

Strukturbildung durch Selbstorganisation von Oligonukleotiden

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

im Promotionsfach Chemie

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

Nils Heimann

Geb. in Mainz

Mainz, 2008

Dekan: XXXXX

1. Berichterstatter: XXXXXXXX

2. Berichterstatter: XXXXXXXX

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Dezember 2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zielsetzung	8
2	Theoretische Grundlagen	13
2.1	Der Aufbau von Nukleinsäuren	13
2.1.1	Desoxyribonukleinsäure (DNA).....	13
2.1.2	Ribonukleinsäure (RNA).....	14
2.1.3	Andere Nukleinsäuren	16
2.1.4	Nukleinsäuren als Bausteine in supramolekularen Strukturen.....	16
2.2	Helixkonformationen	17
2.3	Verzweigte DNA Strukturen	22
2.4	Molekulargenetische Grundlagen	26
2.4.1	DNA-Nukleasen	27
2.4.1.1	Exonukleasen.....	27
2.4.1.2	Endonukleasen.....	27
2.4.2	DNA-Ligasen	29
2.4.3	DNA-Polymerasen	29
2.4.4	Modifikationsenzyme	30
2.5	Die Klonierung von DNA	31
2.6	Die Polymerase Kettenreaktion (PCR)	36
2.6.1	Sanger-Sequenzierung.....	39
2.7	Chemische Synthese von Oligonukleotiden	40
2.8	Sequenzdesign	44
2.9	Konzentrationsbestimmung	46

3	Ergebnisse und Diskussion	53
3.1	Biosynthetische Blockcopolymere.....	53
3.1.1	Kopplung von Oligonukleotiden mit Polyethylenoxid	55
3.1.2	Einseitig geschütztes α,ω -Diaminopolyethylenoxid.....	56
3.1.3	Synthese von DNA-PEO-Diblockcopolymeren.....	63
3.1.4	Kopplung zu asymmetrischen DNA ¹ -PEO-DNA ² -Triblockpolymeren.....	68
3.1.5	Kombination von Kopplung und Festphasensynthese	72
3.1.6	Zusammenfassung und Ausblick.....	81
3.2	Lineare DNA-Strukturen aus Oligonukleotiden	86
3.2.1	Verknüpfung von kleinen dsDNA-Segmenten über Polyethylenoxid-Linker	86
3.2.2	Ligation der supramolekularen Hybridstruktur.....	92
3.2.3	Untersuchung der supramolekularen Hybridstruktur in Lösung.....	94
3.2.4	Zusammenfassung und Ausblick.....	96
3.3	Lineare Strukturen aus dsDNA Fragmenten	99
3.3.1	Erzeugung von dsDNA Fragmenten durch Restriktion	99
3.3.1.1	Amplifikation durch PCR.....	101
3.3.1.2	DNA Vervielfältigung durch Transformation von E. coli	104
3.3.2	Einführung überstehender Enden durch Ligation mit Oligonukleotiden	108
3.3.3	Mögliche Modifikationen des Ligationsexperiments.....	112
3.3.4	Zusammenfassung.....	113
3.4	Integration neuer Sequenzabschnitte durch PCR.....	115
3.4.1	PCR mit uridinmodifizierten Primern	118
3.4.2	Aufarbeitung von PCR-Lösungen	122
3.4.2.1	Selektive Adsorption an Silika.....	122
3.4.2.2	Dialyse.....	122
3.4.2.3	Ultrafiltration.....	122
3.4.2.4	Selektive Fällung mit Roti [®] -PCR Clean	123
3.4.3	USER-Reaktion und Nachweis der sticky-ends.....	124
3.4.3.1	Nachweisversuche mit fluoreszenzmarkierten Primern	124
3.4.3.2	Nachweis der sticky-ends durch Restriktionsanalyse	130
3.4.3.3	Sequenzierung	133
3.4.4	Hybridisierungsversuche	135

3.4.4.1	Dimerisierung eines PCR-Produktes durch Linker-Oligos	135
3.4.4.2	Dimerisierung von PCR-Produkten mit komplementären sticky-ends	142
3.4.4.2.1	Hybridisierung bei perfekter Stöchiometrie und 100 % verfügbaren sticky-ends	146
3.4.4.2.2	Stabilität der isolierten Dimerstruktur	148
3.4.4.2.3	Rückbildung der dimeren Struktur nach Denaturierung	150
3.4.5	Zusammenfassung und Ausblick.....	152
3.5	Direkte Einführung von überhängenden Enden	156
3.5.1	PCR mit PEG-modifizierten Primern.....	157
3.5.2	Sequenzierung von PEG-modifizierten PCR-Produkten	164
3.5.3	Hybridisierungsversuche mit PEG-modifizierten PCR-Produkten.....	166
3.5.4	Zusammenfassung	176
3.5.5	Ausblick.....	178
3.6	Verzweigte DNA-Strukturen.....	181
3.6.1	Oligomere Kreuzstrukturen mit überstehenden Enden	182
3.6.2	Hybridisierung eines PCR-Produkts mit der oligomeren Kreuzstruktur.....	190
3.6.3	Direkte Verknüpfung der Kreuzsequenzen mit PCR-Produkten	197
3.6.3.1	Synthese im großen Maßstab	200
3.6.3.2	Identifizierung von Nebenprodukten.....	203
3.6.3.3	Optimierte Aufarbeitung der PCR-Produkte	211
3.6.3.4	Präparative Trennung der Kreuzstruktur von Nebenprodukten	217
3.6.4	Zusammenfassung und Ausblick.....	218
4	Zusammenfassung und Ausblick.....	223
5	Experimenteller Teil.....	229
5.1	Allgemeine Anmerkungen zum Arbeiten mit DNA	229
5.2	Synthese.....	230
5.2.1	Reinigung von Reagenzien und Lösungsmitteln.....	230
5.2.2	Quantitative Einführung der Tfa-Schutzgruppe an 2-Methoxyethylamin	230
5.2.3	Schutzgruppeninversion an Boc-PEO11-NH ₂	231
5.2.3.1	Einführung der Tfa-Schutzgruppe.....	231
5.2.3.2	Abspalten der Boc-Schutzgruppe	232

5.2.4	Kopplung von Polyethylenoxiden an Oligonukleotide	233
5.2.4.1	Kopplung an succinimidylfunktionalisierte Oligonukleotide	233
5.2.4.2	Kopplung nach Aktivierung mit Carbonyldiimidazol.....	235
5.2.4.3	Kopplung nach Aktivierung mit EDC.....	236
5.2.5	Kopplung von DNA-PEO-NH ₂ an succinimidylfunktionalisierte Oligos.....	236
5.3	Vervielfältigung von DNA	237
5.3.1	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	237
5.3.2	Aufarbeitung von PCR-Produkten	239
5.3.2.1	Fällungsreaktionen	239
5.3.2.2	Selektive Adsorption an Silika	241
5.3.2.3	Ultrafiltration.....	241
5.3.2.4	GPC	242
5.3.3	Bakterielle Amplifikation von DNA	242
5.3.3.1	Transformation mit elektrokompenten Zellen.....	242
5.3.3.2	Rückgewinnung von Plasmiden aus Zelllösungen.....	242
5.3.3.2.1	Alkalische Lyse (Whitehead-Protokoll).....	243
5.3.3.2.2	GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas).....	245
5.4	Enzymatische Umsetzungen	246
5.4.1	Sequenzspezifische Erzeugung von Doppelstrangbrüchen.....	246
5.4.2	Sequenzspezifische Erzeugung von Einzelstrangbrüchen	248
5.4.3	Ligation	249
5.4.4	Enzymatische Phosphorylierung von Oligonukleotiden	250
5.4.5	Dephosphorylierung	251
5.5	Analysen- und Trennmethode.....	252
5.5.1	Gelelektrophorese.....	252
5.5.2	CEE (Continuous Elution Electrophoresis).....	254
5.5.3	NMR-Spektroskopie.....	255
5.5.4	AFM	255
5.5.5	Massenspektrometrie.....	256

6 Anhang	259
A: Abkürzungsverzeichnis.....	259
B: Nomenklatur	261
C: Verwendete Fachausdrücke	262
D: Chemikalien, Puffer, Nährmedien und Materialien	269
E: Enzyme und Desoxyribonukleinsäuren.....	271
F: Temperaturprogramme	279
G: Verwendete Geräte	281
Literaturverzeichnis.....	283

1 Einleitung

Jeder Mensch, der beginnt sich mit chemischen Experimenten zu beschäftigen, wird sehr schnell feststellen, dass es enorm schwierig ist, den vielen kleinen Molekülen beizubringen, was sie zu tun und zu lassen haben, obwohl in vielen chemischen Reaktionen lediglich zwei verschiedene Moleküle aufeinander treffen sollen, um ein neues Produkt zu bilden. Dabei ist jeder Chemiker bemüht das passende Ambiente bereitzustellen, es wird geheizt, gekühlt, die Chemikalien werden gereinigt und getrocknet und trotzdem ist es oft schwierig, das erwünschte Produkt zu erhalten. Hier zeigt sich die generelle Problematik nanoskopische bzw. subnanoskopische Prozesse, die sich auf der Größenskala von einzelnen Molekülen abspielen, durch makroskopische Stimuli zu steuern. Wenn es möglich wäre Rührstäbe, Pinzetten, Spatel und Pipetten durch nanoskopische Werkzeuge zu ersetzen, die eine direkte Manipulation von Molekülen zulassen, könnten chemische Reaktionen sehr viel präziser gesteuert und kontrolliert werden. Dieser Gedanke ist eine der grundlegenden Ideen der Nanotechnologie. Der Begriff der „Nanotechnologie“ ist in den letzten Jahren zu einem mehr oder weniger inhaltslosen Modebegriff verkommen. Das Präfix *nano-* ist mittlerweile bei Unternehmen und Wissenschaftlern ähnlich beliebt wie zu seiner Zeit *mikro-* (Microsoft, Persil Color Mikroperls, etc.) oder *e-* (eBanking, eGovernment, eBusiness, etc.). Unter dem Schlagwort Nanotechnologie wird in vielen Fällen jedes Projekt eingeordnet, das sich im weitesten Sinne mit irgendeiner Form von Strukturen im Nanometerbereich beschäftigt. Dabei ist die Nanotechnologie im ursprünglichen Sinne ein sehr visionäres, teilweise futuristisch anmutendes Konzept. Als Urvater der Nanotechnologie wird in der Regel Richard Feynman genannt, der im Dezember 1959 bei einem Treffen der *American Physical Society* am *California Institute of Technology* (Caltech) mit seinem Vortrag „*There's Plenty of Room at the Bottom*“ für ein gewisses Aufsehen sorgte [1, 2]. Feynman spielt mit dem Gedanken der Miniaturisierung. Inwieweit kann die Miniaturisierung als Konzept optimiert werden? Welche grundlegenden Auswirkungen und Möglichkeiten bietet eine drastische Verkleinerung bis in den Bereich weniger Moleküle bzw. Atome? Dabei bezieht er sich in erster Linie auf Speichermedien mit immer höherer Datendichte und auf die Entwicklung von winzigen

mechanischen und elektronischen Bauteilen. Das charmante an seinen Ausführungen ist die Mischung von nicht ganz ernst gemeinten Gedankenexperimenten mit physikalisch fundiertem Wissen: „Wenn es möglich wäre elektronisch gesteuerte Hände zu bauen, die um das vierfache kleiner sind als die eigenen Hände, wäre es ebenso möglich mit diesen Händen Werkzeuge und Bauteile zu konstruieren, mit denen eine neues Paar Hände gebaut werden könnte, das wiederum um einen Faktor vier kleiner ist als das erste Paar.“ Wo liegen die theoretischen Grenzen der Miniaturisierung? Es gibt eine Vielzahl von Arbeiten, die sich mit diesem „top-down“-Ansatz beschäftigen. In erster Linie durch lithographische Methoden sind mittlerweile Strukturen und Bauteile wie Ventile, Mixer und Pumpen im Größenbereich von einigen Mikrometern bis zu einigen hundert Nanometern zugänglich [3-5].

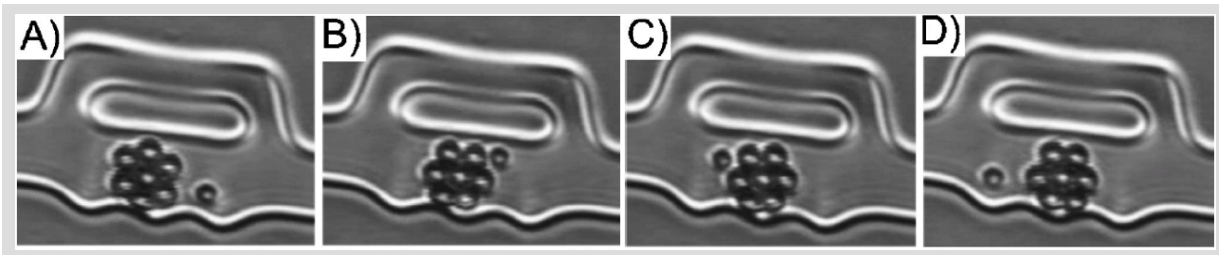


Abb. 1: Beispiel eines mikroskopischen Pumpsystems [3]. Ein Cluster aus sieben superparamagnetischen Partikeln (Partikeldurchmesser: $4,5\ \mu\text{m}$) kann durch ein äußeres magnetisches Feld zur Rotation gebracht werden. Die resultierende Strömung innerhalb des Kanals wird durch den Transport eines Polystyrolpartikels (Durchmesser: $3\ \mu\text{m}$) sichtbar gemacht.

Die Idee von molekularen Maschinen wurde von dem amerikanischen Ingenieur Eric Drexler wieder aufgegriffen und 1986 in seinem Buch „*Engines of Creation*“ veröffentlicht. Seiner Meinung nach kann auf dem Weg vom Großen zum Kleinen das ultimative Ziel der Nanotechnologie, die gezielte Manipulation von Materie auf molekularer Ebene, nicht erreicht werden, da kleinste Fehlstellen mit abnehmender Größe der Struktur eine immer entscheidendere Rolle spielen. Inspiriert von der Selbstorganisation in biologischen Systemen, schlägt er den umgekehrten Weg vor, d.h. den Weg vom Kleinen zum Großen („bottom-up“). In einer Veröffentlichung von 1981 [6] vergleicht er Proteine mit molekularen Maschinen und zeigt Analogien zwischen molekularen und makroskopischen „Bauteilen“ auf. Die Natur demonstriert sehr eindrucksvoll, dass es möglich ist „molekulare Maschinen“ zu entwerfen, die in der Lage sind ganz bestimmte Reaktanden festzuhalten, in die perfekte relative Orientierung zu bringen und gegebenenfalls sogar die notwendige Energie für die chemische Umsetzung bereitzustellen. Die Natur hält außerdem die erforderlichen Werkzeuge bereit um solche „Maschinen“ zu konstruieren. Mit den Methoden der molekularen Genetik ist es prinzipiell möglich die ribosomale Maschinerie von Bakterien für die Produktion von ganz neuen Proteinen zu verwenden. Auch wenn das *Protein-Engineering* zur Zeit ein sehr aktives Forschungsgebiet darstellt, sind bisher die meisten Arbeiten auf eine Modifikation natürlich

vorkommender Proteine ausgerichtet [7-9]. Durch *gerichtete Evolution*, d.h. durch die Einführung zufälliger Mutationen und die Überprüfung der Eigenschaften der erhaltenen Mutanten wird versucht eine Änderung der Regioselektivität, Chemo-selektivität sowie der Substratspezifität, insbesondere gegenüber synthetischen Substraten zu erreichen. Auf dem Weg zu einem rationalen Proteindesign, durch gezielte Änderungen des kodierenden Gens sind bereits erste Erfolge erzielt worden [10, 11]. Die genauen Zusammenhänge zwischen der primären Aminosäuresequenz, der dreidimensionalen Struktur und der Funktion der Proteine sind aber noch lange nicht vollständig verstanden. Wenn irgendwann einmal die grundlegenden Mechanismen der Proteinfaltung und -aktivität aufgeklärt sind, stellt der Ansatz des *Protein-Engineerings* sicherlich eine Methode mit enorm hohem Anwendungspotenzial dar. Drexler spricht sogar schon von einer möglichen zweiten Generation von „Proteinen“ bzw. „molekularen Maschinen“, deren dreidimensionale Struktur kovalent fixiert und evtl. aus ganz anderen Grundbausteinen als den Aminosäuren aufgebaut ist. Der Weg zur perfekten Manipulation von beliebigen Atomgruppen durch proteinanaloge Konstrukte scheint also durchaus realisierbar aber noch relativ weit zu sein.

Geht man hingegen „eine Größenordnung“ weiter nach oben, und versucht vollständige Moleküle in gewünschter Form auszurichten oder miteinander zu kombinieren, ist es sehr viel einfacher Kontakte zu bilden und zu brechen, da die Verknüpfung der einzelnen Komponenten in diesem Fall nicht durch kovalenten Bindungen erfolgt, sondern auf deutlich schwächeren Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrücken, van der Waals-Kräften oder Elektrostatik beruht. Auf dieser Größenskala ist es außerdem nicht erforderlich, die beteiligten Moleküle in eine bestimmte Orientierung zu zwingen, da man sich die Prinzipien der spontanen Selbstorganisation zunutze machen kann. Die zunächst futuristisch anmutende Vision von Drexler, molekulare Einheiten in Analogie zu makroskopisch mechanischen Bauteilen zu verwenden, konnte auf dieser Grundlage bereits in verschiedenen Systemen realisiert werden. Durch Selbstorganisation ist es zum Beispiel gelungen ein modifiziertes Kanalprotein in eine Lipid-Doppelschicht zu integrieren, das durch die Einstrahlung von Licht verschiedener Wellenlängen, wie ein nanoskopisches Ventil mit einem Durchmesser von 3 nm, geöffnet und geschlossen werden kann [12]. Neben den Untersuchungen verschiedener „mechanischer Bauteile“, wie z.B. dem 25 nm großen molekularen Motor, der in vielen Bakterienarten das propellerartige Flagellum antreibt, gibt es zahlreiche andere Ansätze Proteine als funktionelle Einheiten in chemischen oder elektronischen Prozessen zu nutzen [13].

Neben den proteinbasierten Einheiten, die der Natur entnommen werden konnten, wurden bereits neue nanoskopisch-mechanische Bauteile aus DNA konstruiert. Es gibt verschiedene Beispiele für DNA-basierte Strukturen, die durch äußere Stimuli zur Bewegung angeregt werden können. Typische responsive Systeme reagieren in der Regel auf eine Änderung von Salzkonzentrationen, Temperatur, pH-Wert oder auf die Anwesenheit einer bestimmten Molekülsorte. Bei diesen Schaltmechanismen erfolgt eine gleichzeitige Reaktion von allen Systemen, die auf den entsprechenden Stimulus ansprechen. Der große Vorteil bei der Verwendung von DNA liegt in der Möglichkeit viele strukturell gleiche Bauteile nebeneinander durch die Zugabe verschiedener DNA-Sequenzen selektiv ansteuern zu können. So wurde beispielsweise eine „zweibeinige“ DNA-Struktur hergestellt, die durch die Zugabe verschiedener Oligonukleotidsequenzen auf einem „DNA-Fußweg“ vorwärts oder rückwärts läuft [14] und es gibt einen DNA-Nanomotor, der von einer RNA-Sequenz angetrieben, eine pinzettenartige Struktur periodisch öffnet und schließt (Abb. 2) [15].

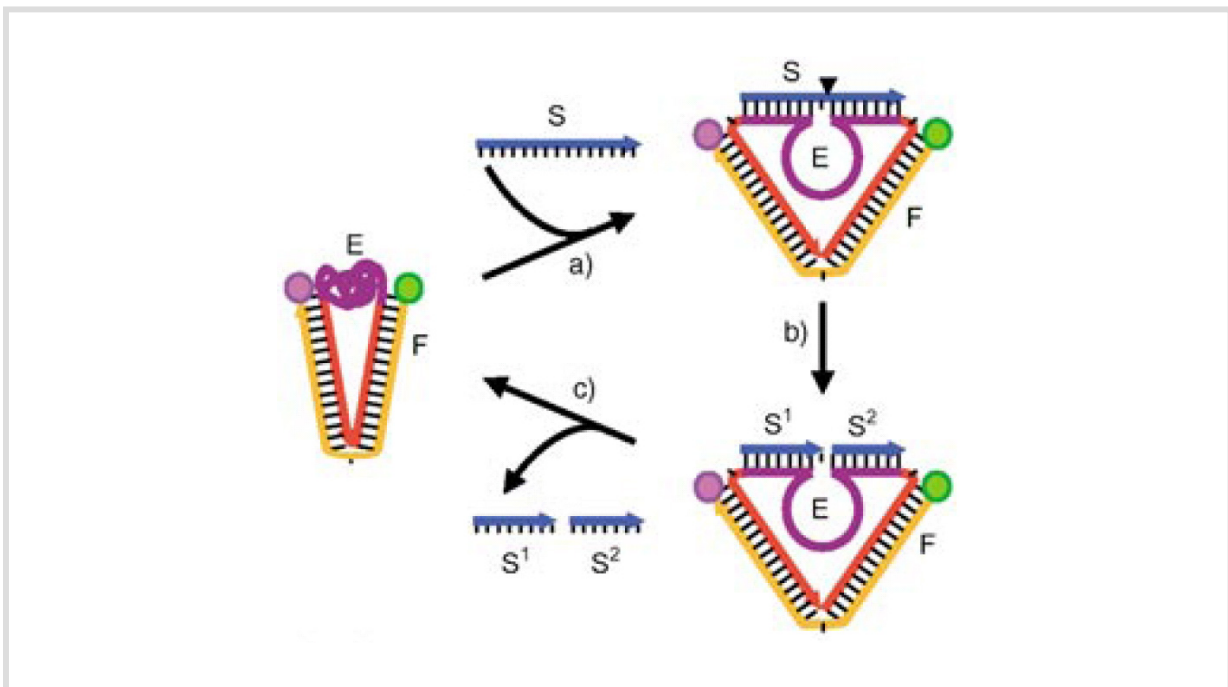


Abb. 2: Pinzettenartiger DNA-Nanomotor [15]. Die gezeigte Struktur ist aus zwei Strängen (E: rosa und orange, F: gelb) aufgebaut. Der Strang F ist mit zwei Fluorophoren funktionalisiert, symbolisch durch die beiden Kreise dargestellt. Der rosa Abschnitt von Strang E ist ein RNA spaltendes DNA-Enzym. Wenn ein Substratstrang (S) an diese Domäne bindet, erfolgt eine Konformationsänderung, die durch FRET-Messungen nachweisbar ist. Das DNA-Enzym spaltet den gebundenen Substratstrang in zwei Fragmente S1 und S2, die von der Struktur abdissoziieren. Dabei geht der Nanomotor wieder in den Ausgangszustand zurück und ist in der Lage den nächsten Substratstrang zu binden.

In einem anderen System wurde die Verknüpfung von zwei steifen DNA-Segmenten (sogenannten double crossover Molekülen) so gestaltet, dass eine gezielte Verdrehung der beiden Segmente um 180° induziert werden kann (Abb. 3) [16, 17]. Wenn mehrere solcher Einheiten miteinander verknüpft würden wäre es möglich, durch eine selektive Ansteuerung der einzelnen Elemente, relativ komplexe Bewegungen auszuführen.

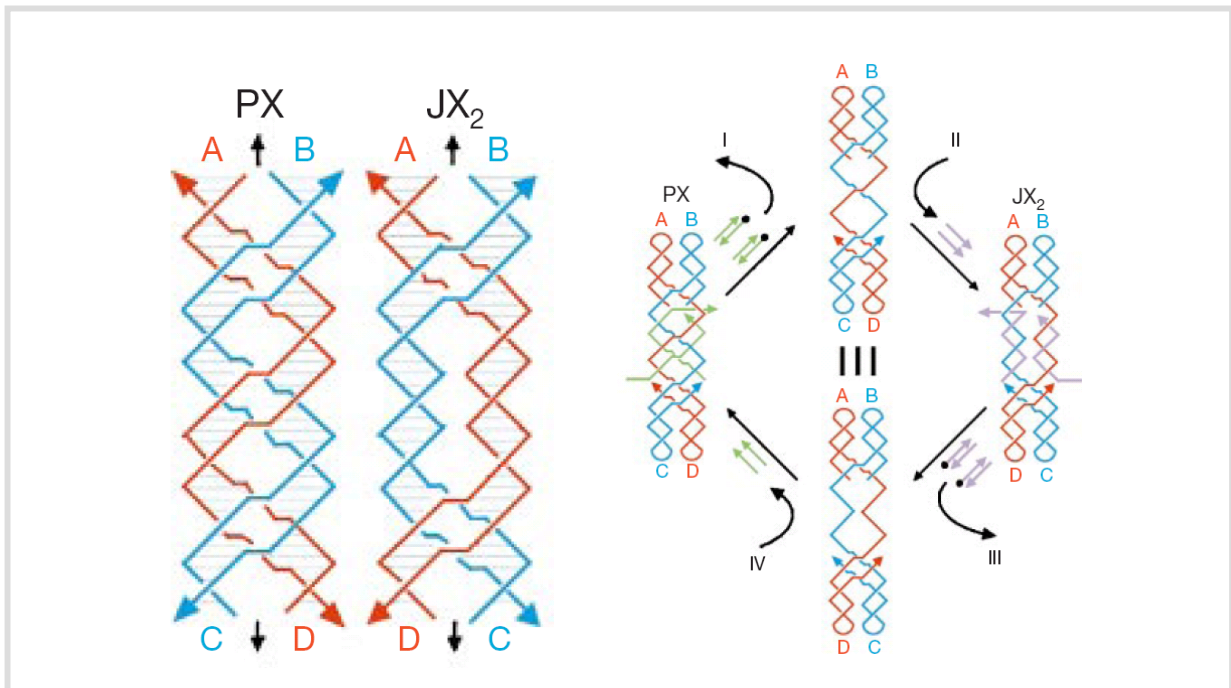


Abb. 3: Responsives Element aus Oligonukleotiden [17]. Im linken Teil sind die beiden Zustände des responsiven Elements dargestellt. Das PX-Molekül besteht aus vier Oligonukleotiden (zwei rote und zwei blaue), die zwei parallel angeordnete Doppelhelices ausbilden. Die Basenpaarung innerhalb der Helices ist durch die grauen Striche angedeutet. Immer wenn zwei Stränge in der Mitte der Struktur aufeinander treffen erfolgt ein gegenseitiger Austausch. Im JX₂-Molekül wird einer dieser Verknüpfungspunkte ausgelassen, wodurch eine andere relative Anordnung der Helixenden resultiert (markiert durch die Buchstaben A, B, C und D). Im rechten Teil ist der Schaltprozess zwischen den beiden Zuständen gezeigt. Im mittleren Bereich des PX-Moleküls wurde jeweils ein Strang der beiden Doppelhelices durch ein Oligonukleotid ausgetauscht (grün). Diese Oligonukleotide ragen jeweils an einem Ende aus der Struktur heraus. Durch die Zugabe von biotinmarkierten Oligonukleotiden, die zu der vollständigen Sequenz dieser grünen Stränge komplementär sind, können diese aus der Struktur entfernt und über die Wechselwirkung mit Streptavidin aus der Lösung abgetrennt werden. Die so gebildete Struktur kann durch die Zugabe von zwei anderen Oligonukleotiden (hell violett) in den JX₂-Zustand gebracht werden. Nach dem gleichen Prinzip ist es möglich das JX₂-Molekül wieder in die PX-Konformation zu überführen.

Neben den biologisch inspirierten Bauteilen wurden auch voll synthetische funktionelle Einheiten entwickelt, die durch verschiedene Steuermethoden zu einer Kontraktion oder zu Schalt- bzw. Drehbewegungen angeregt werden können [18-22]. Die synthetischen Bauteile wirken im Vergleich zu ihren hochspezialisierten biologischen Vorbildern ein wenig plump, sie zeichnen sich aber durch eine deutlich höhere chemischen und thermischen Stabilität aus.

Die vorgestellten Beispiele zeigen, dass bereits eine ganze Reihe von funktionalen steuerbaren Strukturen realisiert wurde. Das nächste Problem, das auf dem Weg zu nanoskopischen Schaltkreisen oder molekularen Maschinen bewältigt werden muss, ist die exakte Platzierung und Kombination verschiedener Bauteile. Es hat sich gezeigt, dass die Selbstorganisation von DNA eine ideale Methode für die Erzeugung komplexer zwei- und dreidimensionaler Strukturen darstellt [23], die als „Steckbrett“ für molekulare Bauteile genutzt werden könnten: Die DNA-Doppelhelix ist eine relativ dicke ($\varnothing \approx 2\text{nm}$), kompakte und dadurch auf kurzen Längenskalen relativ steife Verbindung ($l_p^{\text{dsDNA}} \approx 50\text{-}60\text{ nm}$ [24]), mit einer klar definierten

Struktur, die durch biologische Methoden sehr präzise manipuliert werden kann. Anders als bei Proteinen sind die Auswirkungen der primären Sequenz auf die dreidimensionale Strukturbildung gut verstanden und exakt vorhersagbar. Des Weiteren kann DNA an verschiedenen Stellen mit anderen Molekülen verknüpft werden, ohne dass ihre Selbsterkennung gestört wird. Durch die helikale Struktur besteht außerdem ein Zusammenhang zwischen der Lage und der räumlichen Orientierung von eingeführten Modifikationen. Je nachdem ob die Modifikation ein Vielfaches einer ganzen oder halben Helixwindung vom Kreuzungspunkt eines zweidimensionalen Netzwerks entfernt ist, wird sie auf der einen oder anderen Seite des Netzwerkes herausstehen. Der entscheidende Entwicklungsschritt auf diesem Gebiet lag in der Konstruktion einer stabilen Verzweigungsstelle. Die Arbeiten von N. C. Seeman ermöglichten 1983 die Synthese der ersten stabilen Kreuzstruktur aus synthetischen Oligonukleotiden [25-28]. Es gibt zwei verschiedene Konzepte, die auf der Grundlage solcher Verzweigungsstellen zu einer komplexen Strukturbildung führen. In der Gruppe von N. C. Seeman wurden verschiedene formpersistente geometrisch Motive zu dreidimensionalen geometrischen Formen und zweidimensionalen periodisch strukturierten Netzwerken verknüpft [29-34].

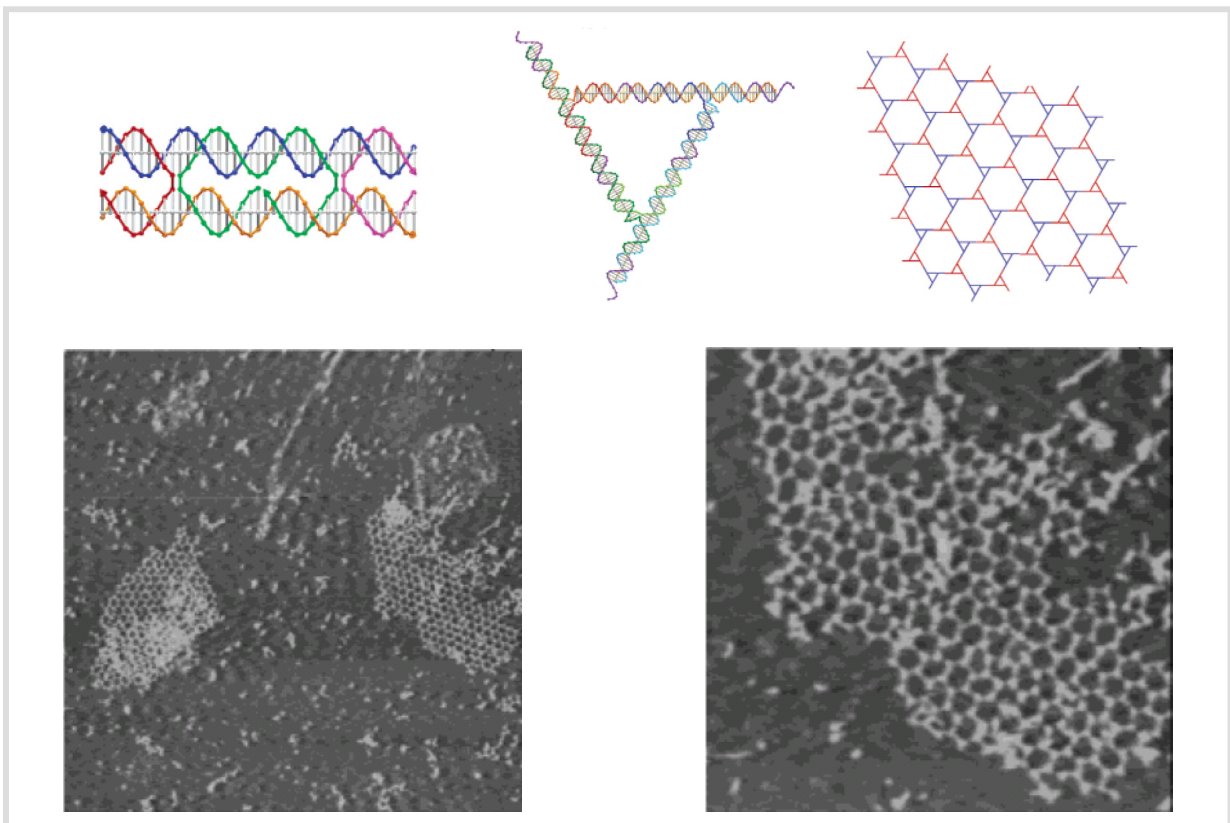


Abb. 4: Zweidimensionales periodisches DNA-Netzwerk [34]. In einem double crossover Molekül (oben links) sind zwei parallel angeordnete Doppelhelices durch zwei Verzweigungsstellen miteinander verknüpft. Drei derartige Strukturen können zu einem Dreieck verknüpft werden (oben mitte). Die drei beteiligten double crossover Moleküle tragen am freien Ende jeweils zwei überstehende Enden. Wenn zwei verschiedene Dreiecke mit komplementären überstehenden Enden zusammengegeben werden (rote und blaue Dreiecke, oben rechts) führt die Hybridisierung zu einem pseudohexagonalen zweidimensionalen Netzwerk. Unten: AFM-Aufnahmen des beschriebenen Netzwerks. (Bildausschnitt: 3,27 bzw. 1,18 μm)

Das Potential solcher Netzwerke als Templat für periodische Protein-Arrays oder zur Erzeugung von nanoskopischen Leiterspuren wurde bereits demonstriert [35]. In einem anderen Ansatz von P. W. K. Rothemund wird eine lange einzelsträngige DNA durch die Hybridisierung mit verschiedenen Oligonukleotidsequenzen zu einem annähernd beliebig strukturierbaren zweidimensionalen Objekt gefaltet (Abb. 5). Die auf diesem Weg gebildeten Objekten sind im Unterschied zu den zweidimensionalen Netzwerken aus der Gruppe von N. C. Seeman nicht periodisch. Dadurch ist es möglich jeden beliebigen Punkt auf der gebildeten Fläche individuell zu adressieren. Solche „Steckbretter“ sind in erster Linie für nanoskopische Schaltkreise, Speichermedien oder zur Erzeugung funktionaler Oberflächen von Interesse [36].

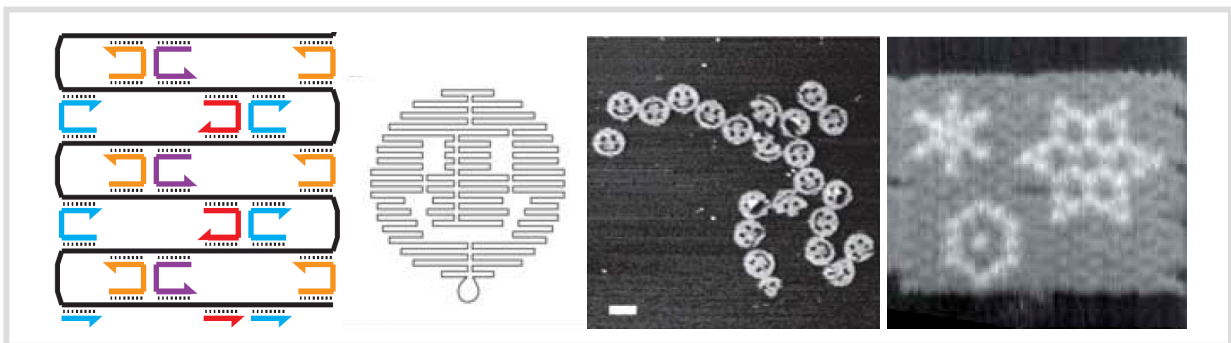


Abb. 5: Faltung von Einzelstrang-DNA durch Hybridisierung mit Oligonukleotiden [37]. **A:** Eine lange Einzelstrangsequenz (schwarz) wird durch Hybridisierung mit Oligonukleotiden (gelb, rot, blau bzw. lila) in eine gefaltete Struktur gebracht. Nach diesem Prinzip können annähernd beliebig strukturierte zweidimensionale Objekte erzeugt werden. **B:** Schematisches Beispiel für den Verlauf des Einzelstrangs innerhalb einer zweidimensionalen Struktur. **C:** AFM-Aufnahme der gebildeten Strukturen (scale bar: 100 nm). **D:** Die Sequenzen einzelner Oligonukleotide könne so gewählt werden, dass sie Hairpinstrukturen ausbilden, die an klar definierten Punkten senkrecht aus dem gefalteten Objekt herausstehen. Die resultierenden Höhenunterschiede können im AFM detektiert werden (Bildausschnitt ca. 150 nm).

