eu.idtdna.com/support/technical/TechnicalBulletinPDF/Oligonucleotide_Yield_Resuspension_and_Storage.pdf].
93. Tataurov, A.V., Y. You, and R. Owczarzy, *Predicting ultraviolet spectrum of single stranded and double stranded deoxyribonucleic acids*. Biophysical Chemistry, 2008. **133**(1-3): p. 66.
94. Schaller, H., G. Weimann, and H.G. Khorana, J. Am. Chem. Soc, 1963. **85**: p. 430.
95. Khorana, H.G., *Total synthesis of a gene*. Science, 1979. **203**: p. 614.
96. Beaucage, S.L. and M.H. Caruthers, *Deoxynucleoside phosphoramidites - A new class of key intermediates for deoxyligonucleotide synthesis*. Tetrahedron Letters, 1981. **22**(20): p. 1859.
97. McBride, L.C. and M.H. Caruthers, *An investigation of several deoxynucleoside phosphoramidites useful for synthesizing deoxyligonucleotides*. Tetrahedron Letters, 1983. **24**(3): p. 245.
98. Letsinger, R.L., K.K. Ogilvie, and P.S. Miller, J. Am. Chem. Soc, 1969. **91**(12): p. 3360.
99. Letsinger, R.L., et al., J. Am. Chem. Soc, 1975. **97**: p. 3278.
100. Williamson, J.R., M.K. Raghuraman, and T.R. Cech, Cell, 1989. **59**: p. 871.
101. Sundquist, W.I. and A. Klug, Nature, 1989. **342**: p. 827.
102. Thomas Kofoed, H.F.H., Henrik Ørum, Troels Koch,, *PNA synthesis using a novel Boc/acyl protecting group strategy*. Journal of Peptide Science, 2001. **7**(8): p. 402.
103. Koo, H.-S., H.-M. Wu, and D.M. Crothers, *DNA bending at adenine o thymine tracts*. Nature, 1986. **320**: p. 501.
104. Htun, H. and J.E. Dahlberg, *Single Strands, Triple Strands, and Kinks in H-DNA*. Science, 1988. **241**: p. 1791.
105. Lyamichev, V.I., S.M. Mirkin, and M.D. Frank-Kamenetskii, *Structures of homopurine-homopyrimidine tract in superhelical DNA*. J. Biomol. Struct. Dyn., 1985. **3**: p. 327.
106. Feldkamp, U., H. Rauhe, and W. Banzhaf, *Software Tools for DNA Sequence Design*. Genetic Programming and Evolvable Machines, 2003. **4**: p. 153.
107. Seeman, N.C., *De Novo Design of Sequences for Nucleic Acid Structural Engineering*. Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, 1990. **8**(3): p. 573.
108. Kleppe, K., et al., *Studies on Polynucleotides XCVI. Repair Replication of Short Synthetic DNA's as catalyzed by DNA Polymerases*. J. Mol. Biol., 1971. **56**: p. 341.
109. Saiki, R.K., et al., *Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase*. Science, 1988. **239**(487).
110. Brownie, J., et al., *The elimination of primer-dimer accumulation in PCR*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(16): p. 3235.
111. Little, J.W., et al., *Enzymatic joining of DNA strands, II. An enzyme-adenylate intermediate in the *dpn*-dependent DNA ligase reaction*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1967. **58**(5): p. 2004.
112. Tomkinson, A.E., et al., *DNA Ligases: Structure, Reaction Mechanism, and Function*. Chem. Rev., 2006. **106**(2): p. 687.