Zur Bildung von diskreten nicht periodischen Strukturen, die ohne eine vorgegebene Gerüststruktur aufgebaut werden können, müssen die einzelnen Komponenten direkt miteinander verknüpft werden. Dieser Ansatz erfordert Bausteine die mindestens zwei verschiedene selektiv adressierbare Verknüpfungsstellen tragen. In dieser Richtung sind bisher erstaunlich wenige Ansätze beschrieben. Lediglich im Fall von DNA-funktionalisierten Nanopartikeln wurde vor kurzem eine klar definierte Strukturbildung durch die Verknüpfung über komplementäre Oligonukleotide erreicht [38]. Diese Struktur zeigt jedoch einen kristallartigen periodischen Aufbau, dessen Gesamtgröße nicht kontrollierbar ist. Nanoskopische Motoren und Schalter wurden bisher nur isoliert untersucht. Eine Kombination von verschiedenen responsiven Elementen ist noch nicht realisiert. Proteine und DNA-Abschnitte werden in den meisten Fällen nur mit *einem* Linkermolekül modifiziert, das auf die Anbindung auf Oberflächen oder die Markierung mit Farbstoffen ausgerichtet ist. Bei der Kombination von synthetischen Molekülen mit Oligonukleotiden gibt es im Wesentlichen zwei verschiedene Klassen: lineare Blockcopolymere und verzweigte Strukturen. Die verzweigten

Strukturen bestehen in den meisten Fällen aus einem Polymerrückgrad und mehreren Oligonukleotidseitenketten. Die verschiedenen Seitenketten tragen jedoch alle die gleiche Sequenz. Diese Strukturen finden in erster Linie Anwendungen in der selektiven Fällung bestimmter DNA-Sequenzen [39] und in der elektrochemischen Detektion von DNA [40]. Durch die Kombination synthetischer Polymere mit *einer* Oligonukleotidsequenz wurden bereits verschiedene lineare Diblockcopolymere mit Polystyrol-, Polypropylen-, Polyethylen- und Poly-N-isopropylacrylamidblöcken synthetisiert [41-44]. Typische Anwendungsgebiete dieser Verbindungen liegen in der Optimierung therapeutischer Eigenschaften von Aptameren, Antisense- und Antigen-Oligonukleotiden [45-47], der Nutzung als Transportsystem für Medikamente [48], der selektiven Abtrennung von Biomolekülen aus komplexen Mischungen [49], der DNA-Templat gesteuerten Synthese [50] und der gezielten Formgebung von Micellen [42, 51]. Zur Synthese von Dreiblockcopolymeren durch die Verknüpfung von *zwei* Oligonukleotiden mit einem synthetischen Block gibt es zur Zeit erst eine Hand voll Veröffentlichungen. Diese Strukturen tragen jedoch entweder zwei identische Oligonukleotide [52, 53] oder die synthetischen Blöcke beschränken sich auf kleine Spacermoleküle, die während der Festphasensynthese der Oligos eingeführt werden [54, 55]. 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 [56].

1.1 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollen die Grundlagen für ein modulares System entwickelt werden, das eine Verknüpfung von molekularen Bausteinen zu diskreten nicht periodischen Strukturen durch die Selbstorganisation von Oligonukleotiden ermöglicht. Als Bausteine sollen zunächst flexible synthetische Polymerblöcke und semiflexible Doppelstrang-DNA-Abschnitte dienen, die an beiden Enden mit unterschiedlichen Oligonukleotidsequenzen „funktionalisiert“ sind. Die verschiedenen Segmente sollen eine exakt definierte Größe haben und die zur Verknüpfung der Segmente genutzten Oligonukleotidabschnitte müssen ausreichend groß sein (ca. 20 Basen), dass ihre Hybridisierung zu einer bei Raumtemperatur stabilen Verknüpfung führt. Sowohl die Größe der Bausteine als auch Länge und Sequenz der überstehenden Enden sollten möglichst frei variierbar sein. Die Synthese soll außerdem eine ausreichende Menge an Produkt liefern (einige Milligramm), so dass eine Untersuchung der supramolekularen Strukturen mit gängigen physikochemischen Methoden möglich ist. Dieses System bietet verschiedene Anwendungsmöglichkeiten.

Synthese von Multiblockcopolymeren:

Chemisch unterschiedliche Polymere sind in der Regel nicht kompatibel. Aus diesem Grund tritt in den meisten Polymermischungen eine Phasenseparation auf. In Multiblockcopolymeren sind die verschiedenen Makromoleküle kovalent miteinander verknüpft. Durch die Verknüpfung ist eine makroskopische Entmischung nicht mehr möglich, so dass es in diesen Systemen zur Mikrophasenseparation kommt. Dadurch führt die Unverträglichkeit der einzelnen Komponenten im Feststoff zur Bildung von Mesophasen, die unterschiedliche Strukturen im Nanometerbereich ausbilden [57-59]. Auch in selektiven Lösungsmitteln, die nur eine Komponente des Copolymeren solubilisieren, können verschiedene Motive wie z.B. Micellen und Vesikel erzeugt werden [60-63]. Sowohl in Lösung als auch im Feststoff ist es möglich die nanoskopische Strukturbildung durch eine Variation der Länge, bzw. der chemischen Natur der verschiedenen Blöcke zu kontrollieren. Typischerweise werden Blockcopolymere durch relativ anspruchsvolle lebende Polymerisationstechniken erzeugt. Die klassische chemische Synthese führt jedoch zu gewissen Limitierungen in Bezug auf Anzahl und Abfolge der verschiedenen Blöcke. Diese Limitierungen lassen sich mit dem oben beschriebenen Ansatz umgehen. Wenn es gelingt die beiden Enden der verschiedenen Polymerblöcke mit unterschiedlichen Oligonukleotiden zu funktionalisieren, können die einzelnen Polymere durch Hybridisierung der terminalen DNA-Sequenzen miteinander verknüpft werden. Die Reihenfolge der Verknüpfung kann durch geeignete Wahl der Oligos frei variiert werden. Ebenso bestehen keine prinzipiellen Einschränkungen in Bezug auf die Anzahl der beteiligten Polymerblöcke. Doppelsträngige DNA-Fragmente könnten als semiflexible Blöcke in diese Strukturen integriert werden. Mit den von N. C. Seeman entwickelten Prinzipien sollte es außerdem möglich sein, exakt definierte Verzweigungsstellen in die Blockstruktur einzuführen. Im Vergleich zur klassischen Synthese werden durch diesen modularen Ansatz sehr viel komplexere und vielfältigere Strukturen zugänglich.

Molekulare Modellstrukturen:

Bei einigen analytischen Methoden, wie z. B. bei der statischen und dynamischen Lichtstreuung, ist es notwendig einen theoretischen Zusammenhang zwischen den eigentlichen Messgrößen und verschiedenen Molekülparametern herzustellen, um die erhaltenen Messdaten interpretieren zu können. Hier zeigt sich das typische Wechselspiel von theoretischen Berechnungen und Simulationen mit der Entwicklung von neuen Synthesen und Analysemethoden. Um nachzuweisen, dass eine Theorie den richtigen Zusammenhang liefert sind Modellverbindungen erforderlich, bei denen die zu untersuchenden molekularen Parameter entweder aufgrund der Synthese oder durch den Nachweis mit anderen Methoden

bereits bekannt sind. Die Verknüpfung von mehreren kurzen dsDNA-Segmenten über flexible Polymerblöcke könnte z.B. als Modellsystem eines mehrfach gebrochenen Stäbchens dienen. Das theoretische Verständnis dieser Geometrie ist für die Untersuchung verschiedener Biomoleküle, wie z.B. der Immunoglobuline (Antikörper), Myosin oder Fibronectin von Interesse [64-67]. Das oben beschriebene modulare System bietet hier die Möglichkeit verschiedene molekulare Parameter relativ einfach zu variieren. Sowohl die Länge und die Anzahl der stäbchenartigen dsDNA-Segmente als auch die Anzahl und die Lage der flexiblen Verbindungsstücke innerhalb der Struktur können durch die Synthese exakt eingestellt werden. Außerdem kann die chemische Natur und somit die Flexibilität der synthetischen Verbindungsstücke verändert werden. Auf Grundlage der Arbeiten von N. C. Seeman sollte es ebenso möglich sein, größere sternförmige Strukturen aus DNA zu erzeugen, die als Modellsystem für semiflexible Sternpolymere dienen könnten [68]. Im Unterschied zu anderen Syntheseansätzen wäre es hier sehr viel einfacher möglich die Länge jedes einzelnen Arms zu variieren und lineare Vergleichsverbindungen mit identischer Molmasse zu erzeugen.

Nanoskopische Strukturierung:

Als Fernziel kann die definierte Anordnung von unterschiedlichen molekularen Bausteinen genannt werden. Hier sind der Phantasie beinahe keine Grenzen gesetzt. Neben synthetischen Polymeren und dsDNA-Segmenten sollte ebenso eine Verknüpfung von Proteinen, Nanopartikeln oder molekularen Schalteinheiten über Oligonukleotide möglich sein. Diese könnten dann nach dem von Rothemund entwickelten Konzept [37] zu zweidimensionalen Strukturen gefaltet oder auf einer bereits bestehenden DNA-Oberfläche verankert werden. Diesem molekularen Baukasten aus funktionalen Einheiten (Proteine, molekulare Rotoren und Schalter) und formgebenden Elementen (DNA und Nanopartikel) wird durch die Synthese biosynthetischer Triblockcopolymerer ($\text{DNA}^1\text{-Polymer-DNA}^2$) ein vollständig flexibler Baustein hinzugefügt. Durch die Verwendung von responsiven Polymeren wäre es außerdem möglich die Flexibilität und Länge des synthetischen Bausteins, durch einen induzierten Knäuelkollaps zu schalten.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Der Aufbau von Nucleinsäuren

2.1.1 Desoxyribonucleinsäure (DNA)

Formal betrachtet ist DNA ein alternierendes Copolymer aus 2-Desoxyribose und Phosphorsäure. Die Verknüpfung der Riboseeinheiten erfolgt durch die Veresterung der OH-Gruppen am C3- und C5-Atom. Die wichtigste Funktion der DNA ist die Speicherung von Informationen auf der Grundlage ihrer primären Sequenz von Nucleinsäuren, die an das C1-Atom der Riboseeinheiten gebunden sind. In natürlich vorkommender DNA treten im wesentlichen vier verschiedene Nucleobasen auf: Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin.

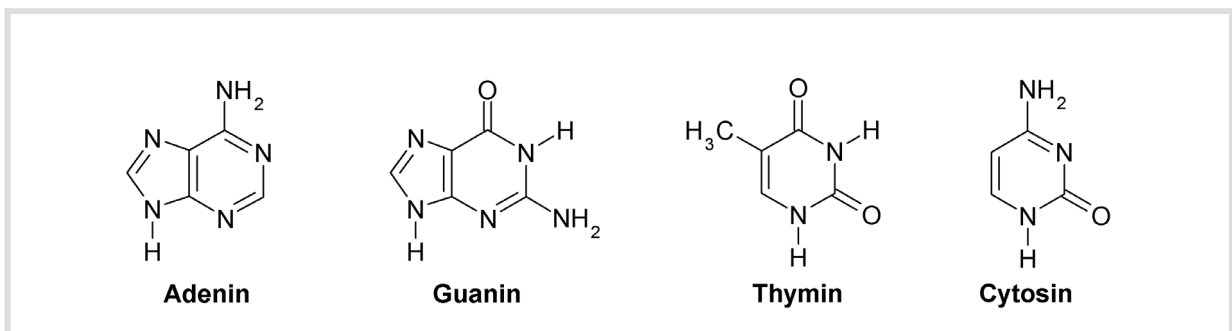


Abb. 6: Struktur der vier verschiedenen Nucleobasen, die in natürlich vorkommender DNA auftreten. Die Verknüpfung mit dem C1-Atom der Riboseeinheit erfolgt bei den Purinbasen (Adenin bzw. Guanin) über die sekundäre Aminogruppe des Fünfrings. Die Pyrimidinbasen (Thymin bzw. Cytosin) sind über die N1-Position mit dem Kohlenhydrat verknüpft (vgl. Abb. 10).

Die Nucleobasen bestehen aus aromatischen Systemen (Purine bzw. Pyrimidine) die mit verschiedenen Wasserstoffbrücken Donor- und Akzeptorgruppen funktionalisiert sind. 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 Nucleobasen mit dem C1-Atom der Desoxyribose entstehen Nucleoside. Die Phosphatester der Nucleoside werden als Nucleotide bezeichnet. Erst durch die Verknüpfung der verschiedenen Nucleotide zu oligomeren bzw. polymeren Sequenzen kann die molekulare Erkennung der Basen zum Speichern von Informationen ausgenutzt werden. Die Verknüpfung der einzelnen Nucleotide

erfolgt über eine Phosphodiesterbindung zwischen den C3- und C5-Atomen benachbarter Ribose-Einheiten. Durch diese Art der Verknüpfung hat jedes Oligonukleotid zwei chemisch unterschiedliche Enden, die nach dem „endständigen“ C-Atom der Ribose-Einheit als 5'- bzw. 3'-Ende bezeichnet werden. (Zur Unterscheidung zwischen den Nummerierungen der Ringsysteme von Nucleobasen und Kohlenhydrateinheiten, werden die Positionen der Ribose mit einem Strich versehen.)

2.1.2 Ribonukleinsäure (RNA)

Neben den Desoxyribonukleinsäuren (DNA) spielen auch die Ribonukleinsäuren (RNA) in der Natur eine entscheidende Rolle. In den meisten modernen 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. Strukturell unterscheidet sich RNA in zwei Punkten von DNA. Anstelle von Thymin enthält die RNA Uracil. Diese beiden Nucleobasen unterscheiden sich lediglich durch die Abwesenheit der Methylgruppe im Uracil. Für biologische Systeme spielt dieser Unterschied jedoch eine entscheidende Rolle: Eine der am häufigsten auftretenden spontanen Veränderungen von Nucleobasen ist die Desaminierung von Cytosin zu Uracil [69, 70].

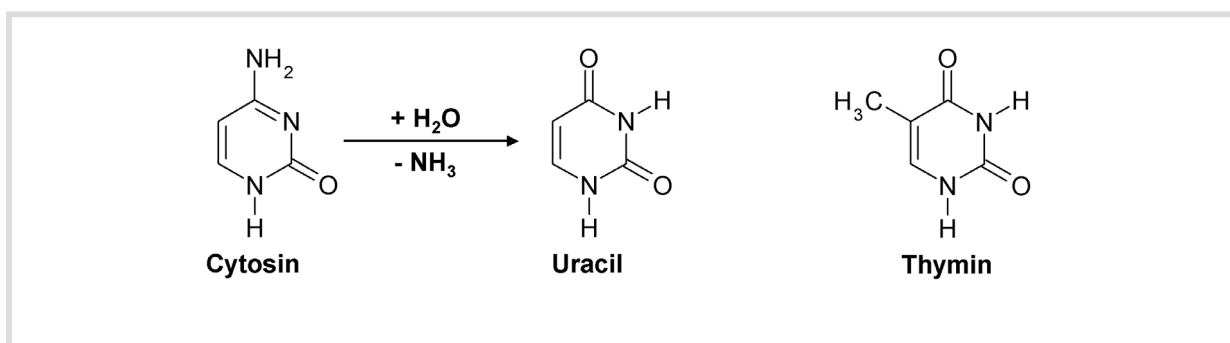


Abb. 7: Spontane Desaminierung von Cytosin zu Uracil. Diese Veränderung führt bei der Replikation von DNA zu einer Punktmutation, da Uracil nicht für Guanin sondern für Adenin codiert. Weil intakte DNA anstelle von Uracil Thymin enthält, kann Uracil als prämutagene Veränderung erkannt und korrigiert werden. Im Falle von RNA ist diese Reparatur nicht möglich.

Die Replikation einer so veränderten Sequenz führt zur Bildung einer Punktmutation. An Stelle von Guanin wird Adenin in den neu synthetisierten Strang eingebaut. Es gibt Reparaturmechanismen, die Uracil als prämutagene Veränderung erkennen und entfernen können. Diese Korrektur ist aber nur dann möglich, wenn das intakte genetischen Material kein Uracil enthält. Im Falle der relativ kurzlebigen RNA kann eine gewisse Anfälligkeit gegenüber Punktmutationen toleriert werden. In Falle der DNA ist es wichtiger das genetische Material über lange Zeiträume intakt zu halten, wodurch die etwas aufwändigere Biosynthese von Thymin im Vergleich zu Uracil gerechtfertigt werden kann.

Der zweite strukturelle Unterschied liegt in der Natur des verwendeten Kohlenhydratbausteins. Anstelle von Desoxyribose ist die RNA aus Riboseeinheiten aufgebaut, die am C2-Atom eine Hydroxyfunktion tragen. Diese OH-Gruppe ermöglicht einen autokatalytischen Prozess, der zur hydrolytischen Spaltung des RNA Rückgrades führt.

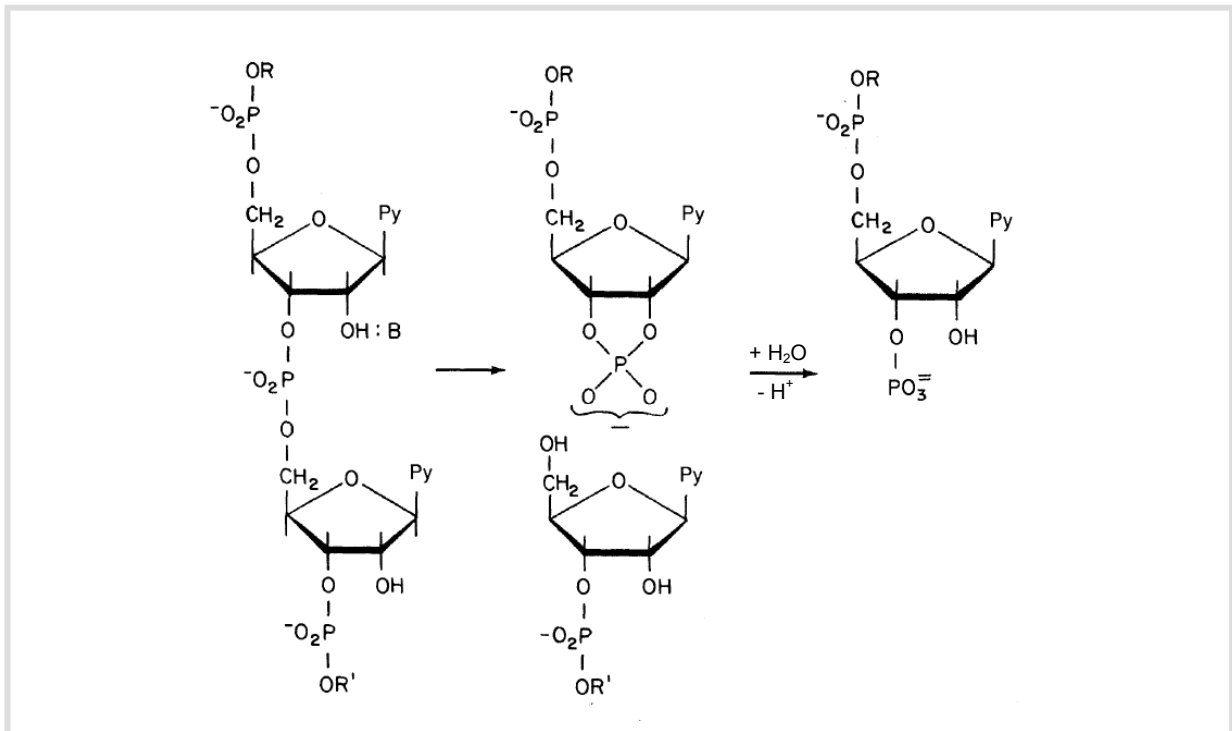


Abb. 8: Mechanismus der autokatalytischen Spaltung von RNA [71]. Die OH-Gruppe am C2-Atom der Riboseeinheit ermöglicht eine Umesterung, die zur Spaltung des Polymerrückgrades führt. Der intermediär auftretende zyklische Phosphordiester wird anschließend hydrolytisch gespalten. Durch die Abwesenheit der 2'-OH-Gruppe ist DNA gegen diese Abbaureaktion geschützt.

Im Vergleich zur RNA ist DNA um ein vielfaches stabiler gegen die Spaltung der Phosphordiesterbindungen. Aber auch hier muss für den Schutz des genetischen Materials ein gewisser Preis gezahlt werden. Durch die Abwesenheit der 2'-OH-Gruppe ist die glycosidische Bindung zur Nucleobase im Falle der DNA deutlich schwächer als in RNA. Dadurch tritt insbesondere die „Depurinierung“, d.h. die spontane Spaltung der glycosidischen Bindung in Desoxyadenosin bzw. -guanosin deutlich häufiger als in den entsprechenden Ribonucleotiden auf [70, 72]. An den so gebildeten abasischen Stellen steht die zyklische Desoxyriboseeinheit im Gleichgewicht mit ihrer linearen Form. Dieses Gleichgewicht ermöglicht einen Prozess, der durch β -Eliminierung zur Spaltung des DNA Rückgrades führt (Abb. 9). Die Eliminierung erfolgt jedoch so langsam, dass den Reparaturmechanismen der Zelle in der Regel ausreichend Zeit zur Behebung der abasischen Stelle bleibt.

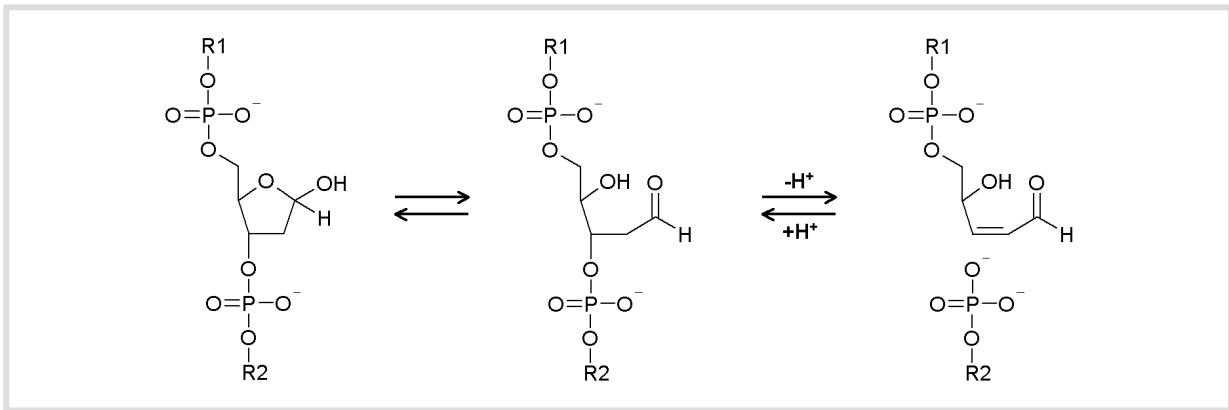


Abb. 9: Mechanismus der Spaltung des Polymerrückgrades an abasischen Stellen. Die freie OH-Gruppe am C1-Atom der Desoxyribose führt zu einem Gleichgewicht zwischen der ringförmigen und offenen Form der Kohlenhydrateinheit. In der offenen Form kann eine β -Eliminierungsreaktion unter Spaltung des Polymerrückgrades erfolgen.

2.1.3 Andere Nukleinsäuren

Neben DNA und RNA gibt es einige Nukleinsäuren, wie z.B. TNA (Threose-Nukleinsäure), PNA (Peptid-Nukleinsäure) oder GNA (Glycerol-Nukleinsäure), die sich nur im Aufbau des Polymerrückgrades von den beiden natürlich auftretenden Verwandten unterscheiden. Auch wenn diese Modifikationen in keiner bekannten Lebensform als Träger der genetischen Information auftreten, gibt es verschiedene Theorien, die in diesen Strukturen mögliche Vorgänger der RNA sehen und somit Alternativen zur viel diskutierten präbiotischen „RNA-Welt“ bieten [73-76].

2.1.4 Nukleinsäuren als Bausteine in supramolekularen Strukturen

Die vorgestellten Nukleinsäurearten sind alle in der Lage klar definierte Strukturen durch Selbstorganisation zu bilden. Aufgrund der deutlich höheren Empfindlichkeit gegen die hydrolytische Spaltung des Polymerrückgrades ist RNA nicht besonders gut für die Erzeugung von supramolekularer Strukturen geeignet. TNAs und GNAs zeigen zwar eine gute Stabilität und im Vergleich zu DNA oder RNA eine deutlich höhere Affinität zwischen komplementären Sequenzen, diese Modifikationen sind aber so exotisch, dass ihre Eigenschaften deutlich weniger gut erforscht sind und eine kommerzielle Synthese noch nicht entwickelt wurde. Im Unterschied dazu zeigt DNA eine gute chemische Stabilität und die kommerzielle Synthese ist mittlerweile so weit optimiert, dass verhältnismäßig große Mengen (einige Milligramm) relativ preiswert erhältlich sind. Außerdem sind eine Vielzahl von Modifikationen bekannt, die z. B. eine Funktionalisierung mit reaktiven Gruppen, die Markierung mit Farbstoffen oder einen Schutz gegen enzymatischen Abbau ermöglichen. PNAs sind zur Zeit die einzige praktikable Alternative zu DNA, die gewisse Vorteile mit sich bringen kann. Da diese Nukleinsäuren keine Ladungen am Polymerrückgrad tragen, treten bei der Doppelstrangbildung, im

Unterschied zu DNA, keine repulsiven Coulombkräfte auf. Die Affinität zwischen komplementären Strängen ist daher bei PNAs deutlich höher und sie sind vollständig stabil gegen enzymatische Abbaureaktionen. Außerdem wäre es möglich die Synthese von Dreiblockcopolymeren aus PNAs und synthetischen Polymeren vollständig in organischen Lösungsmitteln durchzuführen. Diese Eigenschaften können durch geeignete Modifikationen auch auf DNA übertragen werden: „Locked Nucleic Acids“ (LNAs) zeigen ebenfalls eine verbesserte Selektivität und Stabilität bei der Doppelstrangbildung und die negativ geladenen Phosphatgruppen können beispielsweise durch Methylphosphonate ersetzt werden.

2.2 Helixkonformationen

Bereits vor der Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von Desoxyribonukleinsäuren wurde durch chemische Analysen nachgewiesen, dass in natürlich auftretender DNA gleiche Mengen an Adenin und Thymin bzw. Guanin und Cytosin enthalten sind (Chargaff's Regel). Dieser Sachverhalt führte J. D. Watson und F. H. C. Crick zu der Idee, dass jeweils eine Purinbase mit einer Pyrimidinbase in Wechselwirkung tritt: Adenin bindet an Thymin und Guanin bindet an Cytosin. In Verbindung mit den Daten der Röntgenstrukturanalyse von R. Franklin und M. Wilkins entwickelten Watson und Crick 1953 das Modell der DNA-Doppelhelix [77]. In der Doppelhelix sind zwei Nukleotidsequenzen in gegenläufiger Orientierung umeinander gewunden. Die Basen liegen im Inneren der Helix und sind über Wasserstoffbrücken mit der Base des gegenüberliegenden Stranges verknüpft (Abb. 10).

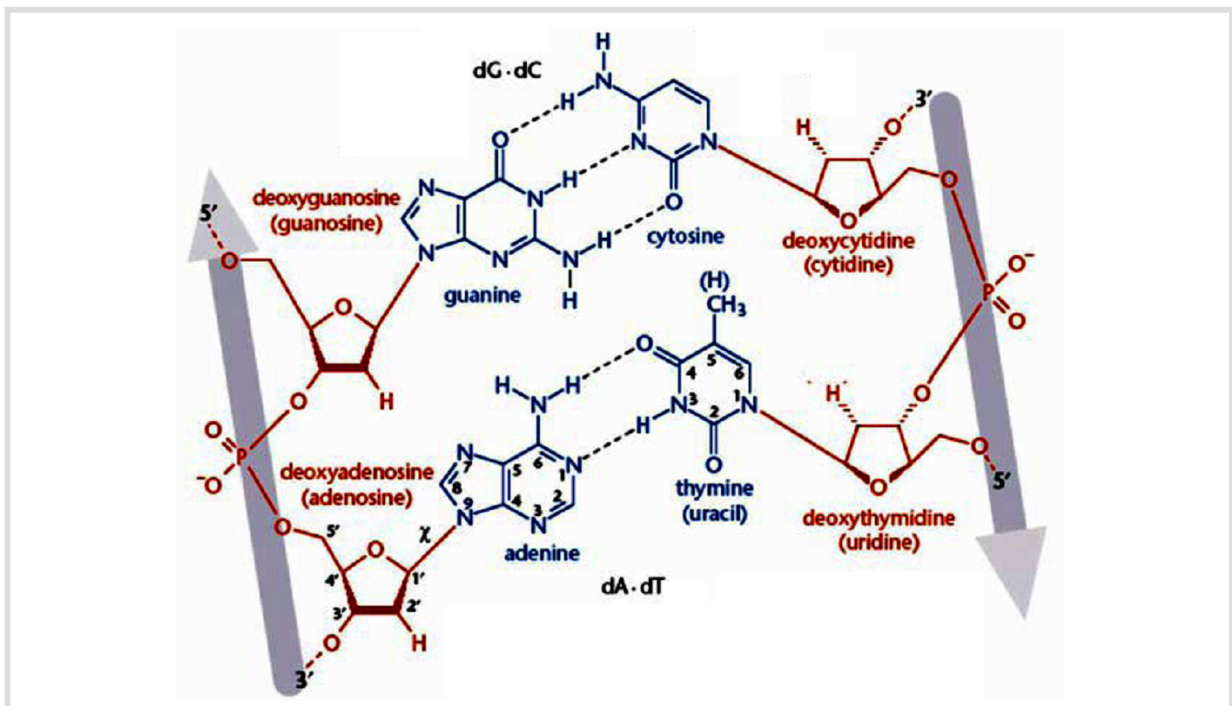


Abb. 10: Struktur der klassischen Basenpaarungen nach Watson und Crick. Adenin bindet an Thymin, Guanin bindet an Cytosin. Die beiden komplementären Stränge sind in antiparalleler Orientierung zu einer Doppelhelix umeinander gewunden [78].

Typischerweise zeigen Wasserstoffbrücken eine Bindungsenergie im Bereich von 3-7 kcal/mol. In der DNA-Doppelhelix sind diese Bindungen aufgrund von konformativen Zwängen relativ schwach (2-3 kcal/mol [79]). Eine zusätzliche Stabilisierung der helikalen Struktur erfolgt durch die annähernd parallele Ausrichtung der planaren aromatischen Systeme. Durch die stapelförmige Anordnung können die π -Orbitale benachbarter Basen innerhalb eines Stranges miteinander in Wechselwirkung treten. Durch hydrophobe Wechselwirkungen und van der Waals-Kräfte führt diese Basenstapelung („base-stacking“) zu einer weiteren Stabilisierung der Doppelhelix (ca. 4-15 kcal/mol für jedes Dinukleotid). Im Unterschied zu den Wasserstoffbrückenbindungen zeigt das base-stacking eine deutliche Abhängigkeit von der jeweiligen Sequenz. Die gesamte Stabilisierungsenergie einer Doppelhelix, die auf Wasserstoffbrücken zurückzuführen ist, hängt im Wesentlichen nur von der Zusammensetzung, d.h. vom GC-Gehalt der gegebenen DNA-Sequenz ab. Jede A•T bzw. G•C Paarung liefert annähernd identische Beiträge. Im Unterschied dazu zeigt beispielsweise ein GT-Dinukleotid durch Basenstapelung eine ganz andere Stabilisierungsenergie als ein TG-Dinukleotid (Tab. 1).

Tab. 1: Stabilisierungsenergien aufgrund von Basenstapelung für unterschiedliche Dinukleotide [80].

Dinukleotid-Basenpaar	Bindungsenergie der Basenstapelung / (kcal/mol)	Dinukleotid-Basenpaar	Bindungsenergie der Basenstapelung / (kcal/mol)
(GC) • (CG)	-14,59	(AG) • (CT)	-6,78
(AC) • (GT)	-10,51	(AT) • (AT)	-6,57
(TC) • (GA)	-9,81	(TG) • (CA)	-6,57
(CG) • (CG)	-9,69	(AA) • (TT)	-5,37
(GG) • (CC)	-8,26	(TA) • (TA)	-3,82

Neben der klassischen Watson-Crick Basenpaarungen sind beliebig viele alternative Strukturen möglich. Die Watson-Crick Paarung von A und T gehört noch nicht einmal zu den stabilsten denkbaren Kombinationen. Letztlich kann jede Base mit jeder anderen Base oder auch mit sich selbst in Wechselwirkung treten. Einige typische Beispiele sind in (Abb. 11) dargestellt. Der entscheidende Unterschied zwischen A•T bzw. G•C Einheiten und anderen Basenpaaren beruht auf strukturellen Übereinstimmungen der beiden Watson-Crick Pärchen. Sowohl in A•T als auch in G•C Paarungen sind die C1'-Atome der beiden Nukleotide 10,85 Å voneinander entfernt und die glykosidischen Bindungen stehen in einem Winkel von 72° zueinander. Durch diese Übereinstimmungen können komplementäre Sequenzen mit beliebiger Basenabfolge zu einer gleichmäßigen helikalen Struktur angeordnet werden. Andere Basenpaarungsmuster führen zu Störungen in der Konformation des Polymerrückgrads und sind deshalb in der Regel thermodynamisch weniger günstig. Die Spezifität der Watson-Crick-Paarung ist also ganz eng mit der Bildung der doppelhelikalen Struktur verknüpft. Im Umkehrschluss bedeutet dieser

Zusammenhang, dass in Sequenzen, die durch Watson-Crick Paarungen zu Verzweigungen oder anderen Störungen der doppelhelikalen Struktur führen, evtl. andere Basenpaarungsmuster thermodynamisch günstiger werden als die klassischen A•T bzw. G•C-Pärchen.

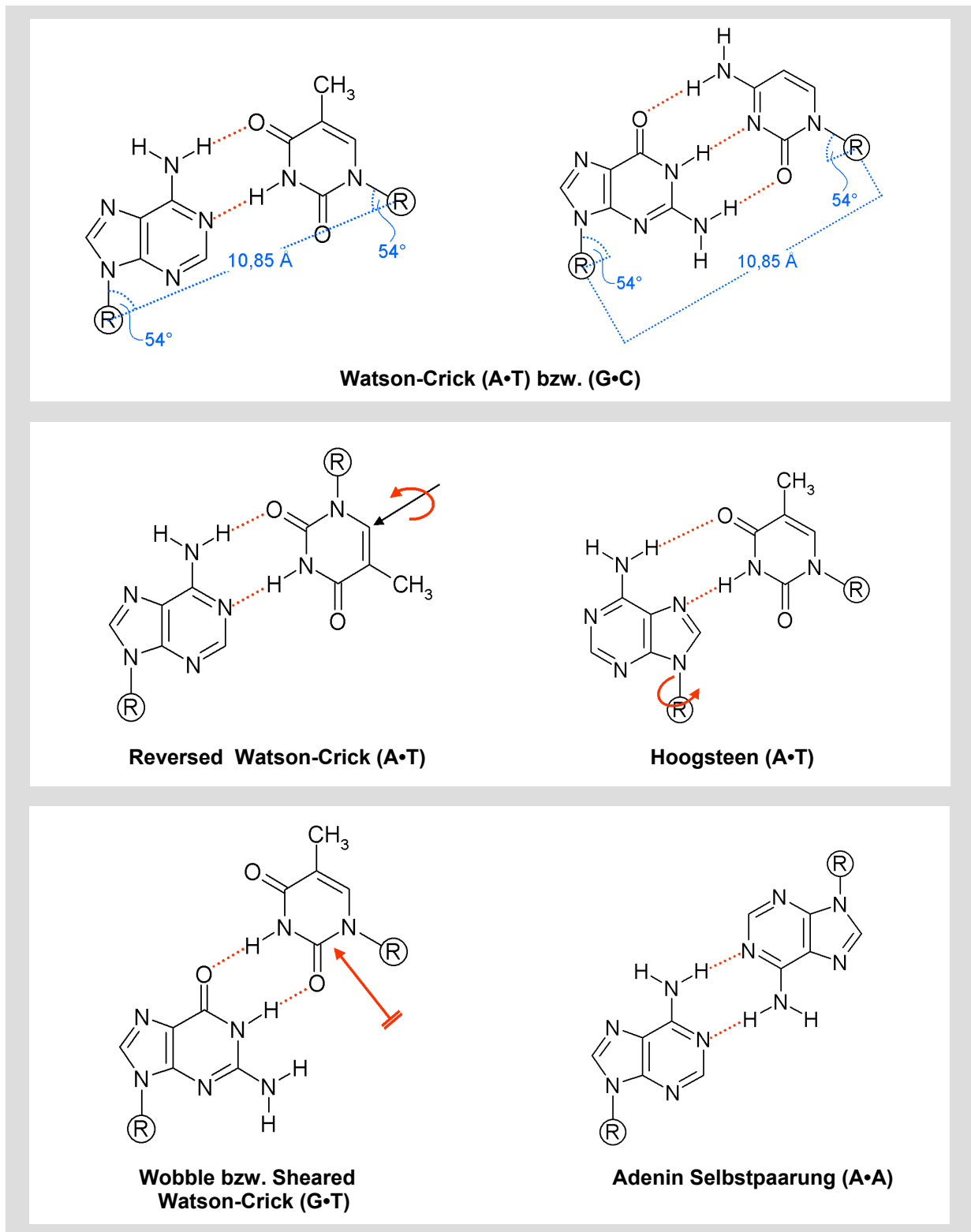


Abb. 11: Basenpaarungsmuster: Neben den klassischen Watson-Crick Pärchen sind beliebig viele alternative Strukturen möglich. Die bevorzugte Bildung von A•T bzw. G•C Einheiten beruht auf strukturellen Übereinstimmungen: Die C1'-Atome der beiden Pärchen sind 10,85 Å voneinander entfernt und die glykosidischen Bindungen stehen in einem Winkel von 72° zueinander. Durch diese Übereinstimmungen können komplementäre Sequenzen mit beliebiger Basenabfolge zu einer gleichmäßigen helikalen Struktur angeordnet werden.

Für DNA-Sequenzen, die keine besondere Symmetrieelemente aufweisen, sind *in vitro* zwei verschiedene rechtsgängige Helixkonformationen bekannt, die A-Form und die B-Form (Abb. 12). Unter physiologischen Bedingungen ist die B-DNA thermodynamisch stabiler.

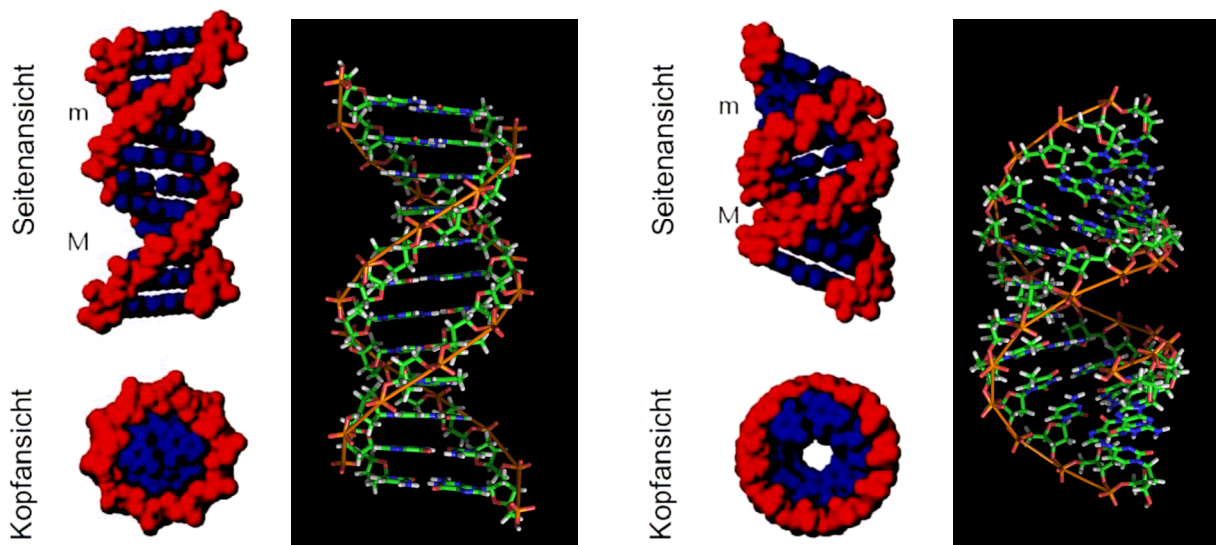


Abb. 12: Die beiden gängigsten Helixkonformationen sind die B-Form (links) und die A-Form (rechts). Unter physiologischen Bedingungen ist die B-Form thermodynamisch stabiler. Der Übergang in die A-Form erfolgt unter dehydrierenden Bedingungen. Es gibt jedoch spezielle Sequenzabfolgen die zur Ausbildung der A-Form oder zu anderen Helixkonformationen führen. Die beiden Helixkonformationen sind nicht vollständig symmetrisch, da sich die glycosidischen Bindungen innerhalb eines Basenpaares nicht exakt gegenüber stehen. Die Doppelhelix zeigt daher eine große und eine kleine Furche (M: major groove, m: minor groove), die sich sowohl in ihren geometrischen Ausmaßen als auch im chemischen Charakter voneinander unterscheiden [78].

Die glycosidischen Bindungen innerhalb eines Watson-Crick Basenpaares stehen sich nicht exakt parallel gegenüber. Dadurch entstehen die sogenannten *großen* und *kleinen Furchen* („major groove“ bzw. „minor groove“). Die beiden Furchen sind sowohl in ihren geometrischen Ausmaßen als auch in ihren chemischen Eigenschaften deutlich voneinander unterscheidbar. Es gibt verschiedene Chemikalien, Pharmazeutika und Proteine, die sehr spezifisch an bestimmte Stellen der major bzw. minor grooves binden können.

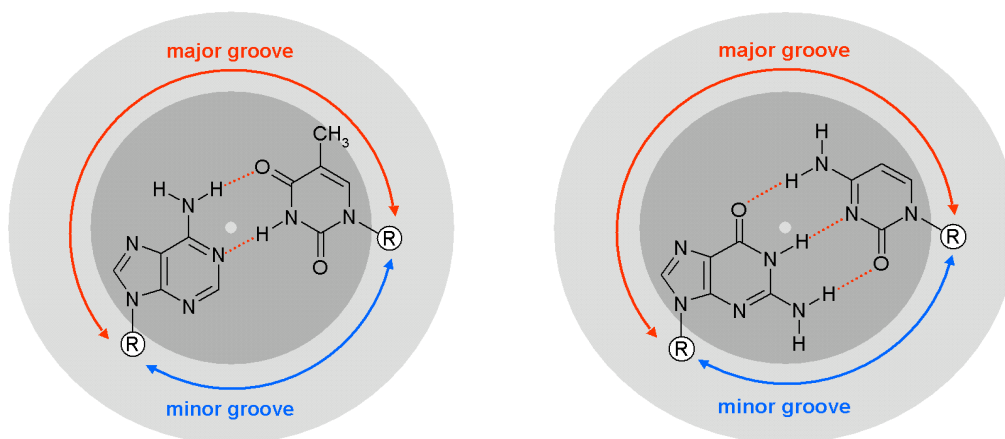


Abb. 13: Major und minor groove Seiten der beiden Watson-Crick Basenpaare.

Unter dehydrierenden Bedingungen erfolgt eine Konformationsänderung der B-DNA in die relativ ähnliche A-Form. Dieser Prozess wird durch einen Übergang des Riboserings von der C2-endo in die C3-endo Konformation ausgelöst. Die A-Form ist etwas kürzer, hat einen größeren Querschnitt und die Basenpaare sind relativ zur Helixachse stärker geneigt als in der B-Form. Die wichtigsten Parameter der beiden Helixkonformationen sind in Tab. 2 zusammengefasst.

Tab. 2: Helixparameter für zufällige DNA Sequenzen ohne besondere Symmetrieelemente. Die gezeigten Daten wurden durch Röntgenbeugung bestimmt [81]. In Klammern sind Werte angegeben, die bei DNA in Lösung unter physiologischen Bedingungen auftreten.

Helixparameter	B-DNA	A-DNA
Helixrichtung:	rechtsgängig	rechtsgängig
Basen / Helixwindung:	10 (10,5)	11
Axiale Länge / Basenpaar:	0,34 nm	0,255 nm
Axiale Länge / Helixwindung:	3,4 nm	2,8 nm
Neigungswinkel der Basen relativ zur Helixachse:	-6°	20°
Drehwinkel / Basenpaar:	36° (34,3°)	33°
Helixdurchmesser:	2 nm	2,3 nm
Konfiguration der Ribose:	C2-endo	C3-endo
Abstand der Phosphatgruppen innerhalb eines Stranges:	0,7 nm	0,59 nm

Einige Sequenzen mit definierten Symmetriemerkmalen bevorzugen andere Konformation als die typische B-Form. Sequenzabschnitte mit homopurin • homopyrimidin Paarungen, d.h. also Stränge mit einer längeren Abfolge von G und A bzw. C und T bevorzugen die A-Form. Poly(dA) • poly(dT) Abschnitte zeigen eine D-Konformation. Alternierende Purin-Pyrimidin Sequenzen nehmen die linksgängige Z-Form an. Es gibt außerdem Symmetrieelemente, die zu Abweichungen von einer gleichmäßigen Helixkonformation führen. Wiederholte Abfolgen von mehreren Adenineinheiten [(dA)₄₋₅] in einem Abstand von jeweils 10 bp führen zur Krümmung der Doppelhelix, besonders in supercoiled DNA werden durch „inverted repeats“ (palindrome) kreuzförmige Strukturen erzeugt, homopurin • homopyrimidin-Abfolgen bzw. Abfolgen mehrerer Guanin-Einheiten können Triplex bzw. Quadruplexstrukturen ausbilden [82].

Wenn DNA Sequenzen für eine definierte supramolekulare Strukturbildung genutzt werden sollen ist es also von entscheidender Bedeutung solche Symmetriemerkmale zu vermeiden oder gezielt einzusetzen.

2.3 Verzweigte DNA Strukturen

Natürlich vorkommende DNA tritt in der Regel nur in linearer bzw. zirkularer Form auf. Verzweigte Strukturen sind lediglich als instabile Zwischenstufen bekannt. Das Paradebeispiel eines verzweigten Zwischenzustandes ist die „Holliday junction“, die 1964 als zentrales Intermediat der homologen Rekombination postuliert wurde [83]. Die Rekombination, d.h. die Neuordnung bereits bestehender Sequenzabschnitte, ist neben der Mutation einer der entscheidenden Prozesse, der die genetische Variabilität innerhalb einer Population gewährleistet. Die genetische Variabilität ist wiederum ausschlaggebend für die Anpassungsfähigkeit von Organismen an wechselnde Umweltbedingungen im Verlauf der Evolution und somit auch die Grundlage für die Entwicklung neuer Arten. Bei der homologen Rekombination wird genetisches Material zwischen sehr ähnlichen Sequenzabschnitten ausgetauscht (Abb. 14).

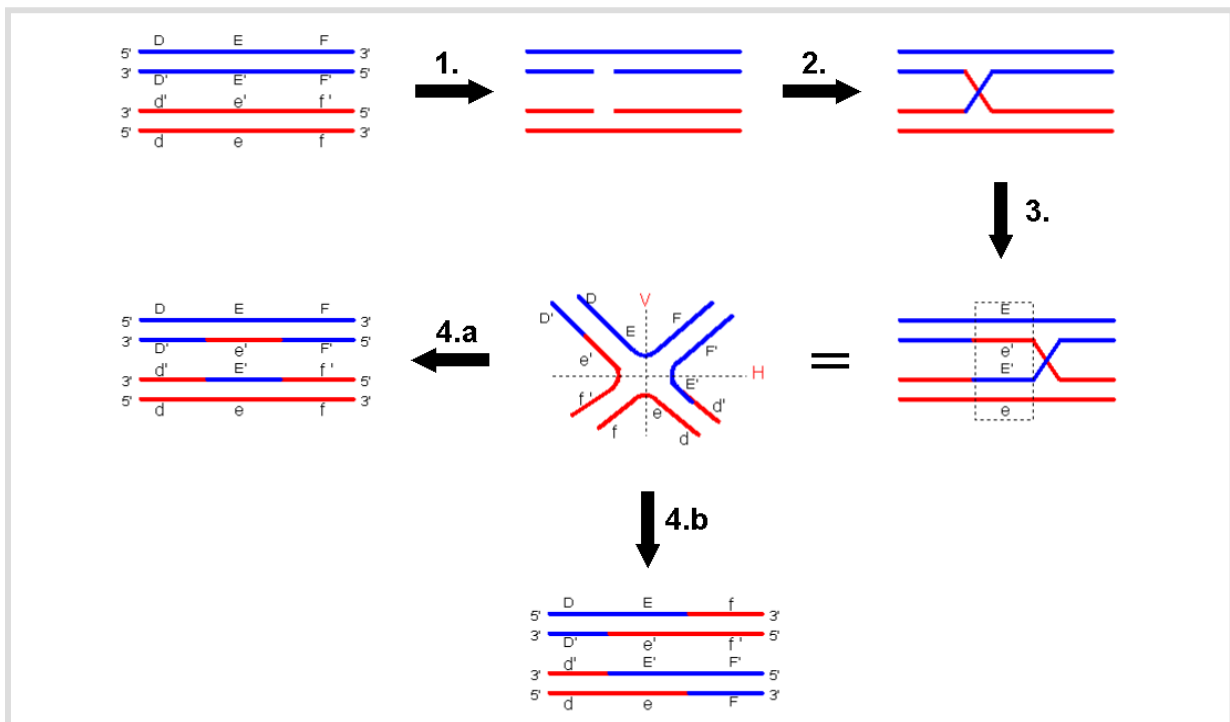


Abb. 14: Homologe Rekombination: Die beiden homologen Sequenzen werden parallel ausgerichtet. In beiden Helices wird an der gleichen Stelle ein Einzelstrangbruch erzeugt (1). Die beiden Enden überkreuzen sich und werden mit dem homologen Strang der jeweils anderen Helix verknüpft (2). Da die Sequenzen des unteren Strangs der blauen Helix mit der Sequenz des oberen Stranges der roten Helix weitgehend identisch ist, kann die gebildete Holliday Struktur isomerisieren, d.h. der Verzweigungspunkt kann sich entlang der Helixachsen verschieben („branch point migration“, 3.). Im nächsten Schritt wird die Struktur direkt an der Verzweigungsstelle von einem entsprechenden Enzym geschnitten. Hierbei gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten: (Zur besseren Übersicht ist die Verzweigungsstelle noch einmal mit antiparalleler Ausrichtung der beiden Helices dargestellt.) Der Schnitt kann entweder „horizontal“ oder „vertikal“ erfolgen. Dabei entstehen vier verschiedene Produkte, die jeweils einen Einzelstrangbruch tragen, der durch Ligation geschlossen wird. Die vier möglichen Produkte (4.a bzw. 4.b) zeigen alle einen Bereich, in dem ein roter Strang einem blauen Strang gegenüberliegt. In diesen Bereichen werden auftretende Fehlpaarungen, die durch Unterschiede in den homologen Sequenzen entstanden sind, korrigiert. Nach dieser Korrektur sind die in 4.a gebildeten Produkte mit den Ausgangssequenzen identisch. Bei den rekombinanten Produkten in 4.b wurden hingegen die Doppelstrangabschnitte f•f' und F•F' gegeneinander ausgetauscht.

An den beiden entscheidenden Schritten dieses Prozesses, die über die Natur der gebildeten Produkte bestimmen, ist die verzweigte Holliday Struktur beteiligt. Die Länge der ausgetauschten Sequenzabschnitte ist von der Lage des Verzweigungspunktes und somit von der Kinetik des Isomerisierungsprozesses der „branch point migration“ abhängig [84] (3. in Abb. 14). Die Ausbeute an rekombinanten Sequenzen wird dadurch bestimmt, an welchen Stellen die Holliday Struktur geschnitten wird (4.a bzw. 4.b in Abb. 14). Dieser Schritt wird sicherlich durch die dreidimensionale Struktur der Verzweigungsstelle beeinflusst. Die Konformation, die thermodynamischen Eigenschaften und die Wechselwirkungen der Holliday Struktur mit den verschiedenen Enzymen konnten lange Zeit nicht zufriedenstellend untersucht werden, da der Isomerisierungsprozess der *branch point migration* (Abb. 15) zu einer Population von Strukturen mit unterschiedlichen Verzweigungsstellen führt.

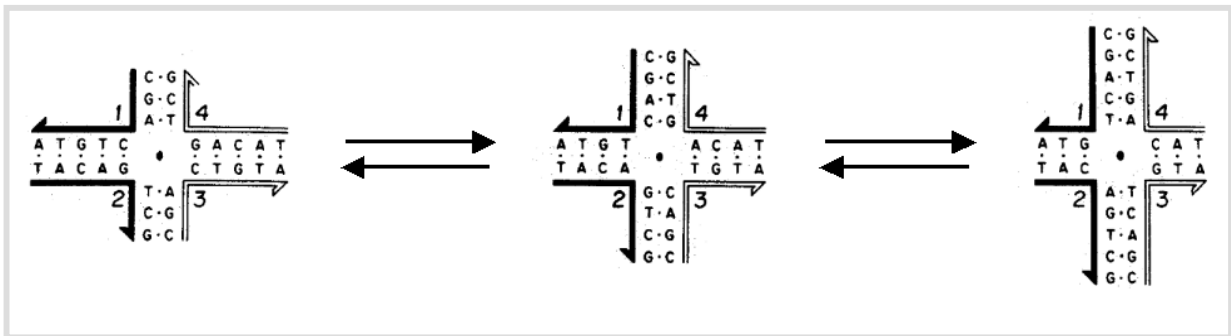


Abb. 15: Durch die Symmetrie der beteiligten Sequenzen der klassischen Holliday Struktur ist eine Verschiebung der Verzweigungsstelle möglich. Der Isomerisierungsprozess der *branch point migration* führt zu einer Population von unterschiedlichen Kreuzstrukturen. Durch dieses dynamische Gleichgewicht war eine zufriedenstellende Untersuchung der konformativen und thermodynamischen Eigenschaften solcher Strukturen lange Zeit nicht möglich [85].

Das erste stabile Modellsystem einer verzweigten DNA aus synthetischen Oligonukleotiden wurde 1983 von Kallenbach, Ma und Seeman entwickelt [28]. Diese Strukturen wurden in den 80er und 90er Jahren sehr intensiv mittels Gelelektrophorese [86, 87], DNA footprinting [88], FRET [89], NMR-Spektroskopie [90, 91] und anderen Methoden untersucht [92]. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse wurden bereits in mehreren Review Artikeln zusammengefasst [93-95] und verschiedene Arten von Verzweigungsstellen klassifiziert [96]. Als Grenzformen für die Struktur einer DNA-Kreuzung sind orthogonale, parallele oder antiparallele Ausrichtungen der Helixachsen denkbar (Abb. 16).

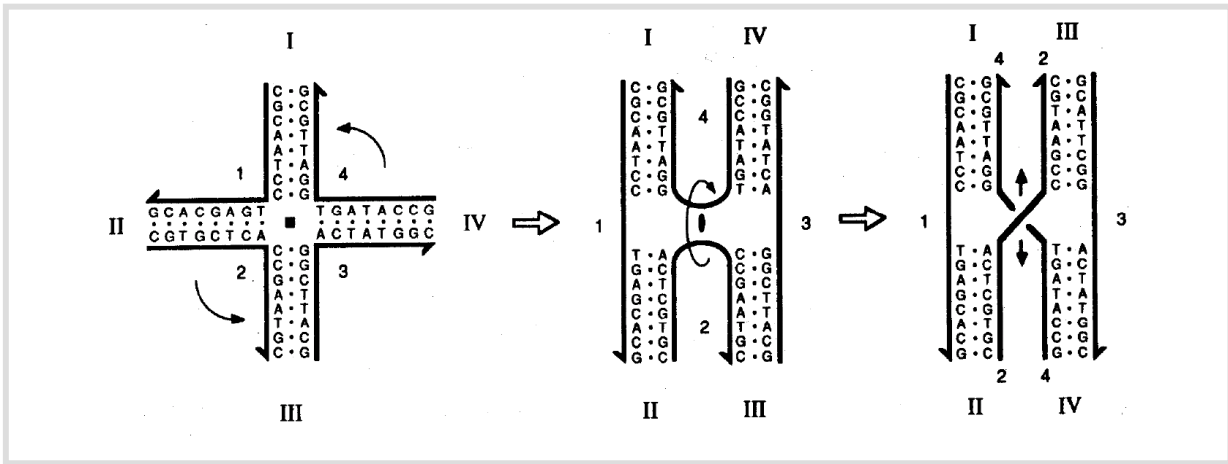


Abb. 16: Mögliche Grenzformen einer verzweigten Struktur aus synthetischen Oligonukleotiden. Prinzipiell ist eine orthogonale bzw. tetraedrische (links), eine antiparallele (mitte) oder eine parallele Ausrichtung (rechts) der beiden Helixachsen denkbar. In antiparalleler Orientierung zeigen die „kontinuierlichen“ Stränge der beiden Helices in entgegengesetzte Richtungen [88].

Die durchgeführten Untersuchungen haben relativ schnell gezeigt, dass die vier Arme einer Holliday Struktur paarweise verschieden sind. Aufgrund von *base stacking* bilden jeweils zwei Arme eine lineare weitgehend ungestörte B-Form Doppelhelix. Selbst die Basen in direkter Nachbarschaft zum Verzweigungspunkt können reguläre Basenpaare ausbilden [90, 92, 97]. Sowohl experimentelle Daten als auch theoretische Berechnungen sprechen für eine Struktur, in der die beiden Helices weder perfekt parallel noch vollständig antiparallel angeordnet sind, sondern in einer rechtshändigen X-förmigen Struktur vorliegen mit einem Winkel von etwa 60° zwischen zwei antiparallelen Helices. Simulationen haben gezeigt, dass in dieser Konformation die sterische Abstoßung zwischen den beiden Polymerrückgraden am geringsten ist.

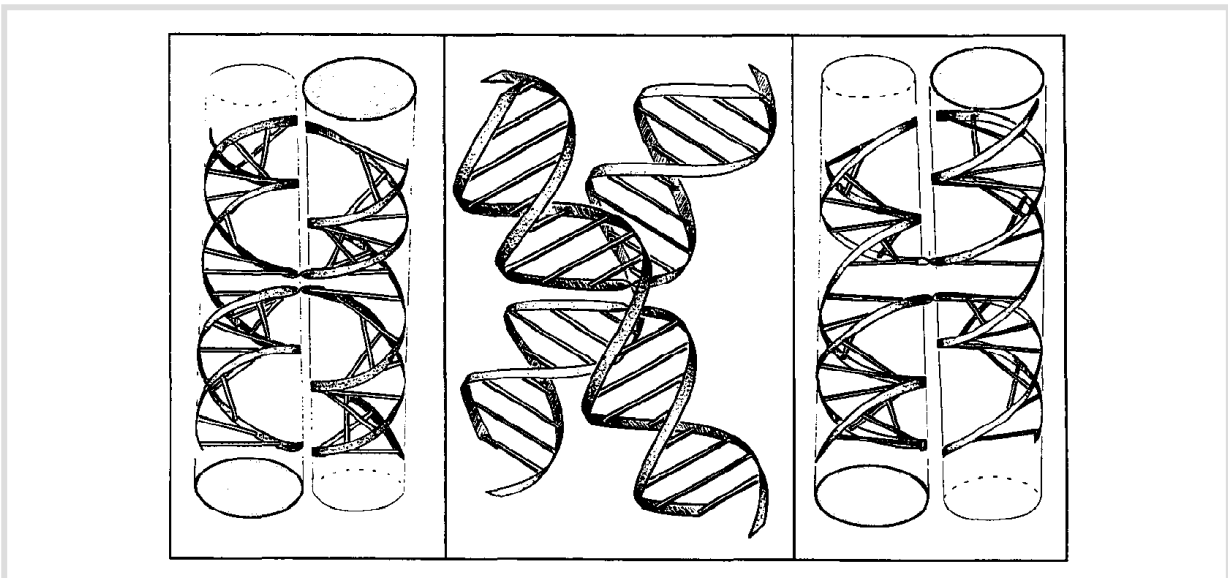


Abb. 17: Dreidimensionale Struktur der Holliday Junction: Die stabilste Konformation ist eine rechtshändige X-förmige Struktur mit annähernd antiparallelen Helixachsen. Die sterische Abstoßung zwischen den beiden Helices ist am geringsten, wenn sie in einem Winkel von 60° zueinander stehen [93].

In dieser X-förmigen Geometrie treten zwei „helikale Stränge“ auf, die eine weitgehend „natürliche“ Konformation annehmen können und zwei „crossover Stränge“ deren Konformation durch die Verzweigungsstelle stark gestört wird. Prinzipiell sind zwei verschiedene Isomere vorstellbar, je nachdem welche Arme durch Basenstapelung miteinander in Wechselwirkung treten (Abb. 18).

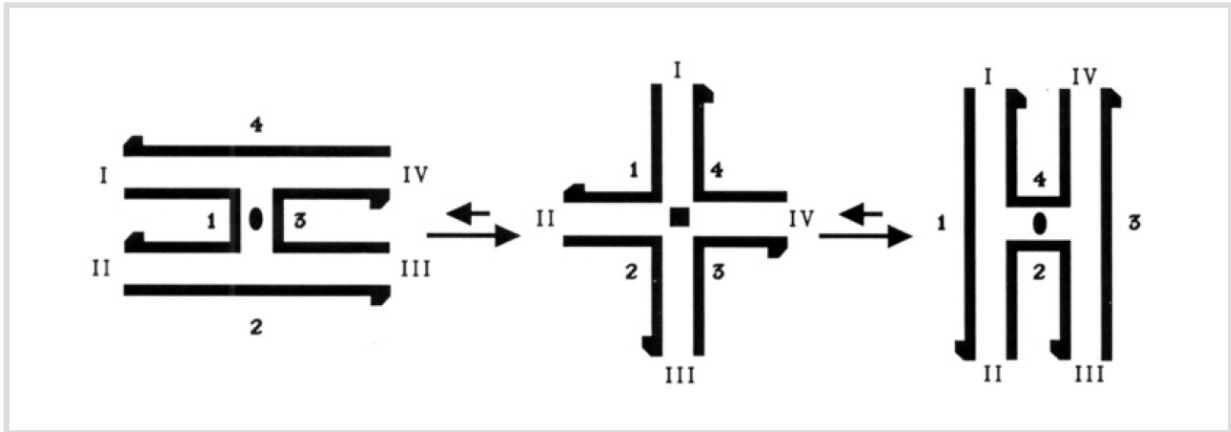


Abb. 18: Stacking-Isomere der Holiday Junction: Die X-förmige Struktur ist links und rechts zur besseren Übersicht in vollständig antiparalleler Orientierung dargestellt. In der linken Struktur treten die Arme I und IV bzw. II und III durch Basenstapelung miteinander in Wechselwirkung, während in der rechten Form die beiden anderen Stacking-Pärchen ausgebildet sind. In den meisten Fällen wird eines der beiden Isomere stark bevorzugt gebildet. Die genauen Zusammenhänge zwischen den beteiligten Sequenzen und der bevorzugten Stacking-Geometrie sind noch nicht vollständig verstanden [98].

Ob eine der beiden Konformation bevorzugt gebildet wird und wie stark das Ausmaß dieser Bevorzugung ist, wird in erster Linie durch die acht Basen im Bereich der Verzweigungsstelle bestimmt. Die exakten Zusammenhänge, wie es zur bevorzugten Bildung einer bestimmten Konformation kommt, sind noch nicht vollständig verstanden. Offenbar ist hier nicht nur der Energiegewinn durch die Basenstapelung in den „helikalen Strängen“ entscheidend. Die theoretisch weniger leicht vorhersagbare Fähigkeit der „crossover Stränge“ zur Faltung von einer in die andere Helix scheint eine mindestens ebenso wichtige Rolle zu spielen [99, 100]. Die dreidimensionale Struktur ist außerdem von der Konzentration an divalenten Kationen abhängig. Es gibt verschiedene experimentelle Hinweise, dass die Kreuzstruktur bei niedrigen Salzkonzentrationen eine annähernd planare sternförmige Konformation annimmt [93].

2.4 Molekulargenetische Grundlagen

Interessanterweise wurde die Idee, dass die Vererbung biologischer Merkmale auf Gene zurückzuführen ist, von G. Mendel bereits 1865, lange vor der Identifizierung der DNA als Träger der genetischen Information, entwickelt. Bis zu den Experimenten von Avery, MacLeod und McCarty (1944) bzw. Hershey und Chase (1952) war man allgemein der Ansicht, dass Gene aus Proteinen aufgebaut sein müssten. Die Identifizierung von DNA als Träger der genetischen Information führte zu einem rasanten Aufschwung im Bereich der genetischen Forschung. In den Jahren 1952-1966 wurde die Struktur der DNA aufgeklärt und man beschrieb die Vorgänge der Transkription und Translation. Ein Meilenstein auf dem Weg zur modernen Gentechnik, die in der Lage ist Struktur, Regulation und Funktion von *einzelnen* Genen zu untersuchen, war die Entdeckung der Restriktions-Endonukleasen und die damit verbundene Entwicklung der DNA-Klonierung, in den 70er Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts. Die neuen DNA-Rekombinationstechniken ermöglichten eine Untersuchung der Zusammenhänge zwischen genetischen Schäden und der Bildung von Krebs oder anderen Krankheiten und führten zur Entwicklung der modernen Biotechnologie, die genetische Methoden zur industriellen Produktion von pharmazeutischen Produkten, wie z. B. Humaninsulin, einsetzt. Bereits 1985 folgte die nächste umwälzende Neuerung. Durch die Entwicklung der PCR von K. Mullis wurden viele Untersuchungen, die allein durch Klonierungsexperimente zwar möglich aber schwierig waren, deutlich vereinfacht.

Prinzipiell ist die Untersuchung und Manipulation von DNA natürlich auch mit chemischen Methoden möglich. Ein eindrucksvolles Beispiel ist hier die Sequenzierung nach Maxam und Gilbert [101]. Der größte Teil von modernen gentechnischen Methoden beruht jedoch auf enzymatischen Umsetzungen. Die verschiedenen Enzyme können nach den Reaktionen, die sie katalysieren, in fünf verschiedene Klassen eingeteilt werden:

1. **Nukleasen** schneiden Nukleinsäuremoleküle, verkürzen sie oder bauen sie ab.
2. **Ligasen** können verschiedenen Nukleinsäuremoleküle miteinander verknüpfen.
3. **Polymerasen** katalysieren die templatgesteuerte DNA-Synthese.
4. **Modifikationsenzyme** können chemische Gruppen entfernen oder hinzufügen.
5. **Topoisomerasen** steuern die Topologie von super coiled DNA.

Zum Teil gibt es Überschneidungen zwischen diesen Klassen, da manche Enzyme, wie beispielweise die Polymerasen, verschiedene Aktivitäten zeigen. In der Zelle sind die unterschiedlichen Enzyme an lebenswichtigen Vorgängen, wie z. B. der Replikation, der

Transkription oder dem Abbau von zellfremder DNA beteiligt. Glücklicherweise ist es aber möglich, die verschiedenen Eigenschaften der isolierten Enzyme unter künstlichen Bedingungen als molekulare Werkzeuge zu benutzen. Die Anwendungen und Funktionsweisen der ersten vier Klassen von Enzymen stehen in direktem Zusammenhang mit der hier vorgestellten Arbeit und werden daher im Folgenden kurz erläutert.

2.4.1 DNA-Nukleasen

Die charakteristische Eigenschaft von Nukleasen ist die Spaltung der Phosphordiesterbindung von Nukleinsäuren. Dem entsprechend gibt es sowohl DNA- als auch RNA-Nukleasen. Die Spaltung erfolgt immer in der Art, dass eine „biologisch intakte“ Nukleinsäure mit einer 3'-OH- und einer 5'-Phosphatgruppe gebildet wird. Die Klasse der DNA-Nukleasen kann in zwei Gruppen aufgeteilt werden: Exonukleasen greifen die DNA vom Ende her an und entfernen ein Nukleotid nach dem Anderen. Endonukleasen führen zur Spaltung innerhalb einer DNA-Sequenz, so dass zwei polymere bzw. oligomere Fragmente gebildet werden. Bei der Einwirkung von Nukleasen auf DNA spricht man im Allgemeinen auch davon, dass die betreffende DNA „verdaut“ wird. Im speziellen Fall der enzymatischen Spaltung durch Endonukleasen wird der Begriff der „Restriktion“ oder des „Schneidens“ verwendet.

2.4.1.1 Exonukleasen

Verschiedene Exonukleasen haben unterschiedliche „Polaritäten“ d.h. ein gegebenes DNA-Substrat wird entweder in 5'-3'- oder in 3'-5'-Richtung abgebaut. Hinzu kommt, dass einige Exonukleasen bevorzugt Einzelstränge abbauen, während andere Nukleasen dsDNA als Substrat bevorzugen. Dadurch können beispielsweise überstehende Enden von einem dsDNA-Fragment entfernt werden, ohne dass der Doppelstrang angegriffen wird. Die Lambda Exonuklease reagiert sogar auf die Anwesenheit einer Phosphatgruppe, so dass es mit diesem Enzym möglich ist, weitgehend selektiv, nur einen Strang einer einseitig phosphorylierten Doppelstrang-DNA abzubauen.

2.4.1.2 Endonukleasen

Die Gruppe der Endonukleasen kann wiederum in drei verschiedene Typen aufgeteilt werden. Die Enzyme des Typs I sind komplexe Enzyme, die aus mehreren Untereinheiten aufgebaut sind und sowohl eine Endonukleaseaktivität als auch eine Methylierungsaktivität zeigen. Diese Enzyme haben jedoch keine praktische Anwendung, da sie die DNA an einer mehr oder weniger zufälligen Stelle schneiden. Die Nukleasen des Typs III kombinieren ebenfalls Methylierungs- und Restriktionsaktivitäten. Bei diesen Enzymen ist die Spaltung der DNA in der Regel nicht quantitativ, so dass auch diesen Enzymen keine praktische Bedeutung

zukommt. Der Begriff des Restriktionsenzym wird deshalb in vielen Fällen synonym mit Endonukleasen des Typs II verwendet. Diese Enzyme zeigen in der Regel keine Methylierungsaktivität und führen zu einer sehr spezifischen und quantitativen Restriktion. Der einzige benötigte Cofaktor sind Magnesiumionen. Die am häufigsten auftretende Art von Typ II Nukleasen sind relativ kleine Enzyme (ca. 200-350 Aminosäuren pro Untereinheit), die innerhalb einer palindromischen Erkennungssequenz schneiden, da sie als Homodimere an die DNA angelagert werden. Es gibt sowohl kontinuierliche (z.B. EcoRI: GAATTC) als auch diskontinuierliche Erkennungssequenzen (z.B. BglI: GCCNNNNNGGC). Heterodimere Enzyme, mit asymmetrischen Erkennungssequenzen treten sehr viel seltener auf. Neben diesen typischen Vertretern von Typ II Nukleasen gibt es auch etwas ungewöhnlichere Enzyme, die an einer bzw. zwei Stellen außerhalb der Erkennungssequenzen schneiden. Einige Endonukleasen („nicking Enzymes“) erzeugen lediglich einen Einzelstrangbruch, die meisten Enzyme dieser Klasse spalten jedoch beide Stränge der DNA gleichzeitig. Die beiden Schnitte liegen entweder im selben Basenpaar gegenüber, was zu zwei Fragmenten mit glatten Enden („blunt-ends“) führt oder die beiden Schnitte sind gegeneinander versetzt, so dass Fragmente mit überstehenden Enden („sticky-ends“) gebildet werden. Die Erkennungssequenzen von Endonukleasen bestehen üblicherweise aus vier bis acht Basen. Die resultierenden überstehenden Enden, es sind sowohl 3'- als auch 5'-Überhänge möglich, haben in den meisten Fällen eine Länge von 2-4 Basen. Mit etwas exotischeren Enzymen können sowohl kürzere als auch längere Überhänge, von bis zu sechs Basen erzeugt werden.