113. Tiselius, A., *A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures*. Transactions of the Faraday Society 1937. **33**: p. 524.
114. Lottspeich, F. and J.W. Engels, *Bioanalytik*. 2006, München: Elsevier GmbH.
115. Westermeier, R., *Elektrophoresepraktikum*. 1990, Weinheim: VCH.
116. Huang, Q. and W.-L. Fu, *Comparative analysis of the DNA staining efficiencies of different fluorescent dyes in preparative agarose gelelectrophoresis*. Clin Chem Lab Med, 2005. **43**(8): p. 841.
117. Cunningham, L., K. Kittikamron, and Y. Lu, *Preparative-scale purification of RNA using an efficient method which combines gel electrophoresis and column chromatography* Nucl. Acids Res., 1996. **24**(18): p. 3647.
118. Schlax, P.E., M.W. Capp, and M.T. Record, *Preparative-Scale Purification of DNA Restriction Fragments by Continous-Flow Gel Electrophoresis*. BioTechniques, 1995. **18**(1): p. 94.
119. Elias, H., *Makromoleküle*. 6 ed. Vol. 2. 2001, Weinheim: Wiley-VCH.
120. Elias, H.G., *Makromoleküle, Band 1: Chemische Struktur und Synthese*. 1999, Weinheim: Wiley-VCH.
121. Kinugasa, S., et al., *Preparation and Charakterisation of Oligo(ethylene glycol)s*. 2. Macromolecules, 1992. **25**: p. 4848.
122. M. Matteucci and M. Caruthers, J. Am. Chem. Soc., 1981. **103**: p. 3185.
123. R. Letsinger, et al., J. Am. Chem. Soc., 1975. **97**: p. 3278.
124. Lebedev, A.V., D.C. Combs, and R.I. Hogrefe, *Preactivated Carboxyl Linker for the Rapid Conjugation of Alkylamines to Oligonucleotides on Solid Support*. Bioconjugate Chem., 2007. **18**: p. 1530.
125. *Bioconjugation Protocols*. Strategies and Methods, ed. C.M. Niemeyer. Vol. 283. 2004, Totowa, New Jersey: Humana Press.
126. Erkki, N. and L. Harri, *Mechanisms of the substitution reactions of phosphoramidites and their congeners*. Journal of Physical Organic Chemistry, 2004. **17**(1): p. 1.
127. Nurminen, E.J., J.K. Mattinen, and H. Lönnberg, *Kinetics and mechanism of tetrazole-catalyzed phosphoramidite alcoholysis*. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 1998: p. 1621.
128. Curphey, T.J., *Trifluoroacetylation of amino acids and peptides by ethyl trifluoroacetate*. The Journal of Organic Chemistry, 1979. **44**(15): p. 2805.
129. Kisakürek, M.V. and H. Rosemeyer, *Perspectives in Nucleoside and Nucleic Acid Chemistry*, ed. M.V. Kisakürek and H. Rosemeyer. 2001: Helvetica Chimica Acta / Wiley-VCH.
130. Kanemitsu, T., C.-H. Wong, and O. Kanie, *Solid-Phase Synthesis of Oligosaccharides and On-Resin Quantitative Monitoring Using Gated Decoupling ¹³C NMR*. J. Am. Chem. Soc., 2002. **124**(14): p. 3591.
131. Gross, H. and L. Bilk, *Zur Reaktion von N-Hydroxysuccinimid mit Dicyclohexylcarbodiimid*. Tetrahedron, 1968. **24**(24): p. 6935.
132. Fong, R.B., et al., *Thermoprecipitation of Streptavidin via Oligonucleotide-Mediated Self-Assembly with Poly(N-isopropylacrylamide)*. Bioconjugate Chem., 1999. **10**(5): p. 720.
133. Lehn, J.M., *Perspectives in Supramolecular Chemistry - from Molecular Recognition Towards Molecular Information-Processing and Self-Organization*. Angewandte Chemie-International Edition in English, 1990. **29**(11): p. 1304.
134. Xu, J., E.A. Fogleman, and S.L. Craig, *Structure and Properties of DNA-Based Reversible Polymers*. Macromolecules, 2004. **37**(5): p. 1863.
135. Beckman and Coulter, <http://www.beckmancoulter.com/Literature/BioResearch/NL-8721A.pdf>, in P/ACE Setter. 2000. p. 1.