Die Namensgebung der verschiedenen Endonukleasen bezieht sich auf die Organismen, aus denen sie isoliert wurden. Aus diesem Grund ist es möglich, dass zwei Enzyme mit gleicher Erkennungssequenz und identischen Schnittstellen verschiedene Namen tragen. Solche Enzymärchen werden als Isoschizomere bezeichnet. Außerdem gibt es Enzyme mit identischen Erkennungssequenzen, aber unterschiedlichen Schnittstellen, die man als Neoschizomere bezeichnet.

2.4.2 DNA-Ligasen

In allen lebenden Zellen treten DNA-Ligasen auf, da sie am Prozess der Replikation und an verschiedenen Reparaturmechanismen beteiligt sind. Ligasen stellen sozusagen das Gegenstück zu den Endonukleasen dar, da sie in der Lage sind zwei verschiedene DNA-Fragmente über Phosphordiesterbindungen miteinander zu verknüpfen oder Einzelstrangbrüche zu reparieren. Auch hier gibt es verschiedene Enzyme aus verschiedenen Organismen, die sich in den Details ihrer Aktivitäten unterscheiden. Die am häufigsten verwendete DNA-Ligase wird aus *E. coli* Bakterien gewonnen, die mit dem Bakteriophagen T4 infiziert wurden. Dieses Enzym ist unter Verwendung von ATP und Mg^{2+} als Cofaktor in der Lage Einzelstrangbrüche zu schließen und sowohl komplementäre überstehende Enden als auch glatte Enden von dsDNA Fragmenten miteinander zu verknüpfen. Je nach Substrat sind die Reaktionsbedingungen etwas unterschiedlich, die Ausbeute der Ligation liegt jedoch laut Herstellerangaben in der Regel oberhalb von 95 %.

2.4.3 DNA-Polymerasen

Diese Klasse von Enzymen ist in der Lage, einen neuen DNA-Strang anhand eines komplementären DNA- oder RNA-Matrizenstranges (dem sogenannten Templat) zu synthetisieren. In der Regel sind Polymerasen auf einen kurzen Doppelstrangabschnitt innerhalb des Templates angewiesen, der als Startpunkt der Polymerisation dient. Das 3'-Ende dieses Doppelstrangabschnittes wird auf der Grundlage der Basenabfolge des Templatestranges verlängert. Es gibt im Wesentlichen vier verschiedene Arten von Polymerasen, die in der Gentechnologie routinemäßig eingesetzt werden. Bei der sogenannten „nick translation“ werden Enzyme in der Art der Polymerase I von *E. coli* verwendet, die sowohl eine Polymerase- als auch eine Exonukleaseaktivität besitzen. Die Polymerisation startet an einem Einzelstrangbruch oder 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. Die dritte Art von Polymerasen sind temperaturbeständige (thermophile) Enzyme, die in der PCR zur Vervielfältigung von klar definierten Doppelstrangfragmenten eingesetzt werden können. Das Paradebeispiel ist hier die Taq-DNA-Polymerase. (Die PCR wird im Abschnitt 2.6 näher erläutert.) Die vierte nützliche Art von Polymerasen ist die Reverse Transkriptase, die in der Lage ist RNA als Templat für die Synthese von DNA-Sequenzen zu verwenden.

2.4.4 Modifikationsenzyme

Unter den DNA-Modifikationsenzymen gibt es drei technisch relevante Gruppen:

Alkalische Phosphatasen entfernen die 5'-Phosphatgruppe von einem DNA-Strang. Eine Dephosphorylierung mittels Phosphatasen kann nützlich sein, wenn gewisse Fragmente in einem Ligationsansatz nicht verknüpft werden sollen. Auf diese Weise kann beispielsweise die Religation eines Klonierungsvektors während der Einführung eines Integrats vermieden werden (vgl. Abschnitt 2.5).

Polynukleotidkinasen (bzw. Phosphotransferasen) haben die umgekehrte Wirkung, d.h. an eine 5'-OH-Gruppe, wie sie beispielsweise in synthetischen Oligonukleotiden auftritt, wird eine Phosphatgruppe angefügt. Hierbei wird die Phosphatgruppe durch die Kinase von ATP auf das 5'-Ende der DNA übertragen. Diese Methode ist sowohl bei ssDNA, als auch bei dsDNA anwendbar, im Vergleich zur chemischen Phosphorylierung ist die Ausbeute jedoch deutlich niedriger. Die Garantie des Herstellers (Polynucleotid Kinase, Roche) liegt bei 30 %. Synthetische Oligonukleotide werden deshalb besser während der Festphasensynthese phosphoryliert. Die Verwendung von Polynukleotidkinasen spielt allerdings bei der radioaktiven Markierung mit [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP eine wichtige Rolle.

Terminale Desoxynukleotidyltransferasen sind in der Lage einzelne oder auch mehrere Nukleotide an das 3'-Ende einer DNA anzufügen. Diese Enzyme können beispielsweise zur Farbstoffmarkierung eingesetzt werden. In diesem Fall wird ein farbstoffmarkiertes 2,3-Dideoxynukleotid an das 3'-Ende eines DNA-Fragmentes gebunden. Eine weitere Anwendung ist das „tailing“, d. h. die Erzeugung von homopolymeren Einzelsträngen an den Enden eines Doppelstrangfragments. Mit dieser Methode können beispielsweise zwei verschiedene Doppelstrangfragment mit glatten Enden miteinander kompatibel gemacht werden. Beim „tailing“ werden an den Enden des einen Fragments beispielsweise poly(dG)-Abschnitte und an den Enden des anderen Fragmentes poly(dC)-Abschnitte erzeugt. In der Praxis sind die erzeugten Homopolymersequenzen nicht gleich lang, so dass bei der Hybridisierung zwischen den beiden Fragmenten eine Einzelstranglücke von einigen Basen entsteht. Diese lässt sich beispielsweise mit der Klenow-Polymerase auffüllen und die verbleibende Lücke kann durch Ligation geschlossen werden. Wenn es sich bei den beiden Fragmenten um einen Vektor und ein Integrat handelt (vgl. Abschnitt 2.5) ist es ebenso möglich, die DNA direkt nach der Hybridisierung der beiden Fragmente in eine Wirtszelle einzuschleusen. Die erforderlichen „Reparaturarbeiten“ werden dann von den zelleigenen Enzymen übernommen.

2.5 Die Klonierung von DNA

Durch geschickte Kombination der in den letzten Abschnitten vorgestellten enzymatischen Werkzeuge wurde eine Vielzahl von gentechnischen Methoden zur gezielten Manipulation von natürlich auftretender DNA entwickelt. Ein besonderer Meilenstein war die Entdeckung der Endonukleasen und die damit verbundene Entwicklung der Klonierung. Ein typisches Klonierungsexperiment besteht im Wesentlichen aus drei Schritten:

1. Ein DNA-Fragment, das sogenannte Integrat bzw. Insert, welches das zu untersuchende Gen enthält, wird in ein ringförmiges DNA-Molekül, den sogenannten Vektor, eingebaut („Rekombination“).
2. Der Vektor dient als Vehikel, um das rekombinante DNA-Molekül in eine Wirtszelle, in den meisten Fällen eine Bakterienzelle, zu transportieren („Transformation“). Aus statistischen Gründen wird bei diesem Prozess maximal ein DNA-Molekül von jeder Zelle aufgenommen. Dadurch führt die Transformation, selbst bei sehr komplexen Mischungen von unterschiedlichen rekombinanten DNA-Molekülen, zu einer perfekten Aufteilung der verschiedenen Spezies auf unterschiedliche Zellen.
3. Die erhaltenen Zellen werden auf ein Nährmedium gegeben und kultiviert. Jede einzelne Zelle führt durch Zellteilung zur Bildung einer individuellen Bakterienkolonie. Alle Zellen einer gegebenen Kolonie, d.h. also eines Klons, tragen exakt identische DNA-Moleküle. Die verschiedenen Kolonien können getrennt voneinander untersucht werden oder die Selektion zwischen den „richtigen“ und „falschen“ Kolonien wird durch geeignete Techniken direkt auf dem Nährmedium durchgeführt, bevor die rekombinante DNA aus den Zellen isoliert wird.

Die großen Stärken der Klonierung liegen in der perfekten Trennung von unterschiedlichen DNA-Fragmenten und dem enorm hohen Vervielfältigungsfaktor. Durch die perfekte Trennung ist es möglich einzelne Gene bzw. Genabschnitte in isolierter Form zu untersuchen oder zu manipulieren. Das Verfahren bietet beispielsweise eine alternative Möglichkeit zur Erzeugung von gentechnologisch interessanten Enzymen: Bei der klassischen Isolierung von Enzymen aus natürlichen Quellen ist es oft relativ schwierig das erwünschte Enzym in reiner Form zu gewinnen. Beispielsweise führt die Isolierung der Endonuklease AvrII aus dem Bakterium *Anabaena variabilis* in der Regel zu einer Verunreinigung durch AvrI. Wenn es gelingt das für AvrII kodierende Gen in einen passenden Vektor zu integrieren, ist es möglich das erwünschte

Protein in einer geeigneten Wirtszelle oder auch *in vitro* zu exprimieren. Auf diesem Weg ist es außerdem deutlich einfacher ein bestimmtes Gen so zu manipulieren, dass unerwünschte Aktivitäten des entsprechenden Enzyms zerstört werden. Der enorm hohe Vervielfältigungsfaktor während der Klonierung ermöglicht eine *in vitro* Untersuchung auch an solchen DNA-Abschnitten, die aus natürlichen Quellen nur in sehr begrenzten Mengen gewonnen werden können.

Als Vektoren für Klonierungsexperimente mit bakteriellen Zellen kommen in erster Linie Plasmide oder die Chromosomen von Bakteriophagen in Frage. Im Folgenden werden einige der charakteristischen Eigenschaften von Plasmiden diskutiert, die sie zur Verwendung als Vektoren in Klonierungsexperimenten prädestinieren: Plasmide sind relativ kleine ringförmige DNA-Moleküle (ca. 2500-4500 bp), die in vielen natürlichen Bakterienstämmen auftreten. Größere DNA-Moleküle sind deutlich schwieriger zu handhaben, da hier bereits die Scherkräfte während dem Pipettieren einer DNA-Lösungen zum Bruch des Polymerrückgrads führen können. Plasmide tragen in der Regel ein oder zwei Gene, die häufig nützliche Eigenschaften der jeweiligen Bakterienzelle, wie z. B. Antibiotikaresistenzen kodieren. Außerdem sind Plasmide autoreplikative Systeme, d. h. sie sind in der Lage sich selber, unabhängig von der genomischen DNA der Wirtszelle, zu vervielfältigen. Typische Klonierungsvektoren wurden durch die Kombination verschiedener Gene aus natürlich vorkommenden Plasmiden konstruiert. Eine häufig verwendete Art von Vektoren für *E. coli* sind die pUC-Plasmide. Diese Gruppe von Klonierungsvektoren trägt eine Antibiotikaresistenz gegen Ampicillin, einen Replikationsursprung, der zu einer sehr hohen Zahl von Kopien führt (ca. 500-700 pro Zelle) und einen Abschnitt mit vielen verschiedenen Restriktionsstellen („multiple cloning site“), der in die Sequenz des *lacZ*-Gens integriert ist. Die verschiedenen pUC-Plasmide unterscheiden sich lediglich durch den Aufbau und die Größe der multiple cloning site. Die Eigenschaften und Funktionsweisen der pUC-Plasmide lassen sich am anschaulichsten an einem einfachen Klonierungsexperiment beschreiben:

Im einfachsten Fall wird aus einer gegebenen DNA-Sequenz mit Hilfe einer sequenzspezifischen Endonuklease ein klar definiertes Segment herausgeschnitten. Mit dem gleichen Enzymen wird ein passender pUC-Vektor innerhalb der *multiple cloning site* restringiert. Da die erzeugten überstehenden Enden zueinander komplementär sind, kann das Integrat mit dem linearisierten Vektor verknüpft und durch Ligation fixiert werden. Bei der Ligation kann es neben der Bildung der erwünschten rekombinanten DNA zur Religation des Vektors ohne Integrat oder zur Selbstligation des Integrats kommen (Abb. 19). Diese Prozesse können unterbunden werden, wenn man die Restriktion von Integrat und Vektor jeweils mit

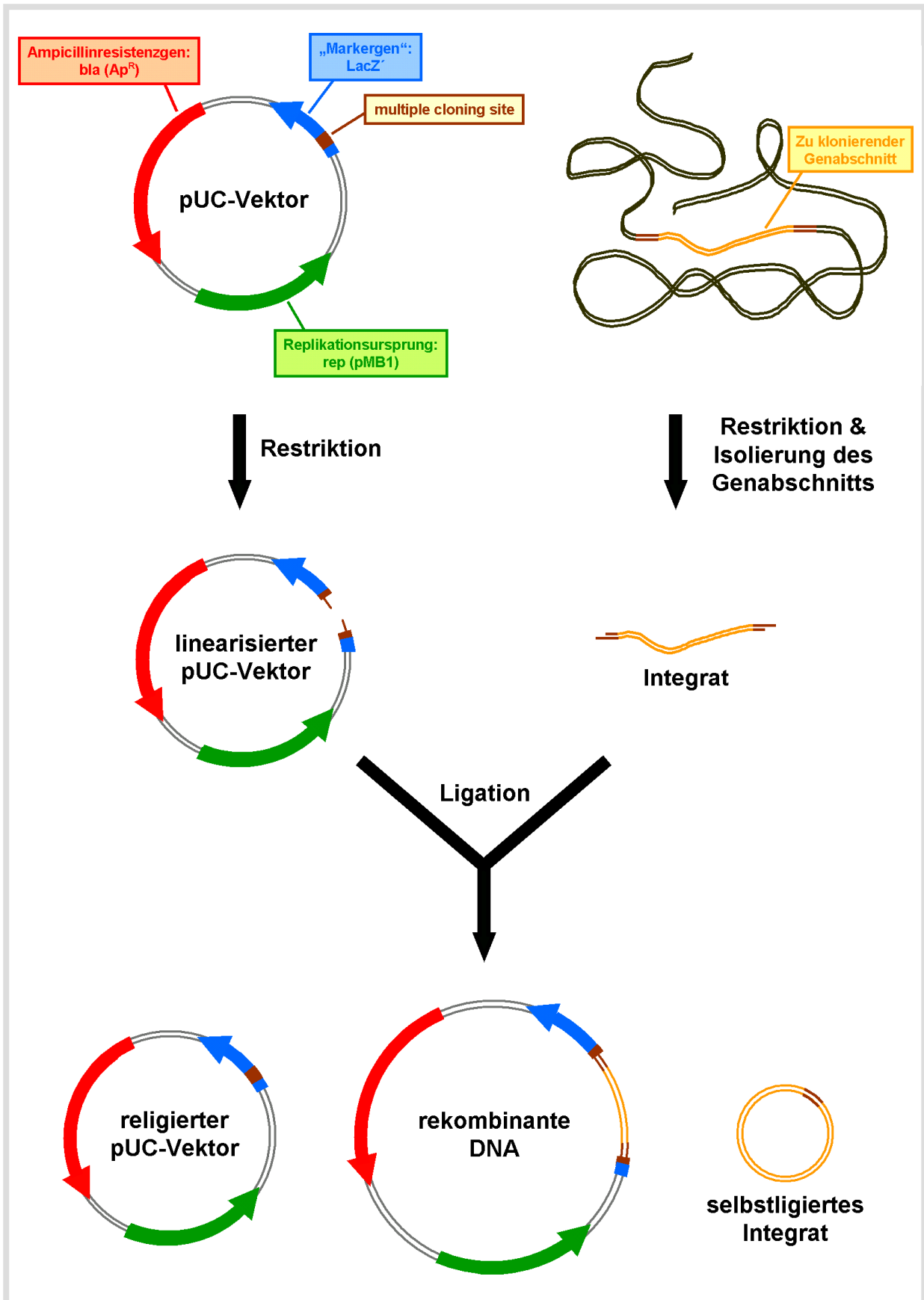


Abb. 19: Erzeugung rekombinanter DNA für Klonierungsexperimente. Im einfachsten Fall kann der zu klonierende Genabschnitt mit einem einzelnen Restriktionsenzym aus einer gegebenen DNA herausgeschnitten werden. Der Genabschnitt wird isoliert und mit einem passenden Vektor kombiniert, der mit dem gleichen Enzym linearisiert wurde. Da die gebildeten überstehenden Enden selbstkomplementäre Sequenzen tragen führt die anschließende Ligation zu einer Mischung der rekombinanten DNA mit dem religierten Plasmid und dem selbstligierten Integrat.

zwei verschiedenen Enzymen durchführt, so dass an beiden Fragmenten zwei unterschiedliche sticky-ends erzeugt werden. Auf diese Weise ist auch die Orientierung des Integrats innerhalb des Vektors vorgegeben. In vielen Fällen sind diese Maßnahmen jedoch nicht erforderlich, da die Eigenschaften der pUC-Plasmide eine Selektion zwischen Zellen mit religierten und rekombinanten DNA-Molekülen erlauben. Prinzipiell ist bei der Ligation auch der Einbau von mehreren Integraten in den gleichen Vektor denkbar. Dieser Prozess ist aber bei der Verwendung geeigneter DNA-Konzentrationen sehr unwahrscheinlich. Die Transformation, das heißt die Aufnahme der DNA aus freier Lösung in bakterielle Zellen, kann beispielsweise durch Elektroporation erfolgen. Die verwendeten Zellen dürfen natürlich keine eigenen Plasmide enthalten, da die Klonierung sonst zu einer Mischung von natürlichen und rekombinanten Plasmiden führt. Bei dem Verfahren der Elektroporation wird durch einen kurzen Spannungspuls ein elektrisches Feld von etwa 10-40 kV/cm erzeugt, das zur Bildung von mikroskopisch kleinen Löchern in der Zellmembran führt, die sich innerhalb weniger Millisekunden wieder schließen. Durch diese Löcher kann die Fremd-DNA aus der Lösung ins Innere der Zellen gelangen. Da die Wahrscheinlichkeit für die Aufnahme der DNA sehr klein ist, wird von jeder Zelle maximal ein Molekül aufgenommen. Die Transformation führt also zu einer Mischung von vier verschiedenen Zellarten: Die erwünschten Bakterien tragen das rekombinante Plasmid, während die drei anderen Zellarten entweder gar keine Fremd-DNA oder lediglich den religierten Vektor, bzw. das zirkularisierte Integrat enthalten. Auf einem ampicillinhaltigen Nährmedium können jedoch nur die Bakterien überleben, die ein religiertes bzw. rekombinantes pUC-Plasmid enthalten, das für die lebensnotwendige Ampicillinresistenz sorgt. Durch das Ausplattieren der Zelllösung auf ein gelartiges Nährmedium, wachsen die individuellen Bakterienzellen zu räumlich getrennten Bakterienkolonien heran. Natürlich auftretende *E. coli* Bakterien enthalten das lacZ-Gen, das die β -Galactosidase codiert. Dieses Protein ist in der Natur am Abbau von Lactose zu Glucose beteiligt. Für Klonierungsexperimente mit pUC-Plasmiden werden *E. coli*-Stämme eingesetzt, bei denen ein großer Abschnitt dieses Gens entfernt wurde. Diese Mutanten sind nur in der Lage die β -Galactosidase zu bilden, wenn sie ein entsprechendes pUC-Plasmid aufgenommen haben, das den fehlenden lacZ'-Teil des Gens enthält. Durch die Einführung eines Integrats in die multiple cloning site eines pUC-Plasmids wird die Funktion des lacZ'-Abschnittes zerstört. Rekombinante Bakterienzellen sind deshalb, im Unterschied zu Bakterien die ein religiertes Plasmid enthalten, nicht mehr in der Lage β -Galactosidase zu synthetisieren. Die Untersuchung auf An- oder Abwesenheit dieses Enzyms erfolgt durch das Lactoseanalogon X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indol- β -D-galactopyranosid), das von der β -Galactosidase zu einem dunkelblauen Farbstoff zerlegt wird. Setzt man dem ampicillinhaltigen Nährmedium X-Gal und einen

Induktor für das Enzym (z.B. IPTG: Isopropylthiogalactosid) zu werden Bakterienkolonien die ein religiertes Plasmid enthalten blau eingefärbt, während die rekombinanten Kolonien farblos bleiben. Dieses Prinzip wird als „blau-weiß-Selektion bzw. „Lac-Selektion“ bezeichnet (Abb. 20). Mit einer der farblosen Kolonien wird nun ein flüssiges Nährmedium angeimpft, in dem die rekombinanten Bakterien vermehrt werden.

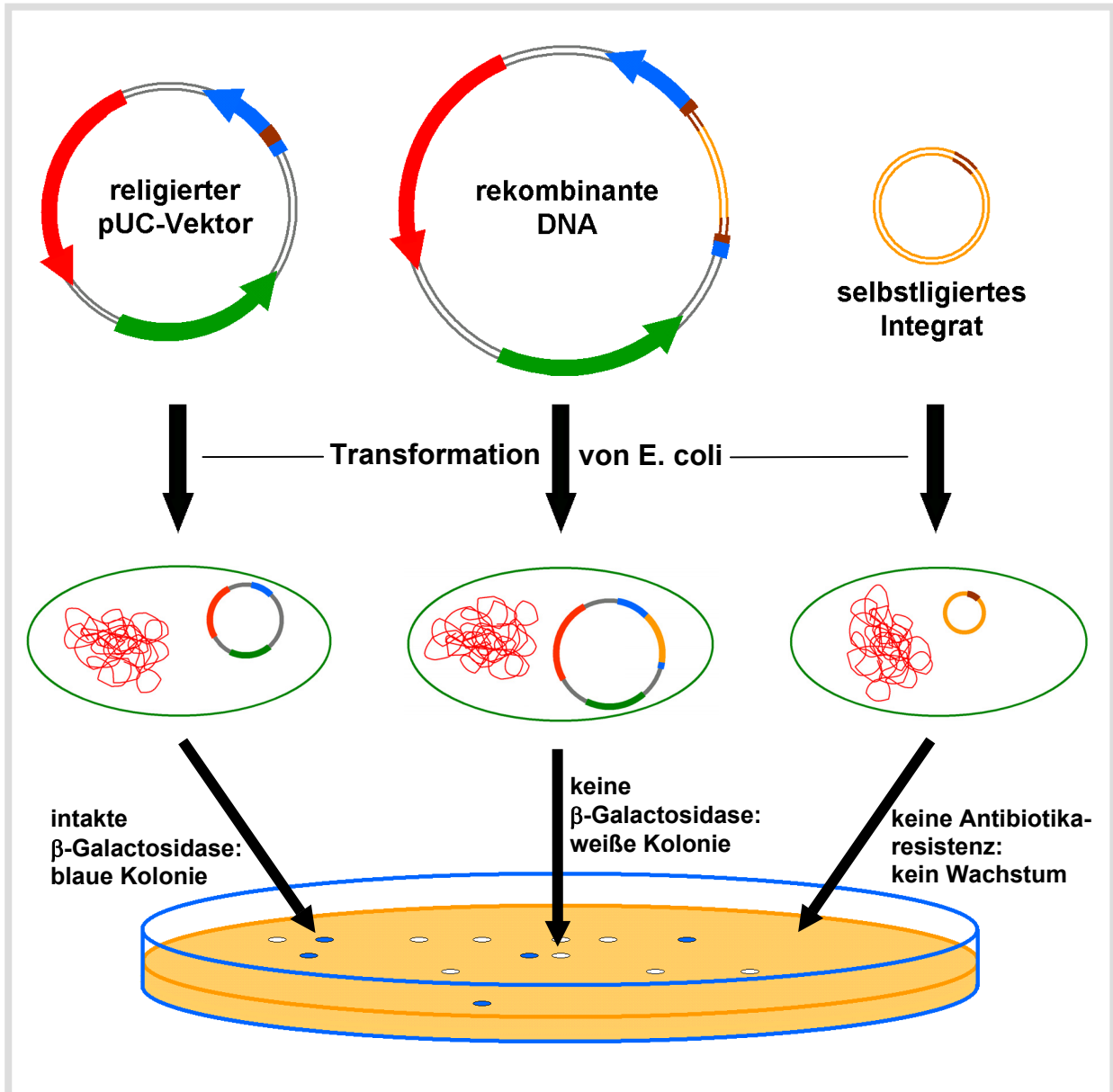


Abb. 20: Schematischer Ablauf von Transformation und Selektion. Die Probenlösung aus der Ligation enthält eine Mischung von religiertem Vektor, rekombinanter DNA und dem selbstligierten Integrat. Diese Mischung wird in der Transformation eingesetzt. Die Selektion zwischen den verschiedenen Molekülsorten erfolgt erst auf Ebene der Bakterien: Die Wahrscheinlichkeit für das Eindringen der DNA in die bakteriellen Zellen während der Transformation ist so gering, dass von jeder Zelle maximal ein Molekül aufgenommen wird. Die Zelllösung wird anschließend so verdünnt auf ein gelartiges Nährmedium aufgebracht, das jede individuelle Zelle zu einer separaten Kolonien heranwachsen kann. Zellen die gar keine DNA oder das selbstligierte Integrat aufgenommen haben verfügen nicht über die im Vektor codierte Antibiotikaresistenz und können daher auf ampicillinhaltigen Nährmedien nicht überleben. Bakterien die das religierte Plasmid enthalten sind zwar gegen das Antibiotikum resistent, die Expression von β -Galactosidase führt aber zum Abbau des X-Gal-Indikators und somit zu einer Blaufärbung der betreffenden Bakterienkolonien. Die Zellen, die ein rekombinantes Plasmid aufgenommen haben verfügen ebenfalls über die lebensnotwendige Resistenz, das LacZ'-Gen ist aber durch den Einbau des Integrats nicht funktionsfähig, so dass in diesen Kolonien keine Blaufärbung auftritt.

Ein kleiner Teil der so gewonnenen Bakterien kann in einer Lösung von 50 % Glycerin in Wasser (v/v) bei tiefen Temperaturen gelagert werden, so dass bei Bedarf eine erneute Vermehrung exakt identischer Zellen möglich ist. Nach der Zerstörung der restlichen Bakterienzellen können die rekombinanten Plasmide von der genomischen DNA, Zellresten und bakteriellen Proteinen abgetrennt werden. Neben den beschriebenen Möglichkeiten zur Transformation und Selektion bieten verschiedene Vektoren weitere Vorteile. Da die Sequenzen des Vektors in direkter Nachbarschaft des Integrats bekannt sind, ist es sehr einfach unbekannte DNA-Fragmente, die in einen Vektor eingebaut wurden, zu sequenzieren. Andere Plasmide tragen beispielsweise Promotorsequenzen, die als Startpunkt für die *in vitro* Transkription dienen.

2.6 Die Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Neben der *in vivo* Vervielfältigung von DNA, wie sie beispielsweise bei der Klonierung eingesetzt wird, ist mit Hilfe der PCR auch eine *in vitro* Vervielfältigung möglich. Die Idee für das grundlegende Prinzip der PCR wurde bereits Anfang der 70er Jahre von K. Kleppe veröffentlicht [102], geriet aber in Vergessenheit bis sie 1983 von K. Mullis neu erfunden wurde, der für seine Arbeit 1993 den Nobelpreis erhielt. In der PCR wird ein DNA-Doppelstrangabschnitt zunächst bei hohen Temperaturen ($> 90^{\circ}\text{C}$) vollständig denaturiert. Beim schnellen Abkühlen werden zwei kurze komplementäre Oligonukleotide, die „Primer“, an die 3'-Enden der beiden Einzelstränge dieses Abschnittes angelagert. Die 3'-OH-Gruppe der Primer dient als Startpunkt für die Polymerase, die auf der Grundlage der Sequenz des Templatstranges den komplementären Strang aus Desoxynukleotidtriphosphaten aufbaut. Auf diese Weise werden zwei neue Doppelstrangabschnitte gebildet, die mit dem Ausgangsmaterial identisch sind. Das mehrfache Wiederholen dieses Vorgehens führt somit zu einer exponentiellen Vervielfältigung des Ausgangsmaterials (Abb. 21). In den ursprünglichen Arbeiten von K. Mullis wurde die Polymerase I von *E. coli* verwendet. Dieses Enzym wird jedoch bei hohen Temperaturen vollständig zerstört und musste daher in jedem Zyklus erneut zugegeben werden. Die volle Leistungsfähigkeit der PCR-Technik konnte sich daher erst mit der Entdeckung von hitzestabilen Polymerasen aus thermophilen Organismen entfalten. Das klassische Beispiel einer thermophilen Polymerase ist die Polymerase I des Bakteriums *Thermus aquaticus*, die als Taq-Polymerase bezeichnet wird. Dieses Bakterium tritt in heißen Quellen auf und enthält daher eine ganze Reihe von thermostabilen Enzymen. Durch die Verwendung derartiger Polymerasen ist die praktische Durchführung einer PCR denkbar einfach geworden.

Das zu vervielfältigende DNA-Fragment wird in einem geeigneten Puffer mit den beiden Primern, dNTPs und der Polymerase versetzt und anschließend in einem Thermocycler bei verschiedenen Temperaturen inkubiert.

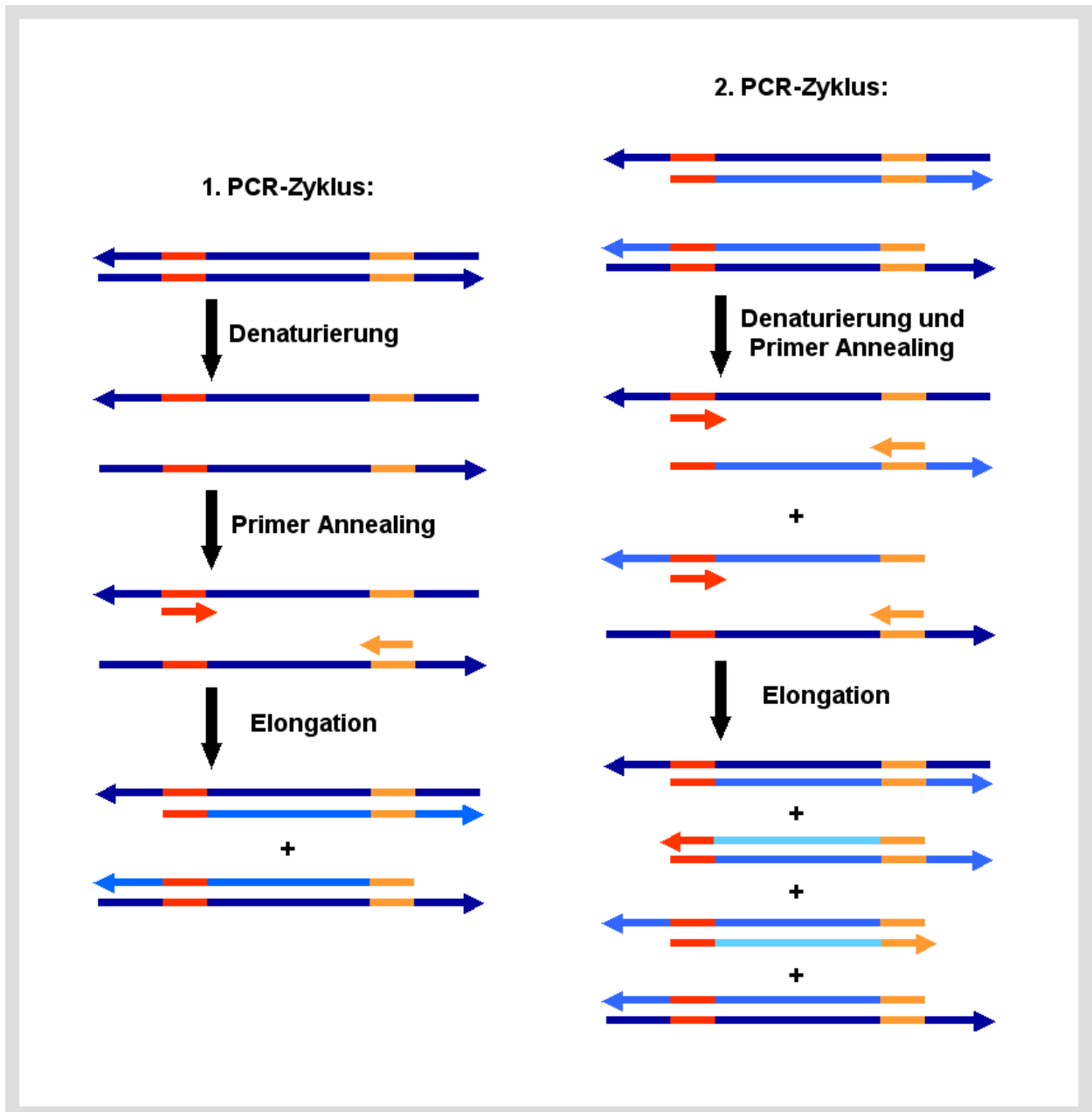


Abb. 21: Schematischer Verlauf der Vervielfältigung eines DNA-Abschnittes mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion. Die Sequenzen der verwendeten Primer müssen so gewählt werden, dass sie zu den Randbereichen des zu amplifizierenden Sequenzabschnittes (rot bzw. orange) komplementär sind. Die Templat-DNA wird zunächst bei hohen Temperaturen denaturiert. Beim schnellen Abkühlen lagern sich die beiden Primer an die komplementären Sequenzabschnitte bevor die Templat-DNA in der Lage ist zu renaturieren. Die 3'-Enden der angelagerten Primer werden von der Polymerase verlängert, bis das 5'-Ende des Templatstranges erreicht ist oder die Polymerisation zufällig abbricht. Durch den ersten PCR-Zyklus wird die Zahl der Templatstränge, die den zu amplifizierenden Bereich enthalten verdoppelt. Die beiden neu synthetisierten Stränge sind jedoch etwas kürzer, da die Sequenzen am 5'-Ende der beiden Tochterstränge durch die Sequenzen des jeweiligen Primers gegeben 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. In den folgenden Zyklen werden diese Stränge exponentiell vervielfältigt, während die Amplifikation der Tochterstränge der ersten Generation lediglich linear erfolgt.

Die PCR ist eine extrem empfindliche Methode. Bei sachgemäßer Durchführung ist es möglich einzelne Moleküle so stark zu vervielfältigen, dass sie mit gängigen Methoden nachweisbar sind. Die Ausbeute einer PCR kann jedoch nicht, wie es zunächst scheint, durch bloße Erhöhung der Anzahl an Zyklen beliebig erhöht werden. Je nach Startkonzentration der Templat-DNA flacht die zunächst exponentielle verlaufende Amplifikation nach etwa 25-30 Zyklen immer mehr ab. Dieser Plateau Effekt ist neben anderen Effekten darauf zurückzuführen, dass die verschiedenen Reaktionskomponenten verbraucht oder auch abgebaut werden. Im Extremfall, d.h. bei deutlich mehr als 40 Zyklen, kann es sogar dazu kommen, dass die PCR nur noch Nebenprodukte liefert. Diese Tatsache ist sehr wahrscheinlich auf eine Zerstörung der Polymerase zurückzuführen, die zu völlig unkontrollierten Enzymaktivitäten führen kann. Ein weiteres Problem, das in unterschiedlichem Ausmaß in fast allen PCR-Systemen auftritt, ist die Bildung von Primer-Dimeren, d.h. die Bildung von kleinen Doppelstrangfragmenten, 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, erstaunlicherweise tritt die Primer-Dimer Bildung aber auch im Falle von nicht komplementären Primern auf [103]. Dieses Phänomen kann eigentlich nur durch alternative Basenpaarungsmuster oder einen Prozess, der im gewissen Sinne mit der Ligation von glatten Enden vergleichbar ist, erklärt werden. Bei dem Design von geeigneter Primersequenzen müssen außerdem einige generelle Details beachtet werden:

Länge der Primer: Die verwendeten Sequenzen müssen ausreichend lang sein, um eine spezifische Hybridisierung an der erwünschten Stelle des Templates zu garantieren. Eine Kombination von vier Basen wird in einer zufälligen Sequenz rein statistisch alle 256 Basen einmal auftreten. Eine Sequenz von 15 Basen wird hingegen nur einmal in einer zufälligen Sequenz von 10^9 Basen erwartet. Die Sequenz eines Primer mit mehr als 15 Basen sollte daher in jedem Fall eindeutig sein. Da die Länge der Primer aber auch einen Einfluss auf die Hybridisierungsgeschwindigkeit mit dem Templatstrang zeigt, wird die Effizienz der PCR bei zu langen Primern negativ beeinflusst. In der Praxis haben Primer daher eine Länge von etwa 15-30 Basen.

Schmelzpunkte der Primer: Aus praktischen Gründen, im Bezug auf das erforderliche Temperaturprogramm, sollten die Schmelzpunkte der Primer im Bereich von etwa 55-80 °C liegen. Die Schmelzpunkte der beiden Primer müssen außerdem relativ ähnlich sein, d.h. sie sollten innerhalb eines Bereiches von etwa 5 °C übereinstimmen, damit keine bevorzugte Hybridisierung auftritt, die im Extremfall zur Anreicherung von einem der beiden Templatstränge führen kann.

Sequenz der Primer: Die Sequenzen der Primer dürfen selbstverständlich nicht untereinander oder zu sich selbst komplementär sein. Es ist günstig, wenn für die letzte bzw. die beiden letzten Basen am 3'-Ende der Primer Guanin oder Cytosin verwendet werden, da eine stabile Hybridisierung am Startpunkt der DNA-Synthese die Effektivität der Primerverlängerung erhöht. Der GC-Gehalt der gesamten Sequenz sollte im Bereich von 50-60 % liegen. Ein zu hoher Gehalt an Gs und Cs erhöht die Wahrscheinlichkeit einer unspezifischen Hybridisierung, während ein zu niedriger Anteil eine starke Verringerung des Schmelzpunktes mit sich bringt. Abfolgen von drei oder mehr Gs oder Cs 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. Die Angaben der Hersteller von Polymerasen bieten hier einen guten Ausgangspunkt*. 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. Eine umfassende Beschreibung der verschiedenen Möglichkeiten übersteigt bei weitem den Rahmen dieser Arbeit. Die Sanger-Sequenzierung [104] stellt jedoch eine technisch besonders wichtige Variante der PCR dar, die auch im Verlauf der hier vorgestellten Experimente zum Einsatz kam und wird daher im Folgenden kurz erläutert.

2.6.1 Sanger-Sequenzierung

Im Unterschied zur chemischen Sequenzierung nach Maxam und Gilbert [101] kann die Sanger-Sequenzierung zu großen Teilen automatisiert werden. Dadurch ist es möglich eine Vielzahl von Sequenzierungen mit relativ wenig Arbeitsaufwand parallel zu bewältigen. Bei dieser Methode wird im Unterschied zur normalen PCR nur ein Primer eingesetzt, der sich am 3'-Ende des zu sequenzierenden DNA-Abschnittes angelagert. Dadurch wird lediglich einer der beiden Templatstränge vervielfältigt. Die Amplifikation erfolgt also nicht exponentiell, sondern nur linear, da nur der zum Templat komplementäre Strang neu synthetisiert wird und daher die Templatkonzentration im Verlauf der PCR konstant bleibt. Neben den vier

* Die Internetseite von New England Biolabs liefert zu Themengebieten, die mit der Verwendung verschiedener Enzyme zusammenhängen, teilweise sehr gute und umfangreiche Hintergrundinformationen und auch die Telefonhotline bietet eine sehr ausführliche, fachkompetente Beratung.

verschiedenen 2'-Desoxynukleotidtriphosphaten werden dem Reaktionsansatz kleine Mengen von 2'-3'-Dideoxynukleotidtriphosphaten zugesetzt. Da die ddNTPs keine 3'-OH-Gruppe tragen, können die Ketten in die ein solches Nukleotid eingebaut wurde, nicht mehr weiter verlängert werden. Dadurch entstehen alle, vom 5'-Ende ausgehenden Untersequenzen des untersuchten Abschnittes. Die vier verschiedenen Kettenabbruch-ddNTPs sind mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, d.h. jede Untersequenz trägt eine Farbstoffmarkierung, die für die terminale Base am 3'-Ende charakteristisch ist. Die Markierungen werden so gewählt, dass eine gleichzeitige Anregung der Fluoreszenzen zur Emission bei verschiedenen Wellenlängen führt. Diese Fragmente werden mit Hilfe der Kapillarelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Aus der Reihenfolge der verschiedenen Farbstoffsignale lässt sich die Sequenz direkt ablesen. Üblicherweise kann die Sequenz erst ab ca. 20 Basen hinter dem 3'-Ende des verwendeten Primers sauber ausgelesen werden, da die kleineren Fragmente in der Kapillarelektrophorese schlecht voneinander getrennt werden. Im Verlauf dieser Arbeit hat sich jedoch gezeigt, dass die Verwendung von ungewöhnlich großen Primern (17 Basen Primer Sequenz + 46 Basen sticky-end-Sequenz) in der Sequenzierung dazu führt, dass bereits zwei Basen nach dem 3'-Ende des Primers eine korrekte Identifizierung der Sequenz möglich wird.

2.7 Chemische Synthese von Oligonukleotiden

Biologische Systeme sind nicht zu einer *de novo* Synthese von DNA befähigt. Aus diesem Grund spielte die Optimierung der automatisierten Festphasensynthese von Oligonukleotiden eine entscheidende Rolle auf dem Weg zu neuen molekulargenetischen Methoden. Moderne Techniken, wie beispielsweise die PCR, wären ohne die Möglichkeit zur gezielten Erzeugung von Oligonukleotiden überhaupt nicht denkbar. Die Geschichte der Oligonukleotidsynthese beginnt Mitte der 50er Jahre mit den Arbeiten von H. G. Khorana et al. Die beiden grundlegenden Konzepte der von ihm entwickelten Phosphodiestermethode sind bis heute beibehalten worden [105, 106]. Khorana gelang es mit seiner Methode eine aktive tRNA mit 72 Basen zu synthetisieren, was zu seiner Zeit mit gutem Recht als präparative Meisterleistung bezeichnet werden konnte. Ende der 60er Jahre wurde von Letsinger die festkörperunterstützte Oligonukleotidsynthesen vorgestellt, die zur Entwicklung des ersten DNA-Synthesizers führte. Die praktische Durchführung der Phosphotriester- [107] und Phosphitriestermethode [108] war aber immer noch relativ anspruchsvoll. Erst die Einführung der heute als Standardmethode anerkannten Phosphoramiditchemie nach M. Caruthers [109, 110] ermöglichte eine effektive Kommerzialisierung.

Als Startpunkt für die Oligonukleotidsynthese dienen vollständig geschützte Nukleotide, deren 3'-OH-Gruppen über einen basenlabilen Linker mit dem Trägermaterial (in der Regel CPG: „controlled pore glass“) verknüpft sind (Abb. 22). Derartig funktionalisierte Trägermaterialien sind für jedes der vier Oligonukleotide, 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.

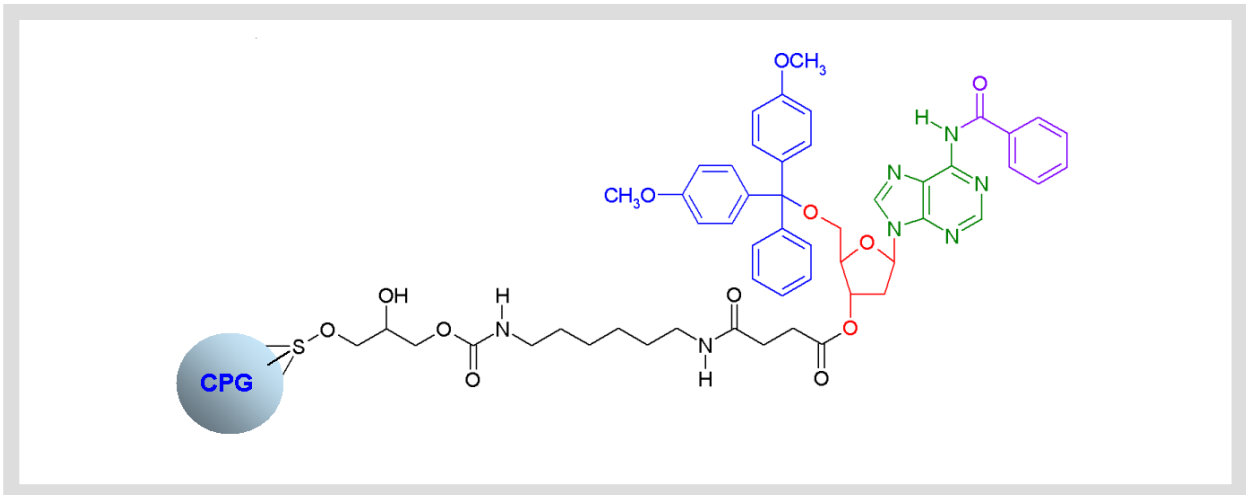


Abb. 22: Struktur eines typischen basenlabilen Linkers (schwarz), der das erste Nukleotid (rot und grün) über die 3'-OH-Gruppe mit dem Trägermaterial verknüpft. Die Dimethoxytritylschutzgruppe an der 5'-OH-Gruppe (blau) kann selektiv abgespalten werden, während die exozyklischen Aminogruppen der Nukleotide während der gesamten Synthese geschützt bleiben (Schutzgruppe in violett).

Der Syntheseyklus (Abb. 23) beginnt mit der Detritylierung der 5'-OH-Gruppe der trägergebundenen Base mit Di- bzw. Trichloressigsäure (2-3 Vol%) in Dichlormethan. Anschließend wird gründlich mit Acetonitril gewaschen, um sicher zu gehen, dass alle Säurereste vollständig entfernt werden. Die eigentliche Kopplungsreaktion erfolgt durch Aktivierung des 3'-Phosphoramidits mit Tetrazol und der Umsetzung der reaktiveren primären 5'-OH-Gruppe der trägergebundenen Komponente. Im Gegensatz zur Biosynthese von DNA erfolgt also die chemische Synthese vom 3'-Ende zum 5'-Ende der Sequenz. Im anschließenden Oxidationsschritt wird die neu gebildete Phosphitgruppe zum stabilen Phosphorsäuretriester umgesetzt. Die eigentliche Kopplungsreaktion verläuft mit einer Ausbeute von ca. 98-99 % („Schrittweise Kopplungsausbeute“). Die nicht umgesetzten 5'-OH-Gruppen werden im Capping-Schritt durch Acetylierung mit Acetanhydrid blockiert. Durch diesen Schritt wird verhindert, dass der Syntheseyklus 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.

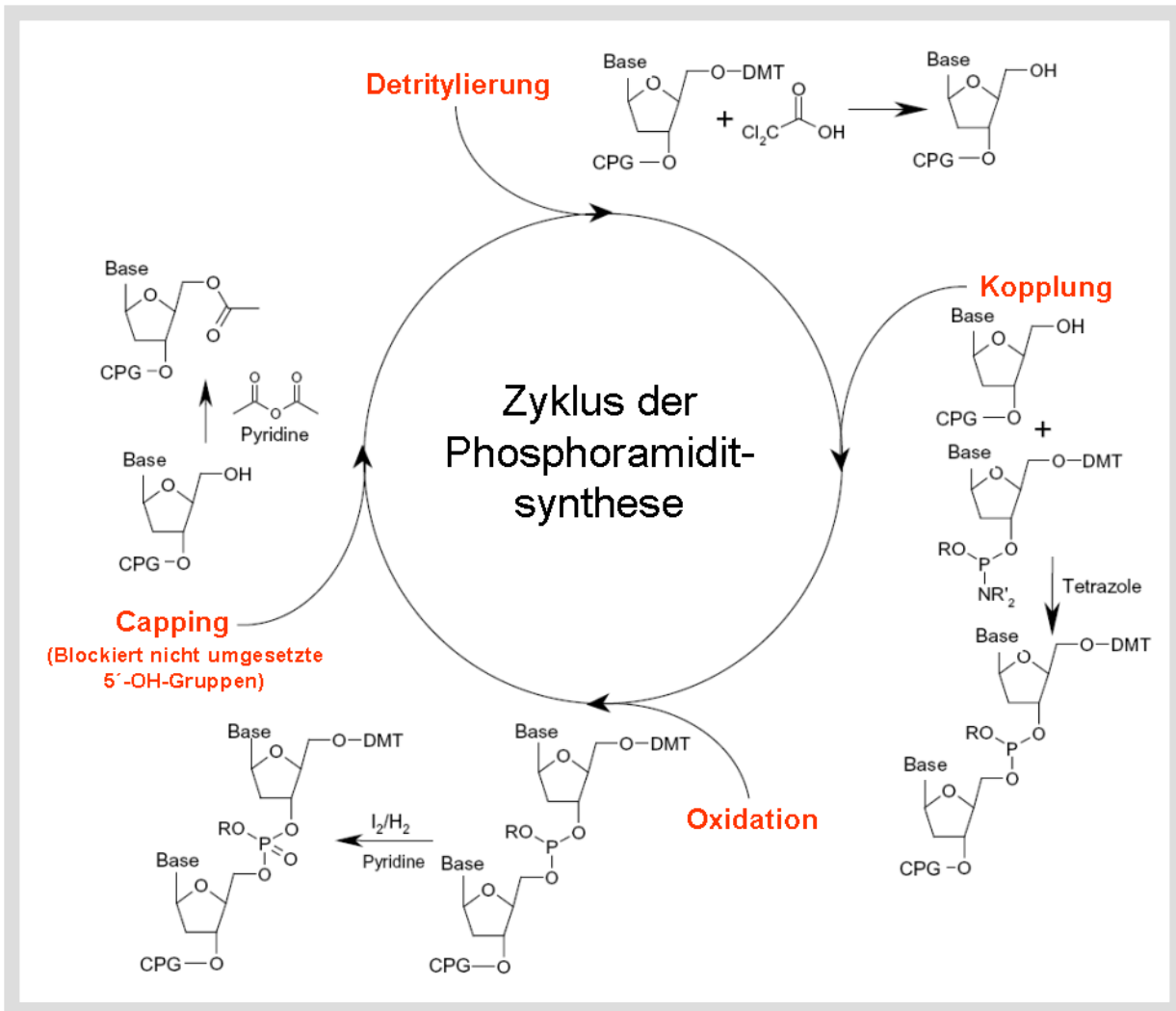


Abb. 23: Syntheseyklus von Oligonukleotiden nach Caruthers: Im ersten Schritt wird die 5'-OH-Gruppe des Trägergebundenen Nukleotids freigesetzt. Die Kopplung erfolgt durch die Umsetzung dieser primären OH-Gruppe mit der Phosphoramiditfunktion ($R = 2$ -Cyanoethyl, $R' =$ Isopropyl) des nächsten Nukleotids. Anschließend wird die neu gebildete Phosphitgruppe zum stabilen Phosphortriester oxidiert. Die OH-Gruppen die während der Kopplungsreaktion nicht abreagieren (ca. 1-1,5 mol%) werden durch Acetylierung mit Acetanhydrid blockiert, um die Bildung von Sequenzen mit falschen Basenabfolgen zu vermeiden.

Das beim Entschützen der 5'-OH-Gruppe gebildete Tritylkation kann sowohl photometrisch als auch durch Leitfähigkeitsmessungen relativ einfach quantifiziert werden. Geht man davon aus, dass die Detritylierung quantitativ erfolgt, kann aus einem Vergleich der Tritylwerte von zwei aufeinander folgenden Syntheseyklen die Ausbeute der Kopplungsreaktion bestimmt werden. Diese Tritylwerte werden üblicherweise als Kontrolldaten für die Güte einer individuellen Synthese herangezogen. Mit dem gezeigten Syntheseyklus können standardmäßig Oligonukleotide bis zu einer Länge von ca. 100-150 Basen erzeugt werden. Nach erfolgter Synthese wird das Trägermaterial mit konzentrierter Ammoniaklösung versetzt und für 1-8 h auf 50-80 °C erwärmt. Dadurch wird das Oligonukleotid vom Träger abgespalten und vollständig entschützt. Ein wichtiges Detail, das aus dem typischen 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 beispielsweise in Ligationsexperimenten eingesetzt werden sollen, ist es jedoch möglich den Syntheseweg so zu modifiziert, dass eine 5'-Phosphatgruppe am Ende der Sequenz erhalten wird.

Ein weiterer wichtiger Punkt bei der synthetischen Erzeugung von Oligonukleotiden ist die Auswirkung der schrittweisen Kopplungsausbeute auf das Ergebnis der Festphasensynthese. Da die eigentliche Kopplungsreaktion niemals perfekt quantitativ erfolgt, sondern in der Regel mit etwa 98-99 %, nimmt die Ausbeute an gebildeten Zielsequenzen 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. 24).

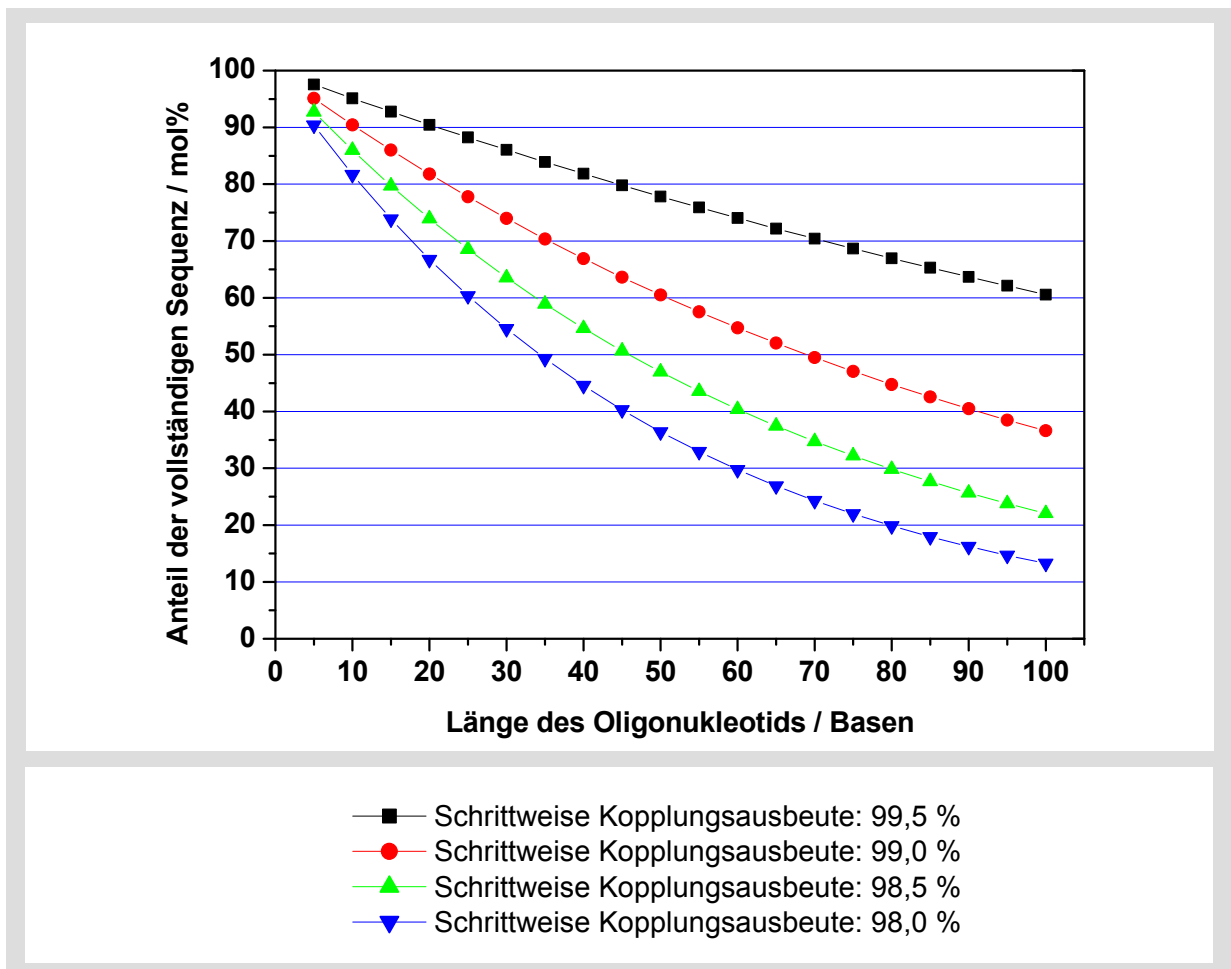


Abb. 24: Zusammenhang zwischen Schrittweiser Kopplungsausbeute, Länge des Oligonukleotids und der Gesamtausbeute an Zielsequenz. Selbst bei einer sehr guten Kopplungsausbeute von jeweils 99 % enthält ein Oligonukleotid von 70 Basen nur noch $0,99^{70} = 49\%$ der erwünschten Zielsequenz.

Die bei der Behandlung mit konzentrierter Ammoniaklösung abgespaltenen Schutzgruppen werden in der Regel in einem Schritt mit den Fehlsequenzen aus dem Syntheszyklus abgetrennt. Je nach Anwendungsgebiet der Oligonukleotide kommen hier unterschiedlich aufwändige Methoden in Frage. Standardmäßig wird eine „Trityl-On-HPLC-Reinigung“

durchgeführt. Dieses Verfahren beruht auf der Annahme, dass nach der Kopplung des letzten Nucleotidbausteins nur die vollständigen Zielsequenzen eine hydrophobe Tritylschutzgruppe tragen. Die so verstärkte Hydrophobie der Zielsequenzen ermöglicht eine Abtrennung der Fehlsequenzen über Reversed-Phase-HPLC. Für gängige Anwendungen von Oligonukleotiden, wie z. B. für Sequenzierungsprimer oder für die Microarray-Technologie ist diese Methode völlig ausreichend. 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 Syntheszyklus in die Sequenzen integriert werden können.

2.8 Sequenzdesign

In einem gewissen Molmassenbereich kann man mit Hilfe der chemische Synthese von Oligonukleotiden jede beliebige Basenabfolge erzeugen. Wenn solche Sequenzen zu einer gezielten supramolekularen Strukturbildung genutzt werden sollen, müssen sie jedoch verschiedene Kriterien erfüllen. Das grundlegende Prinzip bei der Verwendung von DNA als selbstorganisierendem Element ist die Kontrolle der Sekundärstrukturbildung durch das gezielte Design geeigneter Nucleotidsequenzen. 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. 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. Somit stehen 64 (trimere), 256 (tetramere), 1024 (pentamere) bzw. 4096 (hexamere) unterschiedliche Abschnitte zur Verfügung. Die Länge der verwendeten Segmente muss an die Gesamtgröße der Struktur angepasst werden. Die in Abb. 25 gezeigte Struktur besteht beispielsweise aus 4 verschiedenen Sequenzen mit jeweils 16 Basen. Jedes der vier Oligonukleotide ist aus 13 überlappenden tetrameren Sequenzabschnitten aufgebaut. Jedes der 52 verwendeten Tetramere ist nur einmal in der gesamten Struktur enthalten.

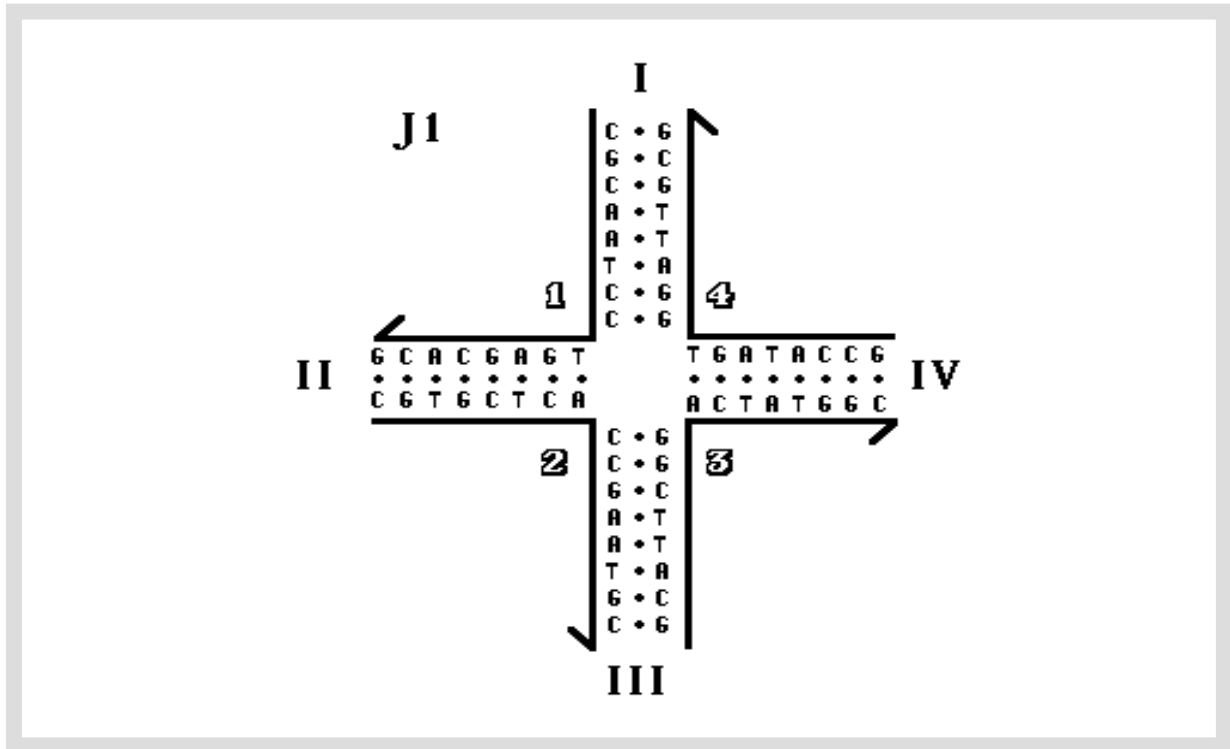


Abb. 25: Prinzip der Symmetrieminimierung am Beispiel der Kreuzstruktur J1: Die einzelnen Stränge sind mit arabischen Zahlen gekennzeichnet, während die verschiedenen Arme römische Zahlen tragen. Die Struktur besteht aus 4 Strängen mit jeweils 16 Basen die durch Watson-Crick Basenpaarung vier Arme aus jeweils 8 bp bilden. Jede der überlappenden Untersequenzen aus vier Basen tritt nur einmal in der gesamten Struktur auf. Die Sequenzen im Bereich der Verzweigung sind außerdem so gewählt, dass keine branch point migration auftreten kann [111].

Bereits bei dieser relativ kleinen DNA Struktur wäre es extrem schwierig, wenn nicht sogar unmöglich, 56 der insgesamt 64 denkbaren trimeren Sequenzen zur erwünschten Struktur aneinanderzureihen. Es gibt verschiedene Computeranwendungen die solche Symmetrieminimierungen unterstützen. Bei relativ kurzen linearen Sequenzen, wie sie beispielsweise in DNA Arrays eingesetzt werden, ist ein vollautomatisches Sequenzdesign möglich [112]. Die Rechenzeit nimmt allerdings bei diesen Anwendungen exponentiell mit der Sequenzlänge zu. In einigen Fällen ist es außerdem wünschenswert, gewisse Sequenzmotive wie zum Beispiel Verzweigungsstellen oder Erkennungssequenzen von Enzymen manuell in die Struktur einfügen zu können. Interaktive Programme [111] sind weniger strikt, d.h. Übereinstimmungen zwischen manuell eingefügten Abschnitten und halbautomatisch erzeugten Sequenzen werden toleriert aber angezeigt. Dadurch kann der Benutzer viel direkter in das Design der Sequenz eingreifen und neben Sequenzwiederholungen auch noch andere unerwünschte Motive ausschließen. Abfolgen von drei oder mehr Guanin Einheiten (Bildung von Quatruplex DNA [113-115]) sollten ebenso vermieden werden wie das Auftreten von Polypurin- bzw. Polypyrimidinsegmenten mit mehr als 4-5 Basen (Krümmung der Helixachse [116] und Bildung von Triplex DNA [117, 118]). Zur Erzeugung von stabilen Verzweigungsstellen darf natürlich keine Sequenzsymmetrie auftreten, die eine Isomerisierung im Sinne der „branch point migration“ zulässt. Zusätzlich sollte die Struktur keine linearen

Abschnitte enthalten, die zu den gekrümmten Sequenzen im Bereich der Verzweigungsstelle komplementär sind. Bei der Verknüpfung von mehreren Verzweigungspunkten innerhalb einer Struktur muss außerdem berücksichtigt werden, dass die relative Orientierung der einzelnen Arme durch die helikale Struktur der DNA mit dem Abstand zwischen den Kreuzungspunkten verknüpft ist. Nach dem Design einer Sequenzen, die zur Bildung einer erwünschten Struktur führen soll, bietet das verwendete Programm [111] die Möglichkeit, alle enthaltenen Stränge untereinander und mit sich selbst auf Fehlpaarungen zu untersuchen. Dadurch können unerwünschte komplementäre Basenabfolgen zwischen den von Hand 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.

2.9 Konzentrationsbestimmung

Neben dem richtigen Design der verwendeten Sequenzen ist die erfolgreiche Strukturbildung natürlich auch von der Stöchiometrie der verwendeten Komponenten abhängig. Beim Arbeiten mit DNA sind die zugänglichen Substanzmengen in fast allen Fällen so gering, dass eine gravimetrische Konzentrationsbestimmung nicht möglich ist. Die gängigste Methode zur Bestimmung der Konzentration von DNA-Lösungen ist die Messung der UV-Absorption* bei 260 nm. In vielen Fällen werden DNA Mengen sogar direkt in OD (Optischen Dichten) angegeben. Definitionsgemäß entspricht 1 OD der Menge an DNA, die in einem Volumen von einem Milliliter und einer Schichtdicke von einem Zentimeter, bei 260 nm zu einer UV-Absorption von eins führt.

Wenn der Extinktionskoeffizient ϵ einer Verbindung bekannt ist, lässt sich mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes aus einer UV-Absorptionsmessung die Konzentration der Probenlösung bestimmen.

* Genau genommen wird in der UV-Spektroskopie nicht die Absorption, sondern die Extinktion der Lösung gemessen. Die Extinktion entspricht dem negativ dekadischen Logarithmus des Transmissionsgrades. Die Transmission hängt genau genommen nicht nur von absorptiven, sondern auch von reflektiven und dissipativen Effekten ab. Da die beiden letzten Effekte bei sachgemäßer Durchführung der UV-Messung vernachlässigbar sein sollten, werden die Begriffe der Absorption und Extinktion im Rahmen der UV-Spektroskopie üblicherweise synonym verwendet.

$$[\text{Gl. 1}] \quad A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

A: Absorption

I_0 : Intensität des eingestrahnten Lichts

I: Intensität des transmittierten Lichts

ε : dekadischer molarer Extinktionskoeffizient in $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$

c: Konzentration in mol/L

d: Schichtdicke der Probenlösung in cm

Im Fall der Konzentrationsbestimmung von DNA ist dieser Zusammenhang jedoch nicht trivial, da zwei spezielle Effekte berücksichtigt werden müssen: Bei der Denaturierung von doppelsträngiger DNA werden nicht nur die Wasserstoffbrücken zwischen den beiden komplementären Strängen gelöst, sondern auch die Basenstapelung, d.h. die Wechselwirkungen zwischen den π -Elektronensystemen benachbarter Basen innerhalb eines Stranges werden weitgehend zerstört. Basen die nicht mehr an π - π -Wechselwirkungen beteiligt sind, zeigen eine verstärkte UV-Absorption. Aus diesem Grund ist die Denaturierung einer doppelsträngigen DNA von einem hyperchromen Effekt begleitet, d.h. die UV-Absorption der Probe nimmt im Verlauf der Denaturierung zu. Dieser Effekt bildet die Grundlage zur spektroskopischen Untersuchung des Schmelzverhaltens von DNA. Bei der Untersuchung von Einzelstrang-DNA besteht das Problem, dass die beiden Purinbasen deutlich höhere Extinktionskoeffizienten aufweisen als die beiden Pyrimidinbasen. Der Zusammenhang zwischen Absorption und Konzentration ist daher genaugenommen für jede Nukleotidsequenz unterschiedlich. In erster Näherung kann der Extinktionskoeffizient einer gegebenen ssDNA aus der Summe der Extinktionskoeffizienten der einzelnen Basen berechnet werden.

$$[\text{Gl. 2}] \quad \varepsilon_{ssDNA} \approx n_A \cdot \varepsilon_{dAMP} + n_G \cdot \varepsilon_{dGMP} + n_C \cdot \varepsilon_{dCMP} + n_T \cdot \varepsilon_{dTMP}$$

ε_{ssDNA} : Extinktionskoeffizient des Oligonukleotids

ε_{dNMP} : Extinktionskoeffizienten der isolierten Desoxynukleotidmonophosphate

n_N : Anzahl der verschiedenen Nukleotide im untersuchten Oligonukleotid

Diese Näherung vernachlässigt jedoch sämtliche Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Basen, d.h. der Wert von ε_{ssDNA} entspricht genaugenommen dem Extinktionskoeffizient einer idealen Mischung der monomeren Desoxynukleotidmonophosphate. Es ist aber seit langem

bekannt, das ein Dinukleotid eine geringere UV-Absorption zeigt, als eine äquivalente Mischung der entsprechenden Basen. Eigentlich ist es erstaunlich, dass diese Näherung immer wieder beschrieben wird, da die seit langem anerkannten Verfahren zur Bestimmung der Extinktionskoeffizienten von Oligonukleotiden [119, 120] teilweise genau diesen Zusammenhang in physikalisch korrekter Form verwendet. Bei diesen Verfahren wird die Absorption einer Lösung eines Oligonukleotids mit bekannter Sequenz gemessen. Anschließend erfolgt eine vollständige Hydrolyse mittels enzymatischer oder chemischer Methoden. Die UV-Absorption dieser Lösung entspricht der Summe der Einzelbeiträge der verschiedenen Basen, so dass eine exakte Konzentrationsbestimmung möglich ist. Aus dem Vergleich der beiden Absorptionsmessungen kann daher der Extinktionskoeffizient des intakten Oligonukleotids berechnet werden:

Für die Absorption des intakten Oligos A_{ssDNA} gilt:

$$[\text{Gl. 3}] \quad A_{ssDNA} = \varepsilon_{ssDNA} \cdot c_{ssDNA} \cdot d$$

c_{ssDNA} : Konzentration des Oligonukleotids

Die Absorption der Mischung ist durch die Konzentrationen und die Extinktionskoeffizienten der einzelnen dNMPs gegeben:

$$[\text{Gl. 4}] \quad A_{\text{Mischung}} = d \cdot (\varepsilon_{dAMP} \cdot c_{dAMP} + \varepsilon_{dCMP} \cdot c_{dCMP} + \varepsilon_{dGMP} \cdot c_{dGMP} + \varepsilon_{dTMP} \cdot c_{dTMP})$$

A_{Mischung} : Absorption der Probenlösung nach vollständiger Hydrolyse des Oligonukleotids.

c_{dNMP} : Einzelkonzentrationen der verschiedenen dNMPs

ε_{dNMP} : Extinktionskoeffizienten der isolierten dNMPs

Die Einzelkonzentrationen der verschiedenen Basen c_{dNMP} sind durch die Zusammensetzung der Sequenz mit der Ausgangskonzentration des Oligonukleotids verknüpft:

$$[\text{Gl. 5}] \quad c_{dNMP} = n_N \cdot c_{ssDNA}$$

Durch Einsetzen von [Gl. 3] in [Gl. 4] und Umformen nach ε_{ssDNA} erhält man mit [Gl. 5]:

$$[\text{Gl. 6}] \quad \varepsilon_{ssDNA} = \left(\frac{A_{ssDNA}}{A_{\text{Mischung}}} \right) \cdot (n_A \cdot \varepsilon_{dAMP} + n_G \cdot \varepsilon_{dGMP} + n_C \cdot \varepsilon_{dCMP} + n_T \cdot \varepsilon_{dTMP})$$

Die Absorption der Probenlösung vor und nach der Hydrolyse (A_{ssDNA} bzw. $A_{Mischung}$) kann problemlos gemessen werden, n_A , n_G , n_C und n_T sind durch die Sequenz des Oligonukleotids bekannt und auch die Extinktionskoeffizienten der einzelnen dNTPs können exakt bestimmt werden. Diese Methode liefert also eine physikalisch korrekte Vorgehensweise, die keine theoretischen Annahmen bezüglich der vielfältigen Zusammenhänge zwischen den auftretenden Wechselwirkungen innerhalb des Oligonukleotids und der individuellen Sequenz erfordert. Außerdem sollte dieses Vorgehen prinzipiell auch für doppelsträngige DNA einsetzbar sein.