136. *OligoAnalyzer 3.1*. [Online Tool] [cited; Available from: <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>.
137. Pon, R.T. and S. Yu, *Tandem oligonucleotide synthesis using linker phosphoramidites*. *Nucleic Acids Res*, 2005. **33**(6): p. 1940.
138. Bintzler, D.A. and C.E. Terrell, *10-nmol Oligonucleotide Synthesis for the ABI Model 394 DNA Synthesizer*. *J. Biomol. Tech.*, 2000. **11**(3): p. 122.
139. Allen, S.D., T.M. Luebke, and S.D. Rose. *UltramersTM - The Longest Oligonucleotides Available with Mass Spectrometry QC*. [Technical Report] 2007 [cited; Available from: http://eu.idtdna.com/home/Ultramers_Technical_Report_IDT.pdf.
140. Cheng, S., et al., *Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1994. **91**(12): p. 5695.
141. Feldkamp, U., et al., *Microarray-based in vitro evaluation of DNA oligomer libraries designed in silico*. *Chemphyschem*, 2004. **5**(3): p. 367.
142. Seeman, N.C., *Denovo Design of Sequences for Nucleic-Acid Structural-Engineering*. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 1990. **8**(3): p. 573.
143. Drioli, S., et al., *Liquid-phase synthesis and characterization of a conjugated chimeric oligonucleotide-PEG-peptide*. *European Journal of Organic Chemistry*, 2002(20): p. 3473.
144. Cline, J., J.C. Braman, and H.H. Hogrefe, *PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases*. *Nucleic Acids Res*, 1996. **24**(18): p. 3546.
145. Alemdaroglu, F.E., et al., *Generation of Multiblock Copolymers by PCR: Synthesis, Visualization and Nanomechanical Properties*. *Nano Letters*, 2009. **9**(10): p. 3658.
146. Safak, M., et al., *Polymerase chain reaction as an efficient tool for the preparation of block copolymers*. *Advanced Materials*, 2007. **19**(11): p. 1499.
147. Winkler, F.K., *Structure and function of restriction endonucleases*. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1992. **2**: p. 93.
148. Smith, H.O., *Nucleotide Sequence Specificity of Restriction Endonucleases*. *Science*, 1979. **205**: p. 455.
149. Pingoud, A., J. Alves, and R. Geiger, *Restriction Enzymes*. In *Enzymes in Molecular Biology*. M. M. Burrell ed. 1991: Humana Press.
150. Bennet, S. and S.E. Halford, *Recognition of DNA by Type II Restriction Enzymes*. *Curr. Top. Cell. Regul.*, 1989. **30**: p. 57.
151. Ailenberg, M., N.M. Goldenberg, and M. Silverman, *Description of PCR-based technique for DNA splicing and mutagenesis by producing 5' overhangs with run through stop DNA synthesis utilizing Ara-C*. *BMC Biotechnology*, 2005. **5**:23.
152. Donahue, W.F., B.M. Turczyk, and K.A. Jarrell, *Rapid gene cloning using terminator primers and modular vectors*. *Nucleic Acids Res*, 2002. **30**:e95.
153. Coljee, V.W., et al., *Seamless gene engineering using RNA- and DNA-overhang cloning*. *Nat. Biotechnol.*, 2000. **18**: p. 789.
154. Gál, J., et al., *Directional cloning of native PCR products with preformed sticky ends (Autosticky PCR)*. *Mol Gen Genet*, 1999. **260**: p. 569.
155. Davis, J.T., *40 Jahre G-Quartetts: von 5-GMP zur Molekularbiologie und Supramolekularen Chemie*. *Angewandte Chemie*, 2004. **116**(6): p. 684.
156. Green, N.M., *Methods Enzymol*, 1990. **184**: p. 51.
157. Holmberg, A., et al., *The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures*. *Electrophoresis*, 2005. **26**: p. 501.
158. Okahata, Y., et al., *Kinetic Measurements of DNA Hybridization on an Oligonucleotide-Immobilized 27-MHz Quartz Crystal Microbalance*. *Anal. Chem.*, 1998. **70**(70): p. 1288.

159. Richardson, C.C., *Phosphorylation of Nucleic Acid by an Enzyme from T4 Bacteriophage-Infected Escherichia coli*. PNAS, 1965. **54**: p. 158.
160. Bürger, K., Z. Anal. Chem., 1963. **196**: p. 251.
161. Bürger, K., Z. Anal. Chem., 1967. **224**: p. 421.
162. Dietrich, J. and H. Sucker, Pharm. Ind., 1972. **34**: p. 117.
163. Neissner, R., Pharm. Ind., 1969. **31**: p. 724.
164. Thoma, K., Scientia Pharmaceutica, 1964. **32**: p. 216.
165. *Your universally applicable Polymer*. [Broschüre] [cited; Available from: <http://fun.clariant.com>].
166. *chemagen BiopolymerTechnologie AG*. [cited; Available from: http://www.chemagen.com/fileadmin/downloads/M-PVA_SAVx.pdf].

DANKSAGUNG

Ein ganz herzliches Dankeschön an alle,
die mir durch ihr Interesse,
Tipps und konkrete Hilfestellung
Gedult und Erfahrung
bei der Durchführung und Erstellung dieser Arbeit geholfen haben.