Einen Ansatz zur Berechnung des Extinktionskoeffizienten von Oligonukleotiden, der zumindest die Wechselwirkungen innerhalb der verschiedenen Dinukleotide berücksichtigt, 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. Da jede Base, außer der ersten und letzten, an jeweils zwei Dinukleotiden beteiligt ist, muss die Summe durch die entsprechenden Werte der Einzelbasen korrigiert werden:

$$[\text{Gl. 7}] \quad \epsilon_{ssDNA} \approx \left(\sum_1^{N-1} \epsilon_{\text{Nearest-Neighbour}} \right) - \sum_2^{N-1} \epsilon_{dNTP}$$

$\epsilon_{\text{Nearest-Neighbour}}$: Nearest-Neighbour Werte für die Extinktionskoeffizienten bei 260 nm für die verschiedenen Dinukleotide.

ϵ_{dNTP} : Extinktionskoeffizienten der einzelnen Basen.

N: Anzahl der im Oligonukleotid enthaltenen Basen.

Nearest-Neighbour Werte für die Extinktionskoeffizienten bei 260 nm in $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ [121-123]:

$5' \rightarrow 3'$	dA	dC	dG	dT
dA	27400	21200	25000	22800
dC	21200	14600	18000	15200
dG	25200	17600	21600	20000
dT	23400	16200	19000	16800

Extinktionskoeffizienten der einzelnen Basen bei 260 nm in $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ [121-123]:

dA: 15400 / dC: 7400 / dG: 11500 / dT: 8700

Wenn dieses Verfahren zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von doppelsträngiger DNA eingesetzt werden soll, muss eine zusätzliche Korrektur vorgenommen werden, um die Wechselwirkungen zwischen den beiden komplementären Strängen zu berücksichtigen [124]:

$$[\text{Gl. 8}] \quad \epsilon_{dsDNA} = (1 - h_{260nm}) \cdot (\epsilon_{ssDNA1} + \epsilon_{ssDNA2})$$

ϵ_{dsDNA} : Extinktionskoeffizient des Doppelstrangs

ϵ_{ssDNA1} bzw. ϵ_{ssDNA2} : Extinktionskoeffizienten der beiden Einzelstränge

$$h_{260nm} = 0,287 f_{AT} + 0,059 f_{GC}$$

f_{AT} bzw. f_{GC} : Anteil der A•T bzw. G•C Basenpaare

In vielen Fällen werden jedoch einfache Faustregeln für die Konzentrationsbestimmung von DNA verwendet. Die Idee ist hierbei, dass die Extinktionskoeffizienten von DNA-Sequenzen mit statistischer Basenfolge bei ausreichender Länge nicht mehr von der individuellen Sequenz abhängen. Unter dieser Annahme können für die verschiedenen DNA-Formen Konzentrationswerte angegeben werden, die bei einer Schichtdicke von einem Zentimeter zu einer Absorption von eins führen. Über die genauen Zahlenwerte sind sich die verschiedenen Literaturstellen jedoch nicht ganz einig. Für dsDNA findet man in der Regel 47 bzw. 50 $\mu\text{g/ml}$ und für Einzelstrang-DNA 30-38 $\mu\text{g/ml}$. In einigen Fällen wird zwischen ssDNA (37 $\mu\text{g/ml}$) und Oligonukleotiden (30 $\mu\text{g/ml}$) unterschieden [125]. Theoretisch erscheint diese Unterscheidung sinnvoll, da in langen Einzelsträngen mit zunehmender Länge immer mehr Wechselwirkungen zu erwarten sind. Eine Abgrenzung, ab welcher Länge Oligonukleotide in Einzelstrang-DNA übergehen wird jedoch nicht angegeben.

Ein guter Vergleich zwischen den experimentell bestimmten Werten und den verschiedenen theoretischen Modellen ist in der Veröffentlichung von M. J. Cavaluzzi und P. N. Borer zu finden [126]. In dieser Arbeit wurden die experimentellen Ergebnisse von 18 verschiedenen Oligonukleotiden, mit einer Länge von 9-24 Basen, mit den theoretischen Werten verglichen. Von diesen 18 Oligos zeigen 10 eine mehr oder weniger zufällige Basenabfolge. Die anderen 8 Sequenzen sind Homopolymere bzw. Einzelstränge mit alternierenden Anordnungen von zwei verschiedenen Basen. Die zufällig aufgebauten Sequenzen lassen sich noch verhältnismäßig gut durch die theoretischen Modelle beschreiben. Erstaunlicherweise liefert hier das Nearest-Neighbour Verfahren annähernd identische Werte, wie die Abschätzung anhand der Faustregel mit 33 $\mu\text{g/ml}$. Beide Werte liegen etwa 15 % zu hoch. Diese

Abweichung wird von den Autoren durch die Verwendung von fehlerhaften Literaturwerten für die Extinktionskoeffizienten der Einzelbasen erklärt. Die oben beschriebene Summation der Extinktionskoeffizienten der einzelnen Basen liefert deutlich schlechtere Werte. Hier liegen die Abweichungen im Bereich von etwa 15-30 %. Bemerkenswerterweise ist im Falle von homopolymeren und alternierenden Sequenzen keines der theoretischen Modelle in der Lage vernünftige Vorhersagen zu liefern. Teilweise treten Abweichungen von bis zu 50 % auf. Demnach bietet das Nearest-Neighbour Verfahren keine echten Vorteile im Vergleich zu den einfachen Faustregeln, da beide Verfahren auf einen weitgehend statistischen Aufbau der Sequenzen angewiesen sind. Aus den veröffentlichten Werten kann aber noch nicht abgeleitet werden, unter welchen Voraussetzungen eine Sequenz als zufällig bezeichnet werden kann, und ob die Grenze zwischen zufälligen und geordneten Sequenzen für beide Verfahren identisch sind. Die Empfehlung der Autoren beschränkt sich darauf, für Sequenzen mit einem GC-Gehalt von 40-80 % den Schätzwert von 38 $\mu\text{g/ml}$ zu verwenden. Mit diesem Schätzwert liegen die Abweichungen zwischen experimenteller Bestimmung und den theoretischen Berechnungen für die 10 zufälligen Oligonukleotidsequenzen im Bereich von -2 bis 3 %.

Neben der UV-Absorption stehen auch noch andere Methoden, wie z.B. die Verwendung von speziellen Fluoreszenzfarbstoffen (Ethidiumbromid, PicoGreen, u.ä.) oder die Umsetzung mit Diphenylamin [127] zur Bestimmung der DNA-Konzentration zur Verfügung. Es ist aber fraglich, ob mit diesen Methoden eine exaktere Konzentrationsbestimmung möglich ist. Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit wurden DNA Konzentrationen ausschließlich mittels UV-Spektroskopie, mit den Schätzwerten von 37 $\mu\text{g/ml}$ für Einzelstränge und 47 $\mu\text{g/ml}$ für Doppelstränge, durchgeführt.

3 Ergebnisse und Diskussion

Wie in der Zielsetzung vorgestellt, wurden im Rahmen dieser Arbeit flexible und semiflexible molekulare Bausteine entwickelt, die durch Selbstorganisation von Oligonukleotiden zu diskreten nicht periodischen Strukturen verknüpft werden sollen. Die flexiblen Bausteine werden durch die „Funktionalisierung“ eines synthetischen Polymerblocks mit zwei unterschiedlichen Oligonukleotiden dargestellt. Semiflexible Einheiten können durch die Erzeugung von dsDNA-Fragmenten mit langen überstehenden Enden 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 Triblockcopolymeren und die verschiedenen Möglichkeiten zur Erzeugung von dsDNA-Fragmenten mit langen überstehenden Enden vorgestellt. In beiden Fällen soll die Synthese eine ausreichende Menge an Produkt liefern, die eine Untersuchung der supramolekularen Strukturen mit gängigen physikochemischen Methoden erlaubt. Neben den Synthesen werden die Ergebnisse der Versuche zur Bildung von linearen und verzweigten Strukturen auf der Grundlage dieser Bausteine diskutiert.

3.1 Biosynthetische Blockcopolymere

Es gibt im Wesentlichen drei verschiedene Techniken, die zur Herstellung von Blockcopolymeren geeignet sind [128]:

1. Blockbildende Copolymerisation

Diese Technik beruht auf einer ionischen Polymerisation, die in einer Mischung verschiedener Monomere durchgeführt wird. In Abhängigkeit von den Copolymerisationsparametern* werden unterschiedliche Strukturen gebildet. Aus binären Mischungen von Monomeren mit $r_a \ll 1$ und $r_b \gg 1$ erhält man Diblockcopolymere. Die Abgrenzung zwischen den beiden Blöcken ist aber nicht perfekt, so dass geringe Anteile des einen Monomers im Block des anderen Monomers enthalten sind.

* Die Copolymerisationsparameter geben das Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten von Homo- und Kreuzwachstum an: $r_a = k_{aA} / k_{aB}$ bzw. $r_b = k_{bB} / k_{bA}$.

2. Blockpolymerisation

In der Blockpolymerisation wird mit Hilfe von lebenden Polymerisationstechniken zunächst das eine Monomer vollständig umgesetzt, bevor das zweite Monomer zugegeben wird. Das lebende Kettenende des ersten Blocks startet die Polymerisation des zweiten Monomers. Dadurch ist die Reihenfolge der Blöcke durch die unterschiedlichen Polaritäten der Kettenenden vorgegeben. (Anders als bei radikalischen Copolymerisationen spielt die Resonanzstabilisierung bei ionischen Reaktionsmechanismen nur eine untergeordnete Rolle.) Dieser Methode liefert eine deutlich bessere Kontrolle über die Blocklängen und eine saubere Grenze zwischen verschiedenen Blöcken.

3. Blockkopplung

Die dritte Methode beruht auf der Kopplung von separat hergestellten Polymerblöcken. Da diese Kopplung eine polymeranaloge Reaktion darstellt, sind die Umsätze in der Regel nicht quantitativ und die Abtrennung von nicht gekoppelten Homopolymeren kann in vielen Fällen ein Problem darstellen. Da die einzelnen Blöcke getrennt hergestellt werden ist eine gute Kontrolle der Blocklängen möglich, die verwendeten Techniken müssen jedoch eine Funktionalisierung der Polymerenden zulassen. Die Reihenfolge der verschiedenen Polymere ist bei diesem Ansatz frei wählbar.

Da Oligonukleotide nicht durch Polymerisation sondern durch wiederholte Kopplungsreaktionen in der Festphasensynthese hergestellt werden, ist die Blockkopplung der naheliegendste Weg zur Synthese von biosynthetischen Blockcopolymeren. Ein Polymer für die Optimierung der Versuchsbedingungen der Kopplungsreaktion mit Oligonukleotiden sollte verschiedene Kriterien erfüllen:

- Die Synthese des Polymers muss eine Funktionalisierung der beiden Enden erlauben und sollte eine möglichst enge Molmassenverteilung liefern.
- Da die meisten Polymere auf Kohlenwasserstoffverbindungen beruhen, sind sie in der Regel nicht wasserlöslich. 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.

Ein Polymer, das diese Voraussetzungen erfüllt, ist das Polyethylenoxid (PEO). Je nach Definition des zugrundeliegenden Monomers wird PEO auch als Polyethylenglycol (PEG) bzw. als Polyoxyethylen (POE) bezeichnet. Polyethylenoxid kann durch ringöffnende anionische Polymerisation von Ethylenoxid erzeugt werden. Diese Methode liefert enge

Molmassenverteilungen und ermöglicht eine gezielte Funktionalisierung der beiden Kettenenden. Im Bereich relativ kleiner Molmassen sind monodisperse Polyethylenoxide durch repetitive Kopplung zugänglich [129]. Aufgrund seiner chemischen Struktur ist PEO sowohl in polaren als auch in unpolaren Medien löslich.

3.1.1 Kopplung von Oligonukleotiden mit Polyethylenoxid

Der Schlüsselpunkt bei der gezielten Verknüpfung eines synthetischen Polymers mit zwei unterschiedlichen Oligonukleotidsequenzen ist die Adressierbarkeit der beiden Polymerenden. Diese kann entweder durch eine heterogene Funktionalisierung des Polymers oder durch geeignete Schutzgruppenchemie erreicht werden. Infolge der chemischen Struktur der zugrundeliegenden Monomereinheit tragen Polyethylenoxide typischerweise Hydroxyl- bzw. Methoxyl-Endgruppen. Umsetzungen von Hydroxyfunktionen erfordern aufgrund der geringen Nucleophilie relativ drastische Reaktionsbedingungen. Diese würden zu Nebenreaktionen bzw. zur Zerstörung des DNA-Blocks führen. Eine mögliche Alternative ist die Verwendung von Aminogruppen, die unter deutlich mildereren Bedingungen umgesetzt werden können. Die Verknüpfung der beiden Blöcke muss außerdem zu einer chemischen Bindung führen, die während der Aufarbeitung und der Kopplung des zweiten DNA-Blocks stabil und inert bleibt. Eine naheliegende Möglichkeit ist die Umsetzung von aktivierten Säuregruppen zum entsprechenden Amid. Die Aktivierung von Säuregruppen erfolgt typischerweise über Carbodiimide, Carbonyldiimidazol oder N-Hydroxysuccinimid.

Oligonukleotide können in der Festphasensynthese über Standard-Phosphoramiditchemie am 5'-Ende mit einem N-Hydroxysuccinimidester funktionalisiert werden [130]. Die Umsetzung mit der Aminokomponente muss in diesem Fall am trägergebundenen Oligonukleotid durchgeführt werden, da das Abspalten des Oligos mit konzentrierter Ammoniaklösung zur Ammonolyse der aktivierten Säurefunktion führen würde. Dieser Syntheseansatz hat den großen Vorteil, dass nicht umgesetzte Reaktanden durch einfaches Waschen des Trägermaterials abgetrennt werden können. Das typische Problem der Abtrennung von Homopolymeren aus der Reaktionslösung bei Blockkopplungsreaktionen kann somit weitgehend gelöst werden. Die Anwendung dieser Herangehensweise auf die Herstellung von asymmetrischen DNA¹-PEO-DNA² Triblockcopolymeren führt zu folgendem Syntheseweg:

Im ersten Schritt wird ein einseitig geschütztes α,ω -Diaminopolyethylenoxid an die aktivierte Säurefunktion am 5'-Ende des trägergebundenen Oligonukleotids gekoppelt. Nicht umgesetzte Polymere bleiben in Lösung und können durch Waschen des Trägermaterials vom Kopplungsprodukt abgetrennt werden. Durch Erwärmen in konzentrierter Ammoniaklösung

bricht die Bindung zwischen DNA und Trägermaterial und die DNA wird vollständig entschützt. Bei geeigneter Wahl der Schutzgruppe am Polyethylenoxid kann in diesem Schritt gleichzeitig die zweite terminale Aminogruppe am PEO freigesetzt werden. Dadurch erhält man eine Mischung der nicht umgesetzten Oligonukleotide mit den aminofunktionalisierten Diblockcopolymeren (Abb. 27). Die Schutzgruppen lassen sich über Gelfiltration aus der Lösung entfernen. Im nächsten Syntheseschritt können nur die Zweiblockpolymere mit dem Succinimidylester des zweiten Oligos reagieren. Nicht umgesetzte Oligonukleotide aus der ersten Kopplung tragen nicht die notwendige reaktive Gruppe. Durch erneutes Waschen des Trägermaterials werden die nicht umgesetzten Diblockcopolymere und die Oligonukleotide aus der ersten Kopplungsreaktion entfernt. Die anschließende Behandlung mit Ammoniaklösung führt deshalb zu einer Mischung des Dreiblockpolymeren mit der Oligonukleotidsequenz aus dem zweiten Kopplungsschritt.

3.1.2 Einseitig geschütztes α,ω -Diaminopolyethylenoxid

Zur Realisierung des beschriebenen Syntheseweges muss zunächst ein geeignetes einseitig geschütztes α,ω -Diaminopolyethylenoxid hergestellt werden. Die ersten Versuche wurden mit einer kommerziell erhältlichen monodispersen Verbindung durchgeführt (Abb. 26).

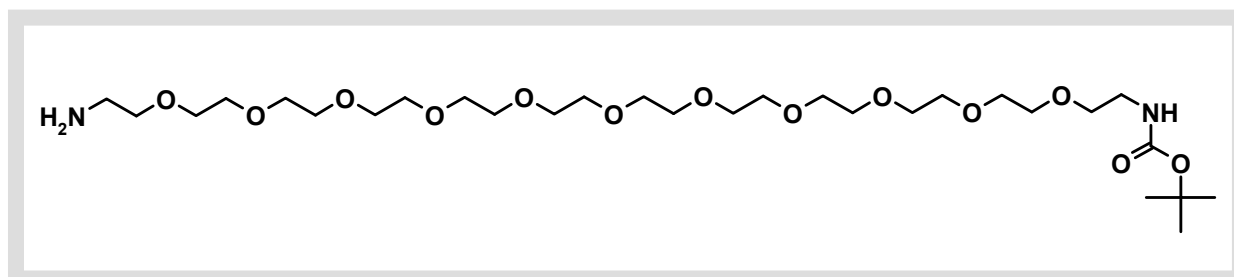


Abb. 26: Struktur von O-(2-Aminoethyl)-O'-[2-(Boc-amino)ethyl]decaethylglycol (Fluka)

Die Verwendung einer monodispersen Verbindung sollte die Interpretation von analytischen Methoden, wie z.B. MALDI-TOF MS, HPLC oder GPC deutlich erleichtern. Mögliche Nebenreaktionen sind einfacher zu detektieren. Die Schutzgruppe des Amins (*tert*-Butyloxycarbonyl: „Boc“) ist eine säurelabile Schutzgruppe. DNA ist jedoch gegen stark saure Bedingungen nicht stabil. Bei der Verwendung einer basenlabilen Schutzgruppe ist es außerdem möglich diese in einem Schritt mit den Schutzgruppen der DNA zu spalten. Hier kommt beispielsweise die Trifluoracetatschutzgruppe (Tfa) in Frage. Damit die asymmetrische Funktionalisierung der in Abb. 26 dargestellten Verbindung beim Austausch der Schutzgruppen erhalten bleibt, muss eine Schutzgruppeninversion durchgeführt werden.

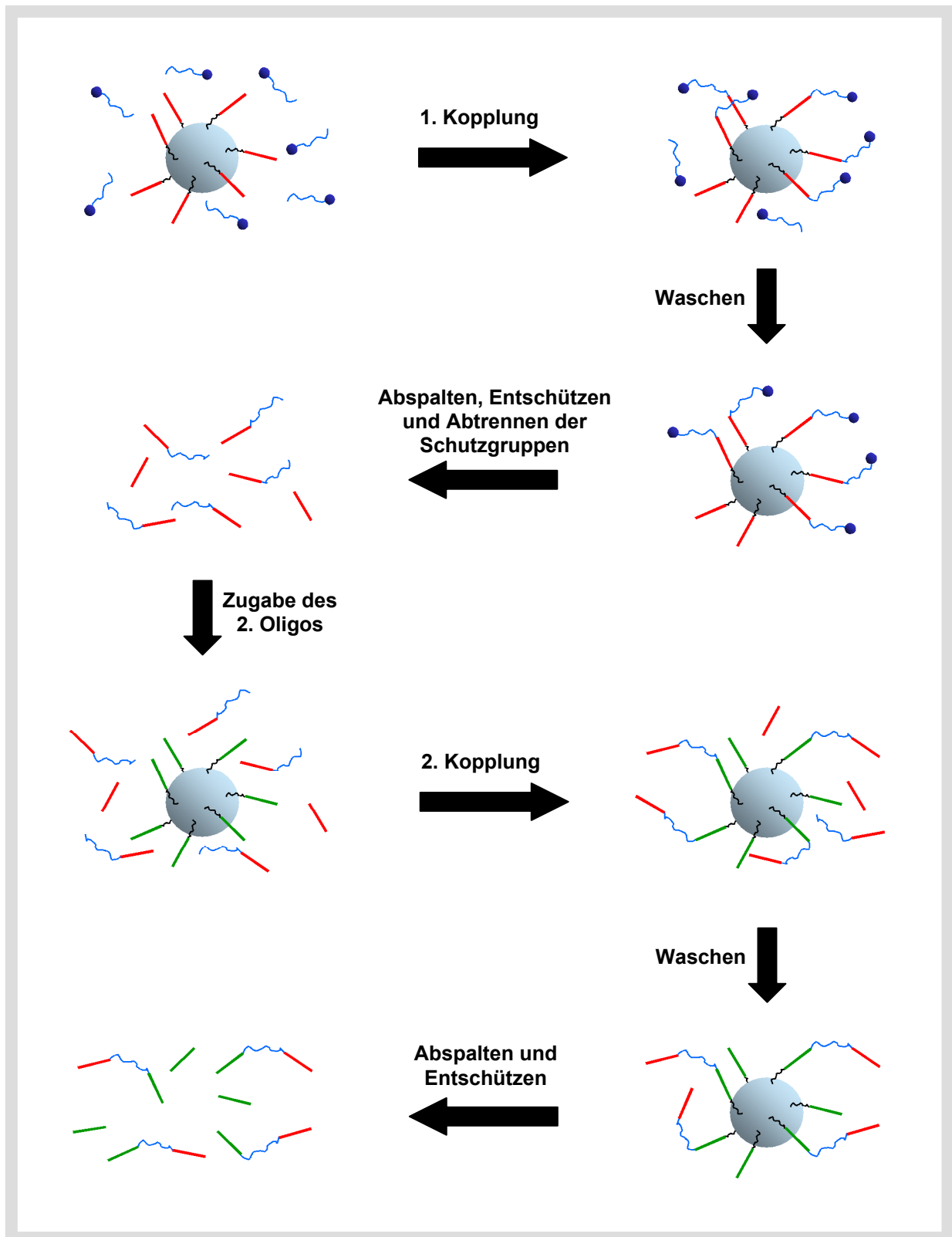


Abb. 27: Schematische Darstellung des Synthesewegs zu asymmetrischen DNA¹-PEO-DNA² Triblockcopolymeren: Das einseitig geschützte α,ω -Diaminopolyethylenoxid ($\sim\bullet$) wird auf das trägergebundene 5'-funktionalisierte Oligonukleotid ($\sim\rightarrow$) gekoppelt. Nicht umgesetzte Polymere bleiben in Lösung und können durch Waschen des Trägermaterials abgetrennt werden. Durch konzentrierte Ammoniaklösung wird das Oligo vom Träger abgespalten und vollständig entschützt. Gleichzeitig wird die Schutzgruppe der zweiten Aminogruppe des PEOs (\bullet) abgespalten. Im nächsten Schritt kann nur das DNA¹-PEO-NH₂ Diblockcopolymer ($\sim\rightarrow\bullet$) mit der trägergebundenen DNA reagieren. Durch erneutes Waschen des Trägers und Behandlung mit Ammoniaklösung wird eine Mischung des Triblockpolymeren mit der reinen DNA-Sequenz des zweiten Oligonukleotids erhalten.

Bei diesem Vorgehen wird zunächst die freie Aminogruppe mit Trifluoacetat geschützt. Anschließend kann die Boc-Gruppe selektiv vom doppeltgeschützten Produkt abgespalten werden (Abb. 28). Die Einführung der Tfa-Gruppe muss möglichst quantitativ erfolgen, da sonst im nächsten Schritt ungeschützte Diaminverbindungen entstehen.

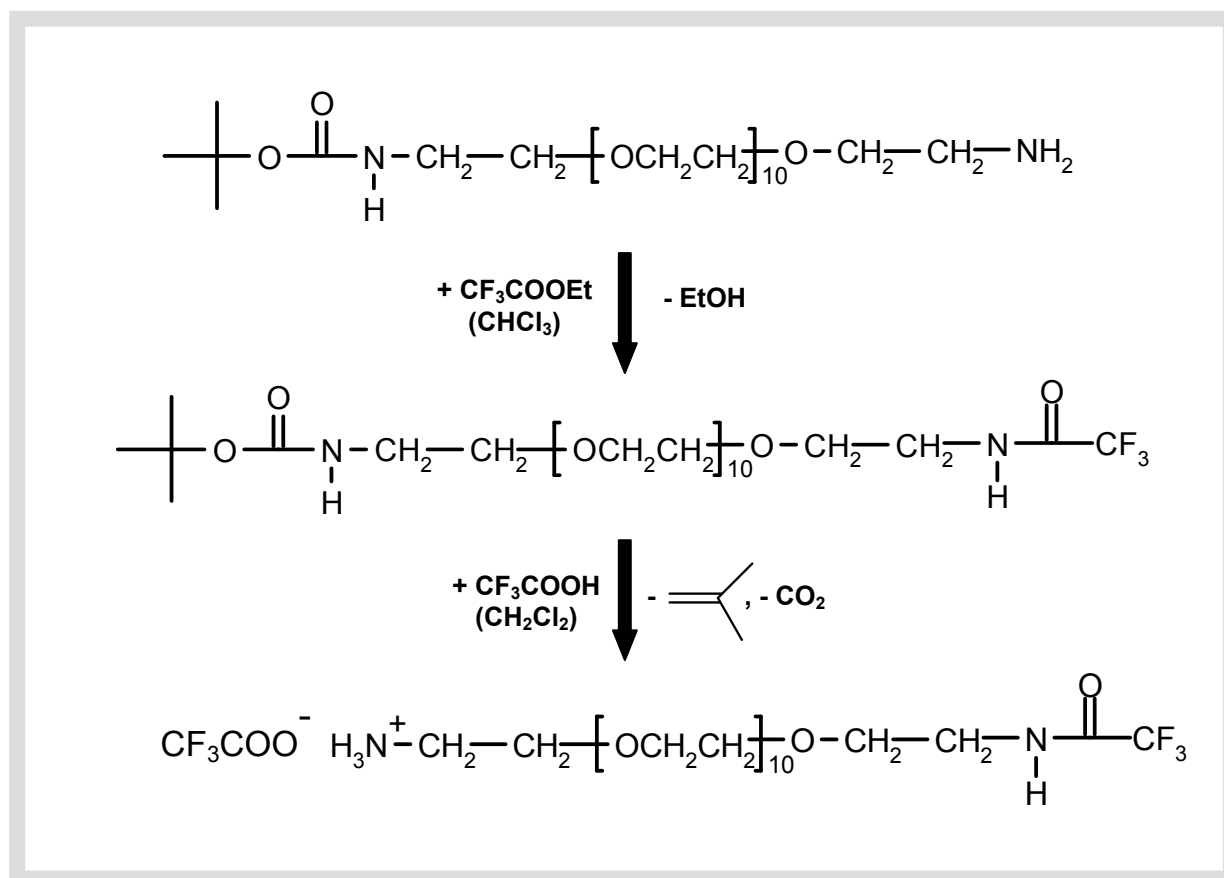


Abb. 28: Schutzgruppeninversion an monodispersem Polyethylenoxid (Boc-NH-PEO11-NH₂). Im ersten Schritt wird die freie Aminosäure mit Trifluoessigsäureethylester in Chloroform zum doppeltgeschützten Produkt umgesetzt. Anschließend kann die säurelabile Boc-Schutzgruppe selektiv mit Trifluoessigsäure in Dichlormethan abgespalten werden.

Die Reaktionsbedingungen zur quantitativen Einführung der Tfa-Gruppe wurden an Methoxyethylamin getestet. Die Bestimmung der Ausbeute erfolgte über die NMR-Signale der Methoxygruppen von Produkt und Edukt. Die Ergebnisse sind in Tab. 3 zusammengefasst. Bei Einsatz von 1,3 Äq. Trifluoessigsäureethylester ist die Reaktion bei RT nach etwa einer Woche quantitativ. Die Zugabe von Triethylamin als Katalysator und die Umsetzung bei erhöhten Temperaturen zeigen keine Beschleunigung der Reaktion.

Tab. 3: Zusammenfassung der Ergebnisse der Reaktion von Methoxyethylamin mit Trifluoressigsäureethylester. Der Umsatz wurde aus dem Verhältnis der NMR-Signale der Methoxygruppen von Produkt und Edukt bestimmt.

Probenname	Äq. CF ₃ COOEt	Umsatz nach 2 h	Umsatz nach 1 d	Umsatz nach 2 d	Umsatz nach 8 d
MEATFA05	1,05	59%	80%	88%	87%
MEATFA50°C	1,05 (50°C)	74%	88%	-----	100%
MEATFA30	1,30	67%	88%	97%	100%
METFA30a	1,30 (0,1 Äq. NEt ₃)	59%	88%	93%	100%

Das in Abb. 26 gezeigte Polyethylenoxid (Boc-NH-PEO11-NH₂) wurde unter Wasserausschluss mit Trifluoressigsäureethylester umgesetzt. Nach der Fällung des doppeltgeschützten Produkts in Pentan wurde die Boc-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure abgespalten. Die NMR-Spektren bestätigen die erfolgreiche Schutzgruppeninversion. Aufgrund des polymeren Charakters der Verbindung wird jedoch ein großer Teil der Resonanzen nicht aufgelöst. Die Überlagerung der Signale führt zu einem breiten Peak bei ca. 3,6 ppm. Durch die Einführung der Tfa-Gruppe verschwindet das Signal der freien Aminogruppe und die benachbarte Methylengruppe zeigt eine deutliche Tieffeldverschiebung (Abb. 29, A und B). Aufgrund der schwachen Signale der Methylengruppen ist die Ausbeutebestimmung in diesem Schritt relativ ungenau. Das Abspalten der Boc-Schutzgruppe im nächsten Reaktionsschritt (Abb. 29, B und C) kann aber sehr schön verfolgt werden.

Beim Abspalten der Boc-Schutzgruppe sind zwei Nebenreaktionen denkbar: Die Boc-Gruppe wird zunächst in CO₂ und ein Isopropylkation gespalten. Das Isopropylkation stellt durch induktive Effekte unter sauren Reaktionsbedingungen ein relativ stabiles Carbokation dar. Aus diesem Grund ist es möglich, dass vor der Stabilisierung zum Isopropen eine Substitutionsreaktion mit der freien Aminogruppe oder eine Spaltung des Polyethylenrückgrads eintritt. Das NMR-Spektrum zeigt jedoch keinerlei Hinweise auf die Anwesenheit derartiger Nebenprodukte.

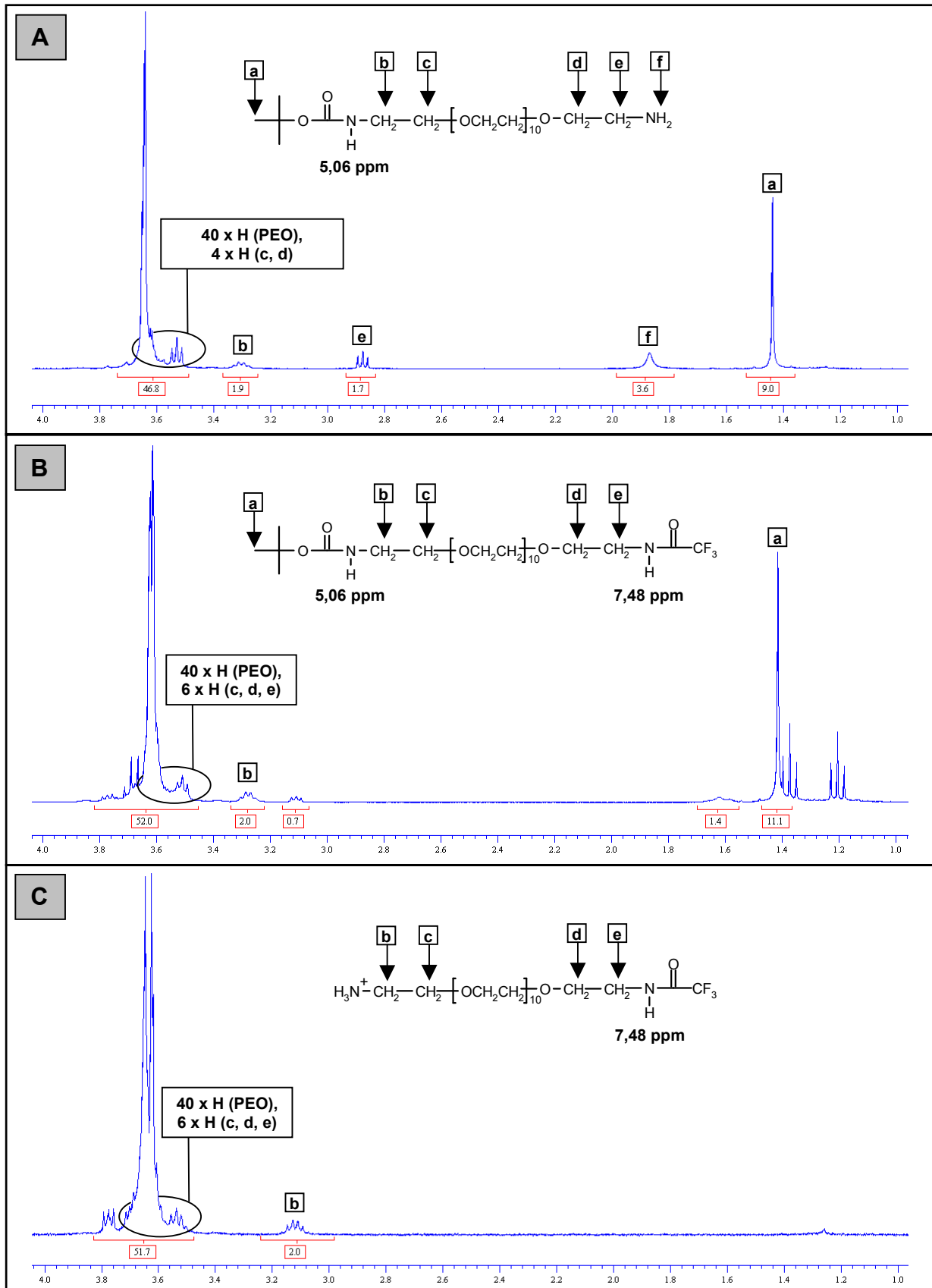


Abb. 29: Schutzgruppeninversion ($^1\text{H-NMR}$, 300 MHz, A u. B: CDCl_3 , C: CD_2Cl_2). Durch die Einführung der Tfa-Gruppe (A→B) verschwindet das Signal der Aminogruppe f und die Methylengruppe e erfährt eine Tieffeldverschiebung. Der Peak bei 3,6 ppm in B enthält zusätzlich die Methylengruppe des abgespaltenen Ethanols. Das Signal der Boc-Gruppe (1,4 ppm) wird von der Resonanz der Methylgruppe des Trifluoressigsäureethylesters überlagert. Bei 1,6 u. 3,1 ppm treten zwei schwache Signale auf, die nicht zugeordnet werden können. Durch die Spaltung der Boc-Gruppe (B→C) verschwindet das Signals bei 1,4 ppm.

Eine zusätzliche Untersuchung der Proben hinsichtlich einer möglichen Spaltung des Polymerrückgrades mittels GPC in THF blieb erfolglos, da nur für das doppeltgeschützte Produkt ein brauchbares Signal detektiert werden kann. Die freien Aminogruppen in den beiden anderen Proben führen offenbar zu starken Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial. Die Untersuchung der Proben mittels MALDI-TOF MS zeigten schließlich, dass bei der Einführung der Tfa-Schutzgruppe keine quantitative Umsetzung erreicht wurde. Im Massenspektrum des doppelt geschützten Produktes (Abb. 30) treten Signale auf, deren Massen mit den theoretischen Werten des Diamins ($\text{H}_2\text{N-PEO-NH}_2$: 544,67 g/mol) bzw. mit den beiden einfach geschützten Produkten (Boc-NH-PEO-NH_2 : 644,79 g/mol bzw. $\text{H}_2\text{N-PEO-NH-Tfa}$: 640,69 g/mol) übereinstimmen.

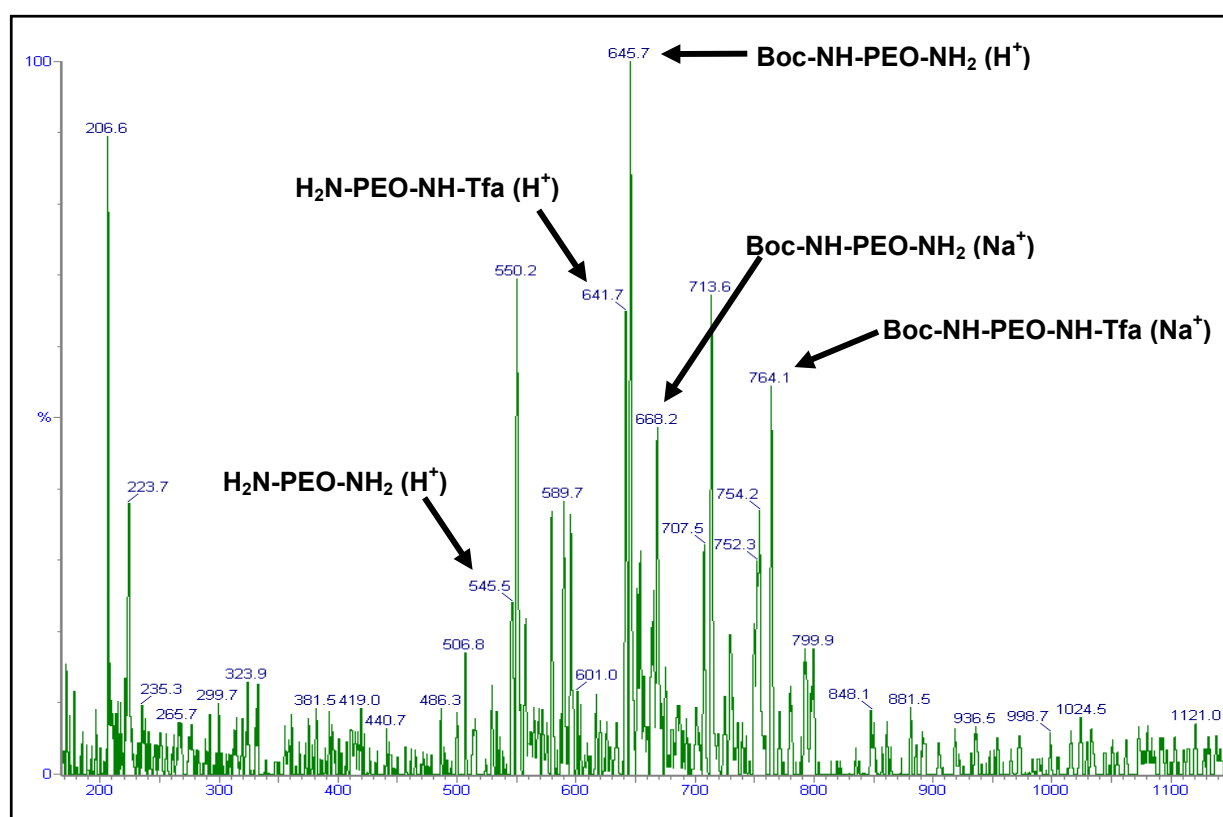


Abb. 30: Massenspektrum der Probe nach dem Einführen der Triflatschutzgruppe. Neben dem erwünschten Produkt treten Signale auf, die sich dem ungeschützten Diamin und den beiden einfach geschützten Verbindungen zuordnen lassen. Im gleichen Bereich treten einige Signale auf, die keiner Verbindung zugeordnet werden können.

Das in Abb. 30 gezeigte Massenspektrum würde das Auftreten von Nebenreaktionen nahe legen, da einige Signale nicht zugeordnet werden können. Nach dem Abspalten der Boc-Schutzgruppe mit Trifluoressigsäure wird jedoch ein sauberes Massenspektrum des erwünschten Produktes und der vollständig entschützten Verbindung erhalten. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass lediglich die Einführung der Trifluoracetatschutzgruppe unvollständig war (Abb. 31, oben). Die Interpretation wird zusätzlich durch ein Wiederholungsexperiment gestützt. Hier wurde das doppeltgeschützte Produkt über Säulenchromatographie gereinigt.

3 Ergebnisse und Diskussion

Nach dem Abspalten der Boc-Schutzgruppe wird nur noch das Signal des einseitig Tfa-geschützten Produkts detektiert. Die so erhaltene Verbindung wurde für die ersten Kopplungsversuche mit der 5'-funktionalisierten DNA verwendet.

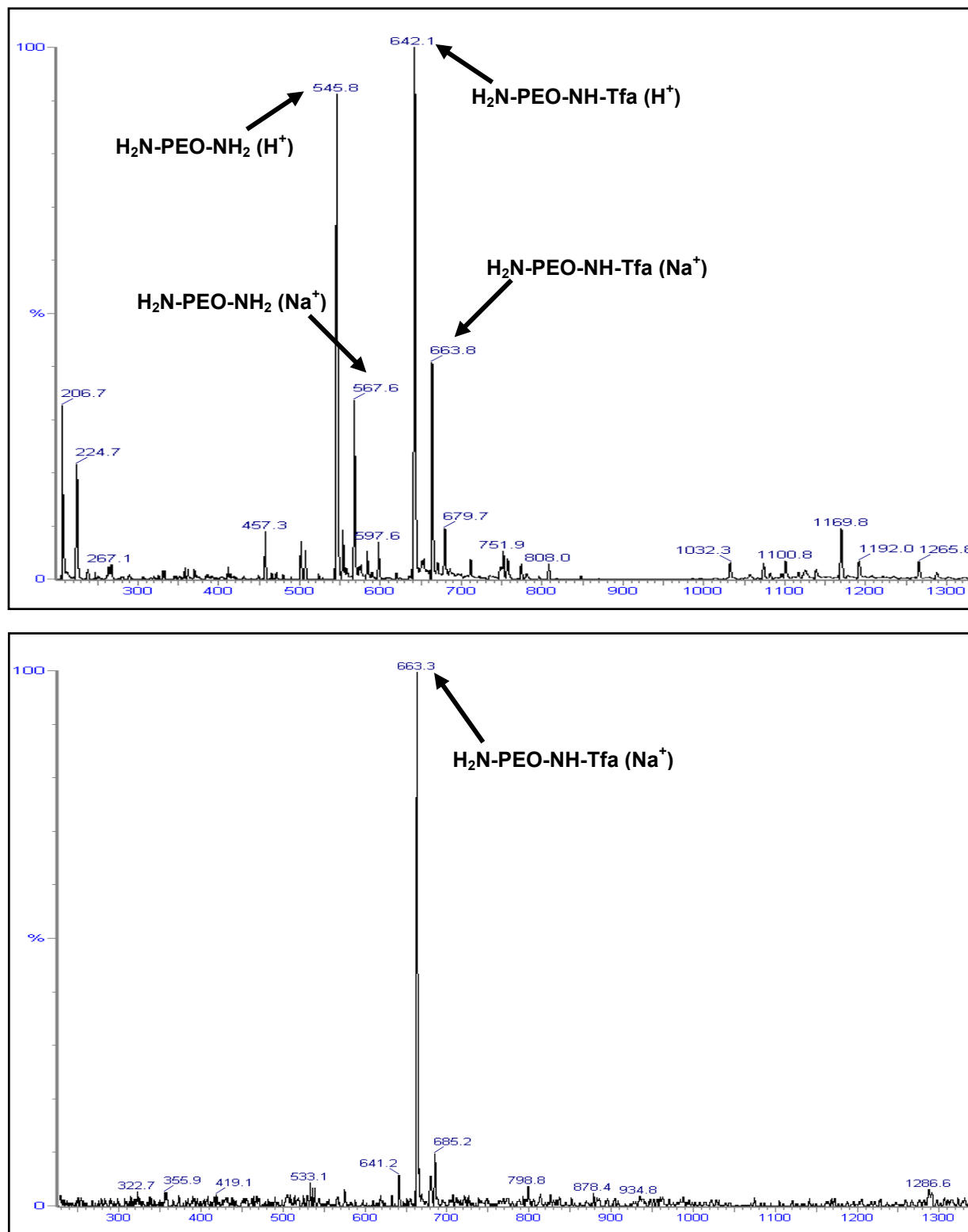


Abb. 31: Massenspektren des einfach Tfa-geschützten Diaminopolyethylenoxids. Oben: Aus der in Abb. 30 gezeigten doppelt geschützten Verbindung wird eine Mischung des erwünschten Produkts mit dem vollständig entschützten Diaminopolyethylenoxid erhalten. Unten: Ein Wiederholungsexperiment, bei dem das doppelt geschützte Produkt über Säulenchromatographie gereinigt wurde, liefert nach dem Abspalten der Boc-Schutzgruppe die erwünschte Verbindung ohne Nebenprodukte.

3.1.3 Synthese von DNA-PEO-Diblockcopolymeren

Der erste Kopplungsschritt zwischen dem einfach geschützten Diaminopolyethylenoxid und der 5'-funktionalisierten DNA kann problemlos nach den Angaben des Herstellers durchgeführt werden [131]. Bei zwanzigfachem Überschuss der Aminokomponente ist die Umsetzung quantitativ. Die zugrundeliegende Reaktionsgleichung ist in Abb. 32 dargestellt.

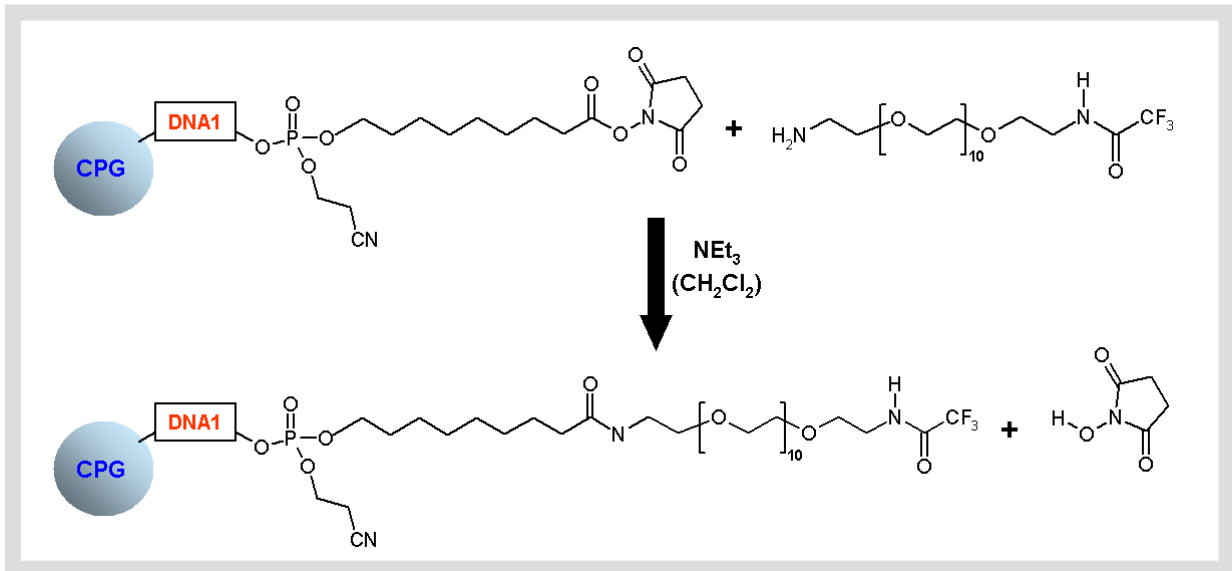


Abb. 32: Kopplungsreaktion zwischen einem trägergebundenen 5'-succinimidylfunktionalisiertem Oligonukleotid und dem einseitig Tfa-geschützten Diaminopolyethylenoxid.

Da das Oligonukleotid in vollständig geschützter Form auf dem Trägermaterial gebunden vorliegt, kann in wasserfreien organischen Lösungsmitteln gearbeitet werden. Die Hydrolyse des Aktivesters stellt somit kein Problem dar. Beim Abspalten der DNA ist jedoch eine Nebenreaktion der freien Aminogruppe des Polyethylenoxids möglich (Abb. 33).

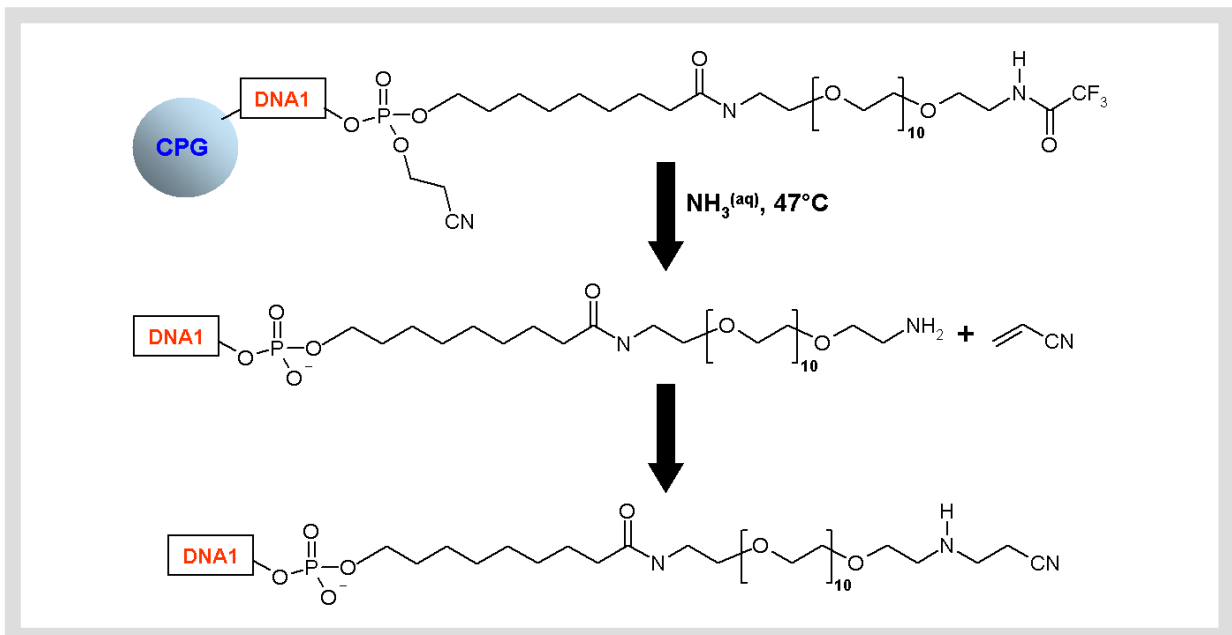


Abb. 33: Die beim Abspalten der DNA als Acrylonitril freigesetzte Phosphatschutzgruppe kann eine Additionsreaktion mit der freien Aminogruppe des Polyethylenoxids eingehen.

Die in Abb. 33 gezeigte Nebenreaktion lässt sich ausschließen, wenn die Phosphatschutzgruppen vor dem Abspalten der DNA mit einer Lösung von 10 % Diethylamin in Acetonitril selektiv gespalten und abgetrennt werden. Das Massenspektrum (Abb. 34) zeigt ein scharfes Signal mit der erwarteten Masse des Produktes.

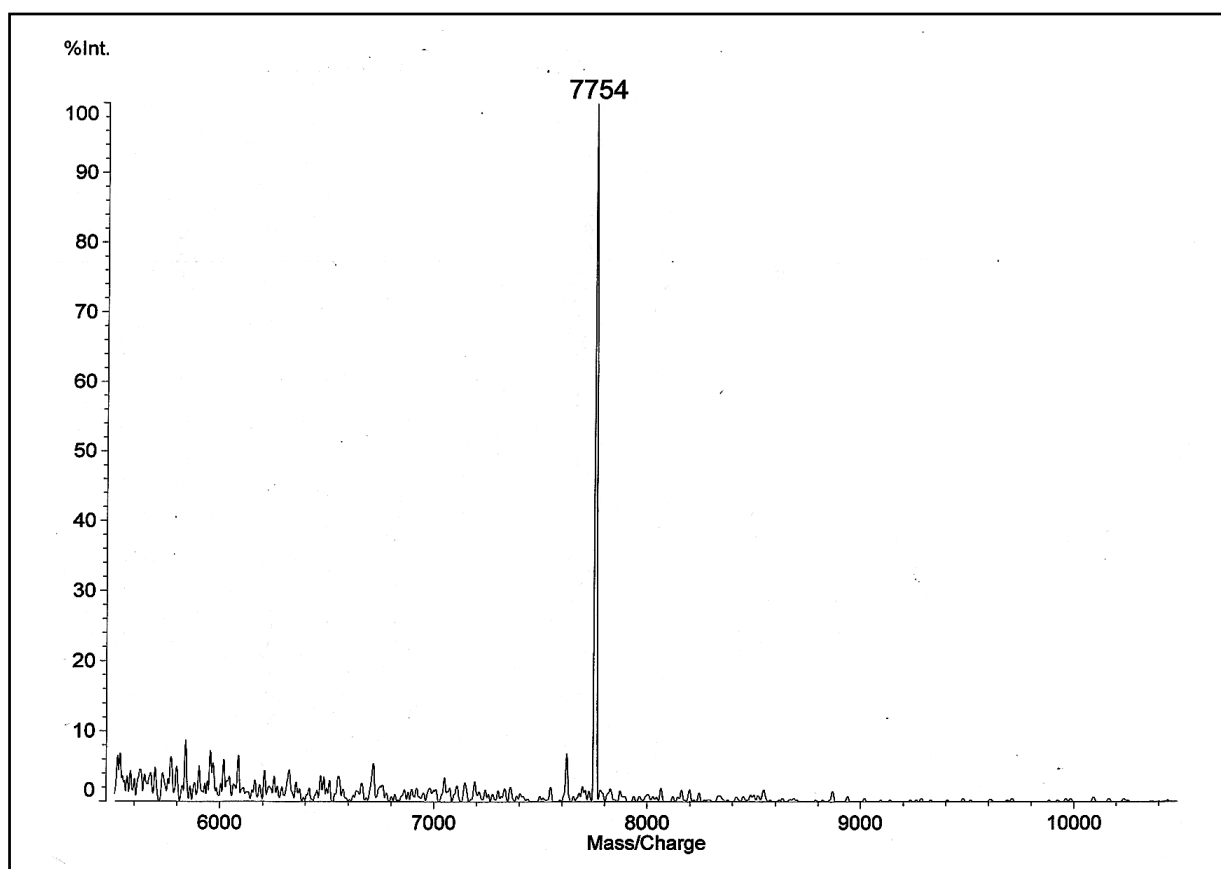


Abb. 34: Massenspektrum des Diblockcopolymeren S1-PEO-NH₂ (Berechnet: 7759,61 g/mol, Gefunden: 7754 g/mol). Die Abweichung zwischen berechneter und gefundener Molmasse ist auf eine ungenaue Kalibrierung des verwendeten Spektrometers zurückzuführen. (Die Sequenz des Oligonukleotids S1 ist im Anhang zu finden.)

Ein großes Problem zu Beginn dieser Arbeit war die Anwendung analytischer Methoden auf die gebildeten Zweiblockpolymere. Das in Abb. 34 gezeigte Massenspektrum wurde an einem Spektrometer der Firma biomers.net GmbH in Ulm aufgenommen. Reproduzierungsversuche an drei verschiedenen Geräten mit derselben Probe unter weitgehend identischen Bedingungen führten zu breiten stark verrauschten Signalen. Auch durch Veränderungen in der Probenpräparation (Beschichtung des Targets mit Nitrocellulose, Reinigung der Probenlösung über ZipTip [RP18-Chromatographiemedium, Millipore], unterschiedliche Methoden beim Auftragen von Matrix und Probenlösung auf das Target) oder die Verwendung verschiedener Matrizen konnte keine Verbesserung der Spektrenqualität erreicht werden. Nach den Erfahrungen von Dr. M. Resmini (biomers.net, Ulm) liegt die Ursache für diese Probleme in apparativen Feinheiten. In vielen Fällen können Standardproben an einem gegebenen Spektrometer gut gemessen werden, während Oligonukleotide am gleichen Gerät zu Problemen

führen. Diese Problematik gilt nicht nur bei der Massenspektrometrie, sondern sie tritt ebenso bei anderen Methoden auf. Auch die Analysenversuche mit Hilfe der Kapillarelektrophorese oder HPLC zeigten, dass nicht nur eine Expertise in Bezug auf die verwendete Methode erforderlich ist, sondern auch für die spezielle Anwendung der Methode auf Oligonukleotide. Für den Einsatz der GPC ist der Unterschied in den hydrodynamischen Radien zwischen der reinen Oligonukleotidsequenz und dem Diblockcopolymer deutlich zu klein. Eine Bestimmung des Verhältnisses von freier DNA zum Kopplungsprodukt ist mit Hilfe der NMR-Spektroskopie möglich, da genau im Bereich der PEO-Signale keine Resonanzen der Oligonukleotide auftreten (Abb. 35). Hier besteht jedoch das Problem, dass die Funktionalisierung des Oligonukleotids mit der Succinimidylesterfunktion nicht quantitativ erfolgt. Dadurch sind Sequenzen in der Probe enthalten, die keine reaktive Gruppe tragen und somit nicht an der Kopplungsreaktion teilnehmen können. Die Vollständigkeit der Reaktion kann deshalb nicht aus dem Verhältnis von freier zu gekoppelter DNA bestimmt werden.

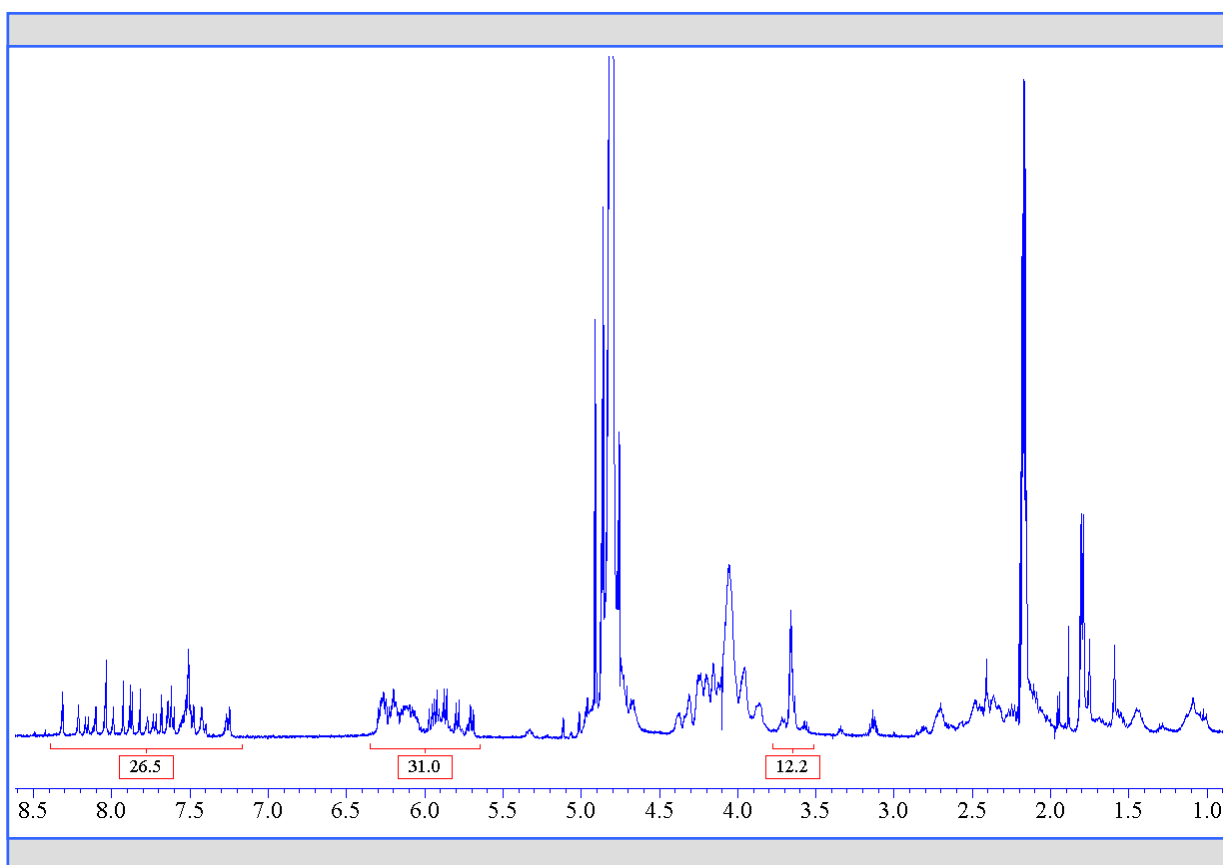


Abb. 35: NMR-Spektrum (400 MHz, D_2O) einer Probe nach der Kopplung in $Na_2CO_3 / NaHCO_3$ -Puffer (1 M, pH 9) + 20 % DMF (Tab. 4, Ansatz 4). Im Bereich zwischen 5,5 und 6,5 ppm liegen die Resonanzen des H1' der Desoxyriboseeinheiten (23 x H) und das Signal des H5 der Cytidingruppen (8 x H). Die Resonanzfrequenzen des Polyethylens liegen bei ca. 3,5 bis 3,75 ppm (44 x H, die Signale der beiden Methylengruppen in direkter Nachbarschaft zur Amino- bzw. Amidgruppe sind zu höherem Feld verschoben). Aus dem Verhältnis dieser Signale ergibt sich ein Anteil von 28 % Kopplungsprodukt. Die restlichen Signale der aromatischen Peaks im Bereich von ca. 7 - 8,5 ppm (H8 und H2 von Adenosin, H8 von Guanodin und H6 von Thymin [132], 28 x H) wurden integriert, um die Qualität des Spektrums zu überprüfen.

Aus dem Verhältnis der NMR-Signale des PEOs und der DNA im Bereich zwischen 5,5 und 6,6 ppm (Abb. 35), ergibt sich ein Wert von 28 % Kopplungsprodukt. Dieses Ergebnis stimmt gut mit der Auswertung der Gelelektrophorese überein (26 % Diblock). Der Umsatz der Reaktion, d.h. der Anteil an funktionalisierter DNA, der mit dem Polymer gekoppelt wurde, liegt jedoch bei ca. 37 % (Relative Intensität der Bande des Kopplungsprodukts bezogen auf nicht umgesetzte funktionalisierte DNA). Die Peaks von funktionalisierter und nicht funktionalisierter DNA sind auch im Intensitätenplot der Gelelektrophorese in vielen Fällen nicht sauber voneinander getrennt, die Methode erlaubt aber trotzdem eine relativ gute Abschätzung des Umsatzes der Reaktion. Die in Abb. 36 gezeigte Probe liefert beispielsweise bei der Auswertung von drei Spuren mit unterschiedlichen Mengen derselben Reaktionslösung Werte von 63, 60 und 65 % (entspricht $\sigma = 2\%$).

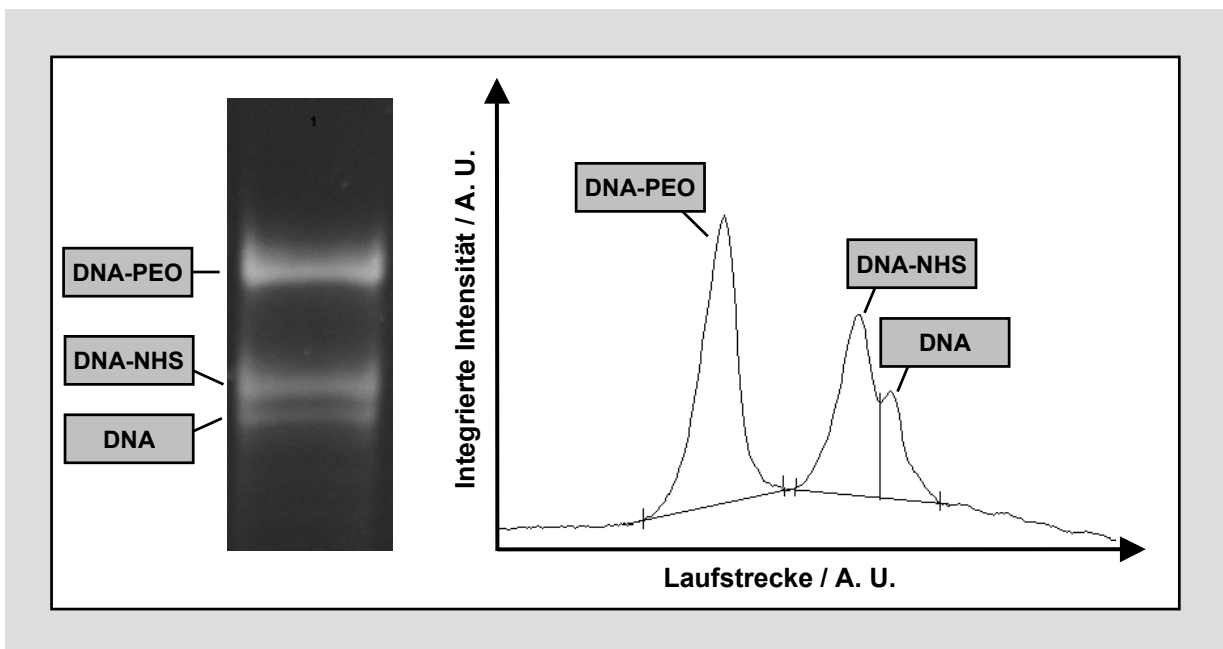


Abb. 36: Die Unterscheidung von funktionalisierter DNA (DNA-NHS) und nicht funktionalisierter DNA ist nur mit Hilfe der Gelelektrophorese möglich. Obwohl die Peaks im Intensitätenplot der Gelelektrophorese in vielen Fällen nicht sauber voneinander getrennt sind erlaubt die Methode eine relativ gute Abschätzung des Umsatzes der Reaktion aus der relativen Intensität der Bande des Kopplungsprodukts (DNA-PEO) bezogen auf nicht umgesetzte funktionalisierte DNA.

Obwohl die Gelelektrophorese eine Standardmethode zur Untersuchung von DNA-Proben darstellt, ist auch hier die Qualität der Ergebnisse stark von den gewählten Bedingungen und der Art der untersuchten Probe abhängig. Informationen aus praxisorientierten Lehrbüchern [133] über Konzentration und Zusammensetzung der Gelmatrix sind nicht ausreichend, da viele andere Parameter, wie z.B. die verwendete Apparatur (Trennstrecke und Material der Gelkassetten), die angelegte Spannung, die Geldicke und die Temperatur während der Gelelektrophorese ebenfalls eine entscheidende Rolle spielen.

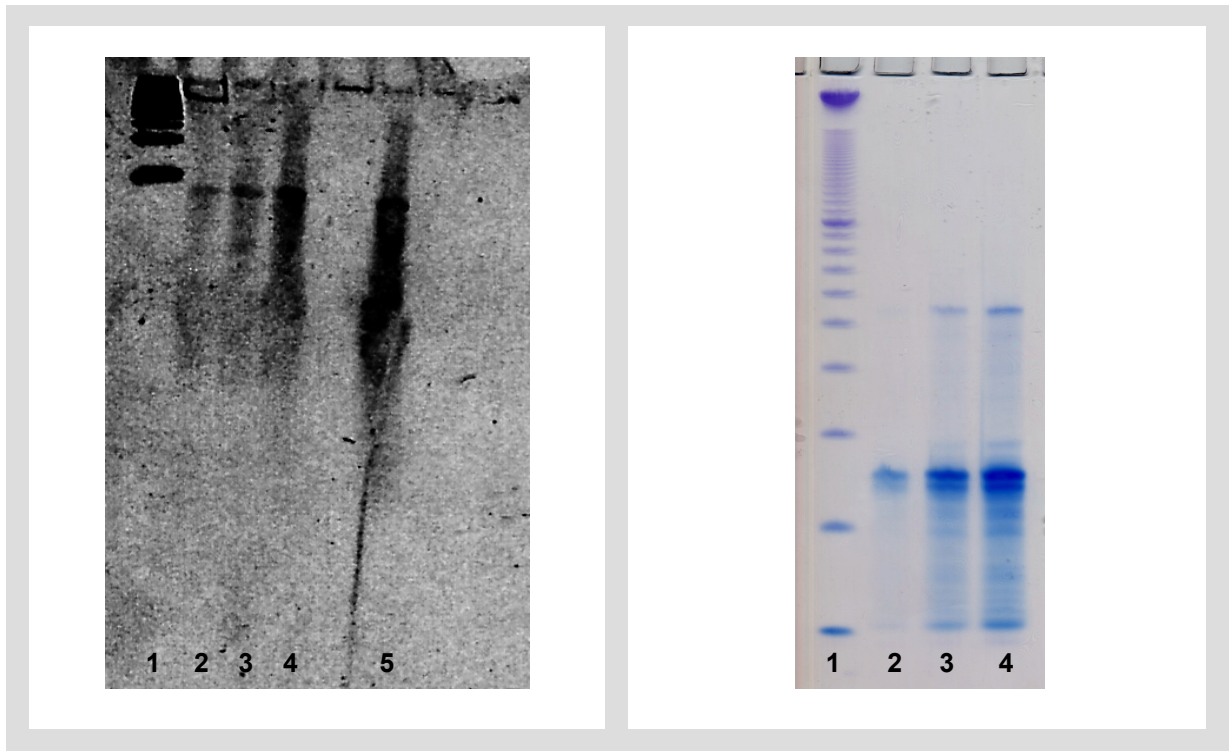


Abb. 37: Einfluss verschiedener Parameter auf die Qualität der Gelelektrophorese. Links: Gelkassetten aus Kunststoff (70 x 66 x 2 mm), konstanter Strom: $I = 100 \text{ mA}$ ($U \approx 140 \text{ V}$), 12 % PAA, 6 M Harnstoff, keine Temperaturkontrolle. Spur 1: 50 bp-Marker Spuren 2, 3, 4 u. 5: Selbe Probe wie im rechten Gel. Rechts: Gelkassette aus Glas (ca. 200 x 200 x 0,8 mm), konstante Spannung: $U = 650 \text{ V}$ ($I \approx 50\text{-}70 \text{ mA}$), 20 % PAA, 8 M Harnstoff, $T = 50\text{-}55^\circ\text{C}$. Spur 1: 10 bp-Marker, Spuren 2, 3 u. 4: Selbe Probe wie im linken Gel (Intensivste Bande: 23 Basen Oligonukleotid).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Synthese von biosynthetischen Diblockpolymeren durch die Blockkopplungsreaktion eines aminofunktionalisierten Polyethylenoxids mit einem 5'-succinimidylfunktionalisierten Oligonukleotid keine Probleme bereitet. Das typische Problem der Abtrennung von Homopolymeren aus der Reaktionslösung bei Blockkopplungsreaktionen kann durch den beschriebenen Syntheseweg weitgehend gelöst werden. Bei zwanzigfachem Überschuss der Aminokomponente ist die Umsetzung quantitativ. Die Charakterisierung des erhaltenen Produktes ist aber nicht trivial. Bei den verwendeten Analysemethoden müssen verschiedene Details beachtet werden, damit zufriedenstellende Ergebnisse erzielt werden können.

3.1.4 Kopplung zu asymmetrischen DNA¹-PEO-DNA²-Triblockpolymeren

Beim nächsten Kopplungsschritt des DNA-PEO-Diblockcopolymeren mit der zweiten Oligonukleotidsequenz ergeben sich zwei Probleme:

1. Durch das Abspalten und Entschützen der DNA trägt das Oligonukleotid des Diblockcopolymeren freie Phosphatgruppen und ist somit nicht mehr in Dichlormethan löslich. Als Lösungsmittel für Oligonukleotide kommen neben Wasser nur Formamid, N-Methylformamid und Ethylenglycol in Frage. Die Löslichkeit in N-Methylformamid ist aber relativ schlecht und die Verwendung von Ethylenglycol ist durch die hohe Viskosität für eine Umsetzung von trägergebundener DNA nicht gut geeignet. In wässrigen Medien tritt die Hydrolyse des Aktivesters mit der Kopplungsreaktion in Konkurrenz.
2. Im ersten Kopplungsschritt kann ein großer Überschuss der Aminokomponente eingesetzt werden. Im zweiten Kopplungsschritt stellt das DNA-PEO-Diblockcopolymer die Aminokomponente dar. Ein zwanzigfacher Überschuss würde daher den Einsatz der zwanzigfachen Menge des ersten Oligonukleotids erfordern.

Als Modellreaktion für den zweiten Kopplungsschritt wurde das einfach geschützte Diaminopolyethylenoxid unter verschiedenen Bedingungen mit der 5'-funktionalisierten DNA umgesetzt. Die Reaktionsbedingungen und Ergebnisse sind in Tab. 4 zusammengefasst.

Tab. 4: Zusammenfassung der Reaktionsbedingungen und Ausbeuten bei der Kopplungsreaktionen von H₂N-PEO-NH-Tfa mit einem 5'-funktionalisiertem Oligonukleotid (23 Basen). Der Umsatz wurde aus den relativen Intensitäten der Produktbanden in der Gelelektrophorese bestimmt.

Ansatz-Nr.	Lösungsmittel	Konzentration H ₂ N-PEO-NH-Tfa	Äquivalente H ₂ N-PEO-NH-Tfa	Umsatz
1	CH ₂ Cl ₂ + 10 % NEt ₃	60 mM	21	100 %
2	Na ₂ HPO ₄ / NaH ₂ PO ₄ -Puffer (0,2 M / pH 7,2) + 20 % DMF	50 mM	6,5	63 %
3	Na ₂ HPO ₄ / NaH ₂ PO ₄ -Puffer (0,2 M / pH7,2) + 20 % DMF	34 mM	2,5	47 %
4	Na ₂ CO ₃ / NaHCO ₃ -Puffer (1 M / pH 9) + 20 % DMF	2,8 mM	1	37 %
5	Formamid + 10 % NEt ₃	54 mM	4	29 %
6	Formamid + 10 % NEt ₃	2,8 mM	1	24 %

Die Kollisionswahrscheinlichkeit der Reaktanden wird bei einer Umsetzung, bei der eine Komponente auf einen festen Träger gebunden ist, nur durch die Konzentration der Reaktionslösung bestimmt. Solange die Komponente in Lösung in ausreichendem Überschuss vorliegt, so dass die Konzentration im Verlauf der Reaktion annähernd konstant bleibt, sollte die Ausbeute nicht vom Mengenverhältnis der Reaktionspartner abhängen. Bei der Umsetzung in Wasser bei pH 7,2 (Tab. 4, Ansatz 2) bleibt die Konzentration im Verlauf der Reaktion in einem vergleichbaren Bereich wie bei der Umsetzung in Dichlormethan. Trotzdem ist die Ausbeute deutlich schlechter. Als Ursache könnte hier eine mögliche Hydrolyse des NHS-Esters genannt werden. Die Reaktion wurde jedoch bei 10°C durchgeführt. Unter diesen Bedingungen sollte die Hydrolyse des NHS-Esters im Vergleich zur Aminolyse eine deutlich größere Halbwertszeit zeigen ($t_{1/2}^{\text{Hydrolyse}} = 100 \text{ min}$, $t_{1/2}^{\text{Aminolyse}} = 10 \text{ min}$ [134]) Diese Werte wurden jedoch für eine Reaktion in Lösung bestimmt. Es ist durchaus denkbar, dass sich das Verhältnis der Halbwertszeiten durch die Fixierung des Aktivester auf dem Träger zu Gunsten der Hydrolyse verschiebt. Erstaunlicherweise ist aber auch die Kopplung in Formamid deutlich weniger effektiv als die Kopplung in Dichlormethan, obwohl das verwendete HiDi™ Formamid („Highly Deionised Formamid“) zusätzlich über ein Molsieb (3 Å) von Wasserresten und durch trägergebundenes Isocyanat von Ammoniakspuren befreit wurde. Eine Hydrolyse bzw. Ammonolyse des Aktivesters kommt daher als Ursache nicht in Frage. Das die Stöchiometrie bei vergleichbaren Konzentrationen (vgl. Tab. 4, Ansatz 2 und 5) einen so deutlichen Einfluss auf die Ausbeute hat, ist nach dem oben gesagten ebenfalls nicht zu erwarten. Die Polarität der Lösungsmittel, in Form der Dielektrizitätskonstanten, zeigt jedoch eine gewisse Korrelation mit der Kopplungsausbeute ($\epsilon^{\text{Dichlormethan}} \ll \epsilon^{\text{Wasser}} < \epsilon^{\text{Formamid}}$).

Neben den in Tab. 4 zusammengefassten Reaktionen mit der succinimidylfunktionalisierten DNA wurden Versuche zur Aktivierung der Säuregruppe über EDC durchgeführt. (EDC ist ein wasserlösliches Carbodiimid.) Bei dieser Reaktion führt die Hydrolyse der aktiven Spezies zur Rückbildung der Säuregruppe. Dadurch kann die Carboxylfunktion *in situ* immer wieder neu aktiviert werden. EDC selbst ist zwar ebenfalls hydrolyseempfindlich, von diesem Reagenz kann aber problemlos ein großer Überschuss eingesetzt werden. Bei der Umsetzung der carboxylfunktionalisierten DNA mit 11 Äq. EDC (6,6 mM) und 66 Äq. H₂N-PEO-NH-Tfa (40 mM) konnte keine Kopplung nachgewiesen werden. Die weiteren Aktivierungsversuche wurden nicht mit EDC sondern mit Carbonyldiimidazol (CDI) durchgeführt. Dieses hat den Vorteil, dass nicht nur Säuregruppen sondern auch Amino-, Hydroxy- oder Phosphatgruppen aktiviert werden können. Dadurch lässt sich die Hydrolyse der deutlich teureren Succinimidylesterfunktion zur Säuregruppe umgehen. Die Reaktion wurde sowohl an einer

hydroxy- als auch an einer aminofunktionalisierten DNA mit einem α -Amino- ω -methoxypolyethylenglycol ($n = 12$) getestet. In beiden Fällen werden knapp 50 % Kopplungsprodukt gebildet, zusätzlich tritt jedoch ein Nebenprodukt mit geringerer Mobilität in der Gelelektrophorese auf (Abb. 38). Dieses kann evtl. durch eine zusätzliche Kopplungsreaktion mit einem weiteren Polyethylenoxidblock erklärt werden: Sowohl die Aminogruppe des PEOs als auch das freigesetzte Imidazol stellen basische Verbindungen dar, die prinzipiell in der Lage sind Schutzgruppen von der DNA abzuspalten. Die Freisetzung einer Phosphatgruppe könnte zu einer zusätzlichen CDI-aktivierten Kopplungsreaktion führen.

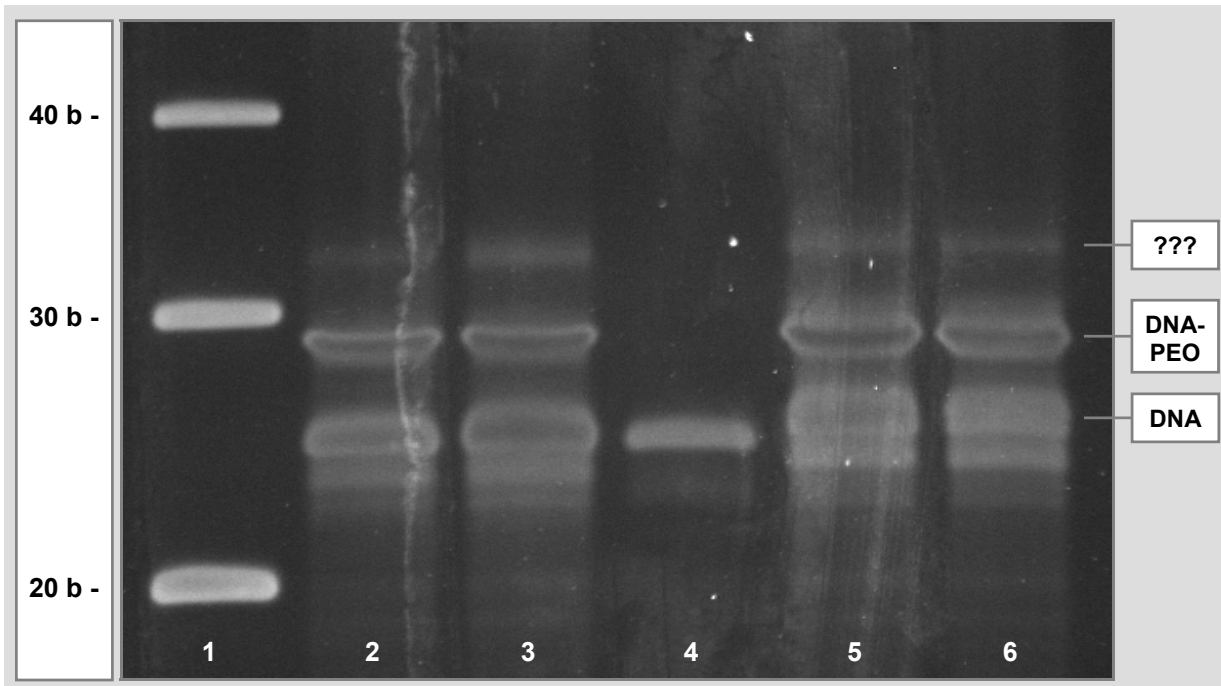


Abb. 38: Kopplung von α -Amino- ω -methoxy-polyethylenoxid (m-dPEG₁₂TM amine) an hydroxy- bzw. aminofunktionalisierte Oligonukleotide (23 b) durch Aktivierung mit CDI: Spur 1: 10 bp-Marker, Spur 2 u. 3: Kopplung an die 5'-OH-Gruppe nach Aktivierung mit CDI in THF bzw. DMF, Spur 4: Verwendete 5'-Hydroxy-DNA, Spuren 5 u. 6: Kopplung an die 5'-NH₂-Gruppe nach Aktivierung mit CDI in THF bzw. DMF. Die Kopplung wurde bei allen Proben in THF bei RT durchgeführt. Die Kopplungsausbeute liegt im Bereich von knapp 50 %. Zusätzlich wird ein Nebenprodukt mit geringerer Mobilität gebildet.

Die verschiedenen Probeansätze haben gezeigt, dass die Umsetzung des succinimidylfunktionalisierten Oligonukleotids in wässriger Umgebung bei pH 7,2 die effektivste Möglichkeit zur Kopplung des Diblockcopolymeren mit der zweiten DNA-Sequenz darstellt. Es gibt jedoch eine generelle Einschränkung bei der Wahl der Reaktionsbedingungen für die zweiten Kopplungsreaktion: Da das zweite Oligonukleotid auf dem Trägermaterial gebunden ist, muss ein gewisses Mindestvolumen an Reaktionslösung verwendet werden, um eine ausreichende Benetzung des Trägermaterials zu gewährleisten. Bei der Verwendung von 100 mg Standard-CPG mit einer Porengröße von 500 Å (entspricht ca. 1,4 μ mol DNA) werden mindestens 100 μ l Lösungsmittel benötigt, um eine ausreichende Benetzung und Durchmischung des Trägermaterials zu gewährleisten. Wenn das Diblockcopolymer

stöchiometrisch eingesetzt werden soll, liegt daher die maximal mögliche Konzentration der Reaktionslösung bei 14 mM. Eine Erhöhung der Konzentration auf 60 mM, wie bei der quantitativen Kopplung in Dichlormethan (Tab. 4, Ansatz 1), würde deshalb die Verwendung von mindestens 4,3 Äquivalenten des Diblockcopolymer erfordern. Wenn die Reaktion an einem CPG mit höherer Porengröße (2000 Å) erfolgen soll ist die Einschränkung sogar noch drastischer, da dieses Material nicht nur eine geringere spezifische Dichte sondern gleichzeitig eine niedrigere Belegungsichte an DNA aufweist.

Die Reaktion wurde mit zwei Diblockcopolymeren aus verschiedenen Ansätzen (Tab. 4, Ansatz 2 und 3) durchgeführt. Zu dieser Zeit war die Gelelektrophorese noch nicht optimiert. Aus diesem Grund war es nur möglich die Gesamtkonzentration an DNA (DNA¹ + DNA¹-PEO-NH₂) zu bestimmen. Das Verhältnis von Zweiblock zu nicht gekoppelter DNA in den beiden Ansätzen konnte lediglich aus Beimischexperimenten in der MALDI-TOF MS abgeschätzt werden. Deshalb war es nicht möglich die Stöchiometrie für den zweiten Kopplungsschritt exakt einzustellen. Die in Tab. 5 angegebenen Werte für die Konzentration an Zweiblockpolymer (DNA¹-PEO-NH₂) wurden aus der Gesamtkonzentration an DNA aus UV-Messungen und den nachträglich mittels Gelelektrophorese bestimmten Anteilen des Zweiblockpolymers aus Tab. 4 berechnet. Die Reaktionsbedingungen und die Ausbeute an Dreiblockpolymer sind in Tab. 5 zusammengefasst.

Tab. 5: Reaktionsbedingungen und Ausbeuten bei der Kopplung des Diblockcopolymer an die zweite Oligonukleotidsequenz. Die Konzentration an Zweiblockpolymer (DNA¹-PEO-NH₂) wurde aus der Gesamtkonzentration an DNA aus UV-Messungen und den mittels Gelelektrophorese bestimmten Anteilen des Zweiblockpolymers (vgl. Tab. 4) berechnet.

Ansatz-Nr.	Konzentration DNA ¹ + DNA ¹ -PEO-NH ₂	Konzentration DNA ¹ -PEO-NH ₂	Menge an trägergebundener DNA	Äquivalente DNA ¹ -PEO-NH ₂	Ausbeute
2	1,4 mM	0,88 mM	0,72 µmol (2000 Å CPG)	1,2	ca. 10 %
3	7,2 mM	3,4 mM	0,83 µmol (500 Å CPG)	0,8	ca. 7 %

Bei beiden Proben zeigt die Kopplungsreaktion des Zweiblockpolymers mit dem zweiten Oligonukleotid eine deutlich schlechtere Ausbeute als die Kopplungsreaktionen zwischen PEO und der ersten DNA-Sequenz unter vergleichbaren Bedingungen (vgl. Tab. 4, Ansatz 4 und 6). Eine mögliche Erklärung wäre eine unvollständige Freisetzung der zweiten Aminogruppe des Polyethylenoxids. Die Qualität der NMR-Spektren am Zweiblockpolymer reicht nicht für den entsprechenden Nachweis aus. Die Abspaltung der Tfa-Schutzgruppe wurde jedoch am einfach geschützten Polyethylenoxid unter den gleichen Bedingungen wie bei der Ammonolyse des

Zweiblockpolymers überprüft. Die NMR-Spektren dieser Probe zeigen eine quantitative Freisetzung der Aminogruppe. Eine Blockierung der Aminogruppe durch Addition an Acrylonitril (vgl. Abb. 33) während dem Abspalten der DNA vom Träger, kann aufgrund der oben beschriebenen Behandlung mit Diethylamin weitgehend ausgeschlossen werden. Im Prinzip wäre es denkbar, dass die Aminogruppe des Zweiblockpolymers bereits während der Kopplungsreaktion einen Teil der Phosphatschutzgruppen des zweiten Oligos abspaltet und anschließend durch Addition an das freigesetzte Acrylonitril blockiert wird. Ebenso wäre eine Transamidierung zwischen der Aminogruppe des Diblockcopolymers und den geschützten Aminogruppen der Adenosin- Cytosin- bzw. Guanodin-Einheiten denkbar [135]. Es gibt aber keinen Grund, warum diese Nebenreaktionen nicht bereits bei der Synthese des Zweiblockpolymers auftreten sollten. Der einzige prinzipielle Unterschied zwischen der ersten und zweiten Kopplungsreaktion liegt in der Anwesenheit der *nicht geschützten* Oligonukleotidsequenz des Zweiblockpolymers im zweiten Kopplungsschritt. Durch das Abspalten und Entschützen werden aber lediglich aromatische Aminogruppen, die Phosphatgruppen und die 3'-OH-Gruppe des Oligonukleotids freigesetzt. Keine dieser Gruppen liefert einen Anlass für zusätzliche Nebenreaktionen.

3.1.5 Kombination von Kopplung und Festphasensynthese

Die beschriebenen Probleme beim zweiten Kopplungsschritt der Synthese von asymmetrischen Triblockcopolymeren können durch eine Änderung des Synthesewegs umgangen werden: Anstelle des einseitig geschützten Diaminopolyethylenoxids kann ein α -Amino- ω -hydroxypolyethylenoxid verwendet werden. Die Reaktionsbedingungen für den ersten Kopplungsschritt können dabei unverändert beibehalten werden, da die Hydroxygruppe keine ausreichende Nukleophilie zeigt, um eine Reaktion mit dem NHS-Ester einzugehen. Bei diesem Syntheseansatz trägt das CPG-gebundene Diblockcopolymer nach der ersten Kopplungsreaktion eine primäre OH-Gruppe, die als Startpunkt für die Festphasensynthese der zweiten DNA-Sequenz genutzt werden kann (Abb. 39). Diese Modifikation des Syntheseweges hat verschiedene Vorteile: Die Schutzgruppenchemie am Polymer ist nicht mehr notwendig, da die NH_2 -Gruppe selektiv mit dem NHS-Ester reagiert. Sowohl die Transamidierung als auch die Addition des Acrylonitrils an das Diblockcopolymer sind als Nebenreaktionen nicht mehr möglich, da der Zweiblock keine Aminogruppe trägt. Die Umsetzung zum Triblockcopolymer ist nicht mehr auf wässrige Medien beschränkt. Dadurch ist der Syntheseweg auch auf andere, nicht wasserlösliche Polymere übertragbar und somit deutlich universeller einsetzbar.

Die Umsetzung zum Triblockcopolymer erfolgt weitgehend quantitativ, da die zweite DNA-Sequenz durch Standard Phosphoramiditechemie erzeugt wird. Prinzipiell wäre dadurch auch eine vollständige Automatisierung der Dreiblocksynthese möglich. Der einzige Nachteil des modifizierten Syntheseweges liegt in der Bildung von Fehlsequenzen bei der Synthese des zweiten Oligos, die sich nur mit Hilfe der präparativen Gelelektrophorese abtrennen lassen. Im Fall der zweifachen Kopplung werden die Fehlsequenzen nicht an das Polymer gebunden, da nur die vollständige Sequenz eine 5'-Funktionalisierung trägt.

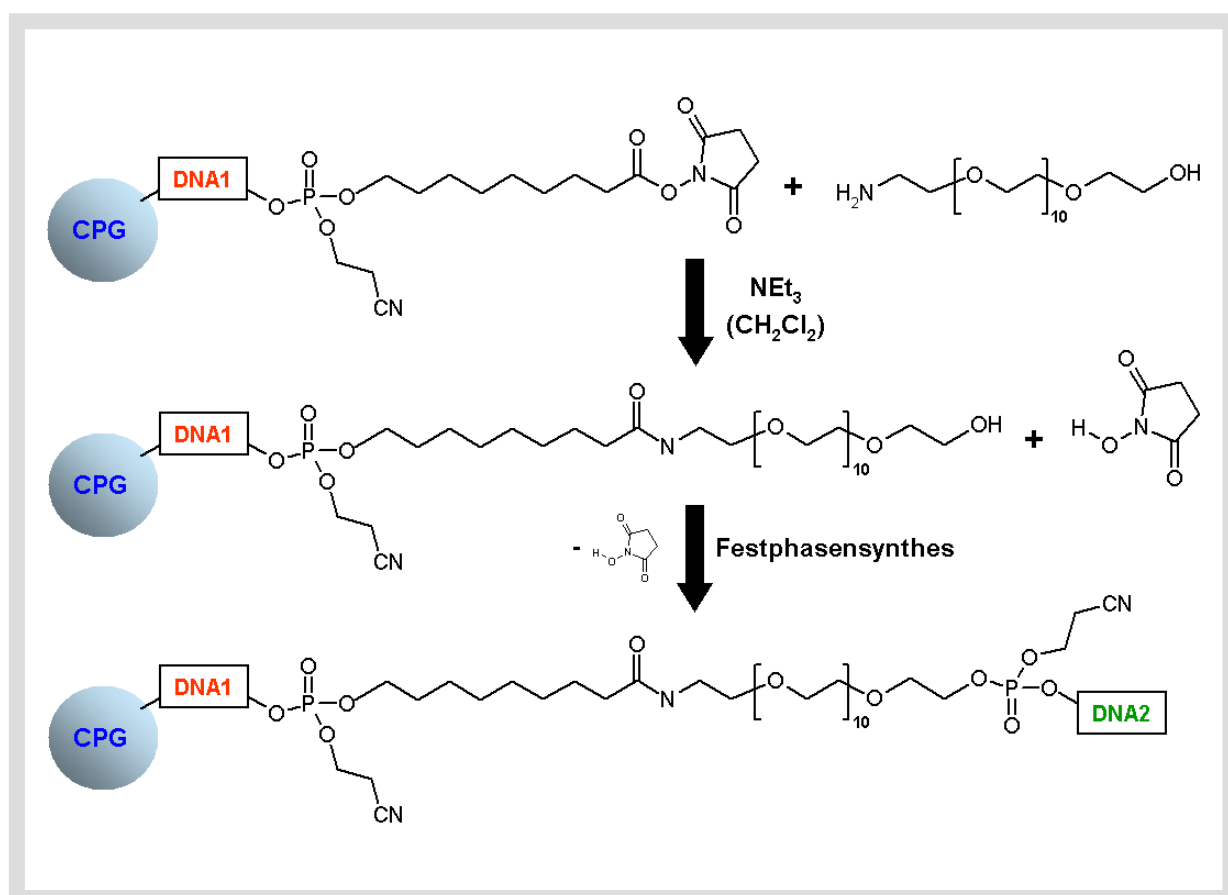


Abb. 39: Synthese von asymmetrischen DNA¹-PEO-DNA² Triblockcopolymeren durch Kombination von Kopplungsreaktion und Festphasensynthese. Im ersten Schritt wird die Aminogruppe des α -Amino- ω -hydroxypolyethylenoxids selektiv mit dem trägergebundenen succinimidylfunktionalisierten Oligonukleotid umgesetzt. Die freie OH-Gruppe am Ende der Diblockstruktur kann im nächsten Schritt als Ausgangspunkt für die Festphasensynthese der zweiten Oligonukleotidsequenz genutzt werden.

Die Synthese des Triblockcopolymeren auf Grundlage des modifizierten Reaktionsweges wurde zunächst mit einem kommerziell erhältlichen monodispersen α -Amino- ω -hydroxypolyethylenoxid ($n = 12$) getestet. Eine Untersuchung der Di- und Triblockstrukturen mittels denaturierender PAGE zeigt in beiden Schritten einen quantitativen Umsatz (Abb. 40).

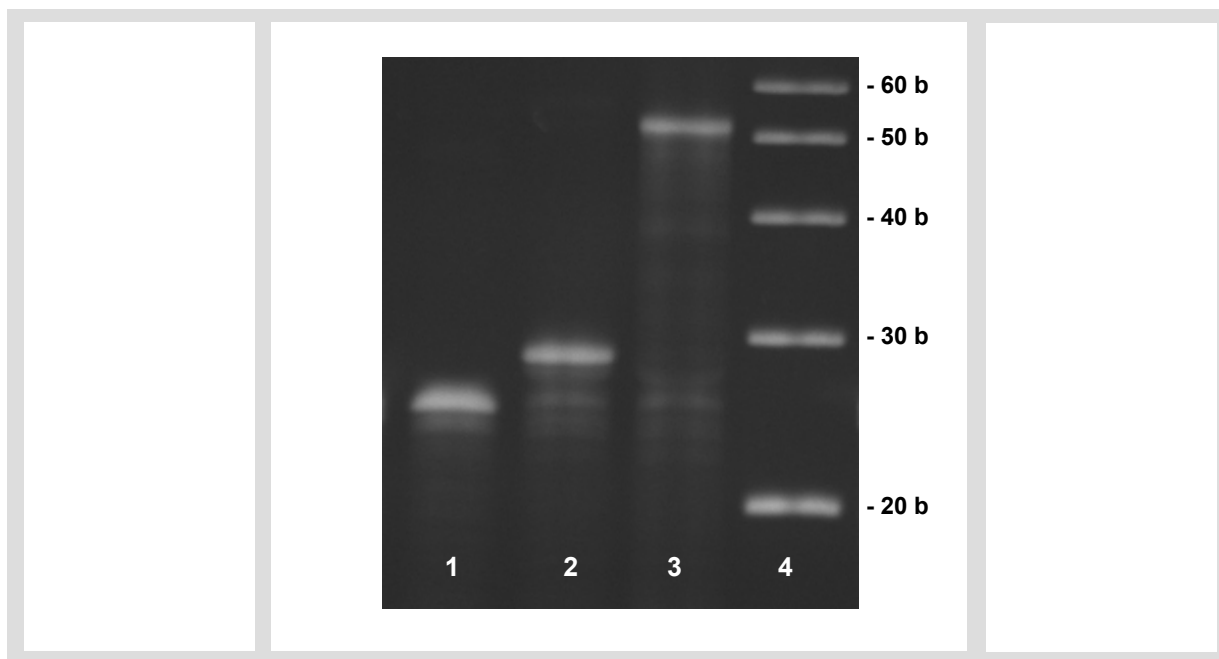


Abb. 40: Ergebnisse des modifizierten Syntheseweges mit einem monodispersen α -Amino- ω -hydroxypolyethylenoxid (Amino-dPEG₁₂TM-alcohol, Quanta BioDesign). Spur 1: DNA-Sequenz 1 (S1, 23 Basen), Spur 2: Diblockcopolymer (S1-PEO-OH), Spur 3: Triblock (S1-PEO-S2), Spur 4: 10 bp-Marker.

Die Dreiblocksynthese wurde nun mit anderen Oligonukleotidsequenzen und anderen monodispersen α -Amino- ω -hydroxypolyethylenoxiden ($n = 16$ bzw. $n = 32$) durchgeführt, die von Tina Kiefer mittels repetitiver heterofunktioneller Duplikation hergestellt wurden [136]. Bis auf drei Proben liegt die Ausbeute der Kopplungsreaktion über 90 % (Abb. 41). Bei den drei Proben mit schlechterer Ausbeute ist die unvollständige Reaktion evtl. auf eine Verunreinigung in den Oligonukleotiden zurückzuführen, da mit den gleichen Polymeren bei der Kopplung mit anderen Sequenzen deutlich bessere Ergebnisse erzielt werden. Ein extremes Beispiel für eine solche Verunreinigung wurde bei einer Probe von Sabine Flügel beobachtet. Hier trat eine Rauchentwicklung auf, sobald die triethylaminhaltige Lösung in die Nähe des Trägermaterials gebracht wurde. Dieser Effekt kann als Hinweis auf eine saure Verunreinigung verstanden werden. (Die Tritylgruppe wird im Synthesesyklus mit Di- bzw. Trichloressigsäure abgespalten.) Die Verunreinigung konnte auch durch mehrfaches Waschen des Trägermaterials nicht quantitativ entfernt werden. Die Porengröße des Trägermaterials zeigt bei den verwendeten Polymeren keinen systematischen Einfluss auf die Kopplungsausbeute. Im Falle des Polyethylenoxids mit 32 Wiederholungseinheiten scheint das Ergebnis der Kopplungsreaktion auf eine Verunreinigung des Polymers mit kleineren PEO-Fragmenten hinzuweisen. Hier werden drei schwache Banden oberhalb der verwendeten Oligonukleotidsequenz beobachtet, wobei eine Bande auf der Höhe des Diblockcopolymeren mit einem Polyethylenoxidblock von 16 Wiederholungseinheiten liegt. Bei diesen Proben ist auch die Gesamtausbeute der Kopplungsreaktion sehr schlecht.

Die Kopplungsreaktion zeigt also, bis auf wenige Ausnahmen, eine gute Reproduzierbarkeit und hohe Ausbeuten. Die Synthese der zweiten Oligonukleotidsequenz, an der endständigen OH-Gruppe der Diblockcopolymeren, führt jedoch bei allen Proben zu sehr unbefriedigenden Ergebnissen (Abb. 42).

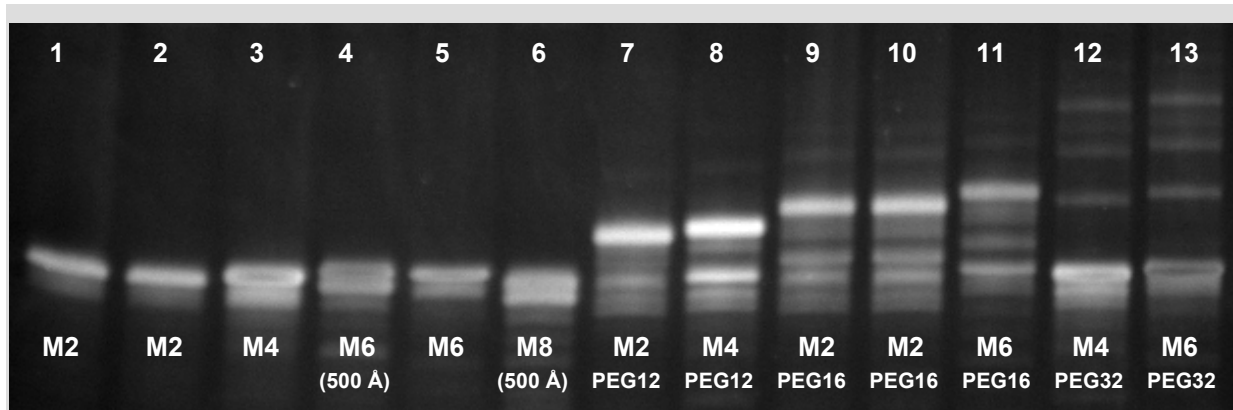


Abb. 41: Kopplungsreaktionen an vier verschiedenen Oligonukleotidsequenzen (M2, M4, M6 und M8) mit drei verschiedenen α -Amino- ω -hydroxypolyethylenoxiden ($n = 12, 16$ bzw. 32) auf Trägermaterialien mit 500 bzw. 2000 \AA . Spuren 1-6: Oligonukleotide (M2, M2, M4, M6, M6, M8) mit 23 Basen. Die Proben auf Spur 4 und 6 wurden auf Standard CPG (500 \AA) synthetisiert. Alle anderen Sequenzen sind an 2000 \AA CPG gebunden. Spuren 7-13: Diblockcopolymeren auf 2000 \AA CPG (M2-PEG12, M4-PEG12, M2-PEG16, M2-PEG16, M6-PEG16, M4-PEG32, M6-PEG32), Spuren 14-17: Diblockcopolymeren auf 500 \AA CPG (M6-PEG12, M8-PEG12, M6-PEG16, M8-PEG16). Mit der Sequenz M8 ist die Kopplung quantitativ (Spur 15 u. 16), die untere Bande entspricht der nicht funktionalisierten DNA. Bei M6 ist die Ausbeute mit beiden Polymeren ein wenig schlechter.

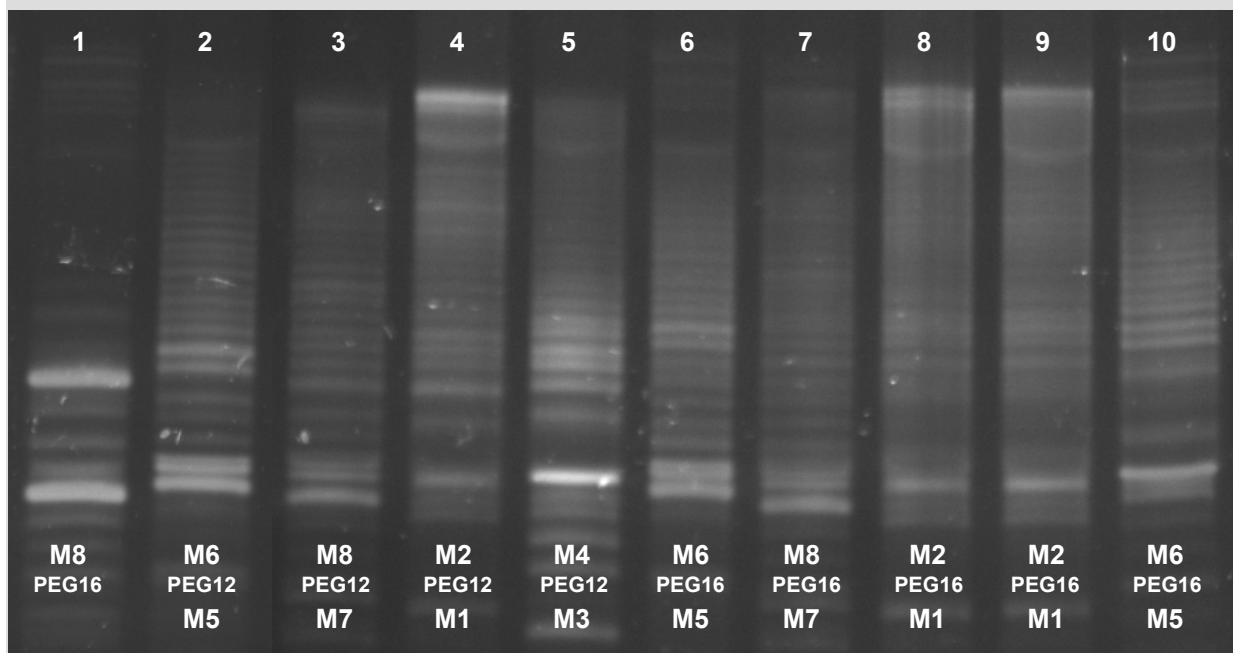
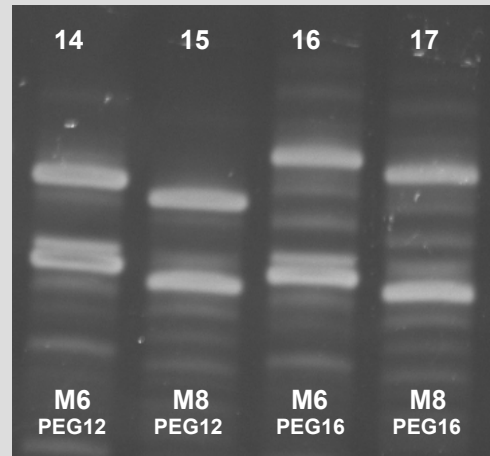


Abb. 42: Denaturierende PAGE nach der Synthese des zweiten Oligonukleotids. Zur besseren Orientierung ist auf Spur 1 ein Diblockcopolymer (M8-PEG16) gezeigt. Die obere Bande markiert den Startpunkt der Synthese des zweiten Oligos. Bis auf eine Probe zeigen alle Spuren lediglich die Fehlsequenzen der zweiten Oligonukleotidsynthese. Die eigentliche Zielsequenz wird so gut wie gar nicht gebildet.

Zur Klärung der Ursache für die schlechten Ergebnisse der DNA-Synthese an den untersuchten Diblockpolymeren wurden die Tritelwerte der Oligonukleotidsynthesen überprüft. Die schrittweisen Kopplungsausbeuten bei den Synthesen der zweiten Sequenz liegen nur wenig zu niedrig, die Absolutwerte sind jedoch um einen Faktor vier bis zehn zu klein. (Schrittweise Kopplungsausbeuten: 500 Å CPG: 91-95 %, 2000 Å CPG: 96-97 %, Absolutwerte: 42-120 S) Typischerweise liegen die Werte einer erfolgreichen Synthese oberhalb von 97 %. Bei Tritelwerten < 90 % gilt eine Synthese als fehlgeschlagen und wird abgebrochen. Die Absolutwerte der Leitfähigkeitsmessungen liegen bei einer Synthese im S-Scale mit ca. 10 mg Standard CPG üblicherweise bei ca. 400-500 S [137]. Die Synthese wird also offenbar direkt ab dem ersten Kopplungsschritt dramatisch gestört. Zur Klärung der Ursache der Störung wurden sowohl die verwendeten Oligonukleotide als auch die verwendeten Polymere systematisch variiert. Zu diesem Zweck wurden zwei Sequenzen gewählt, die sich in den Ergebnissen der Dreiblocksynthese möglichst stark unterscheiden. Mit den Sequenzen S1 und S2 (Abb. 40) war die Dreiblocksynthese quantitativ. Bei den Sequenzen M4 und M3 (Abb. 42, Spur 5) sind die Ergebnisse besonders schlecht. Die Versuche mit diesen Sequenzen wurden einmal mit dem in Abb. 42 verwendeten α -Amino- ω -hydroxypolyethylenoxid (Amino-dPEG₁₂TM-alcohol, Quanta BioDesign) und einmal mit einer neu bestellten Charge des gleichen Polymers durchgeführt.

Zusätzlich wurden „Blindproben“ untersucht. Bei diesen wurde der Polyethylenblock nicht durch die beschriebene NHS-Ester-Kopplung, sondern direkt in der Festphasensynthese eingebaut. Diese interne Modifizierung von Oligonukleotiden ist durch die Verwendung des Spacer18-Phosphoramidits möglich (Abb. 43). Das Spacermolekül trägt die gleichen funktionellen Gruppen wie die in der Festphasensynthese verwendeten Nukleotidbausteine.

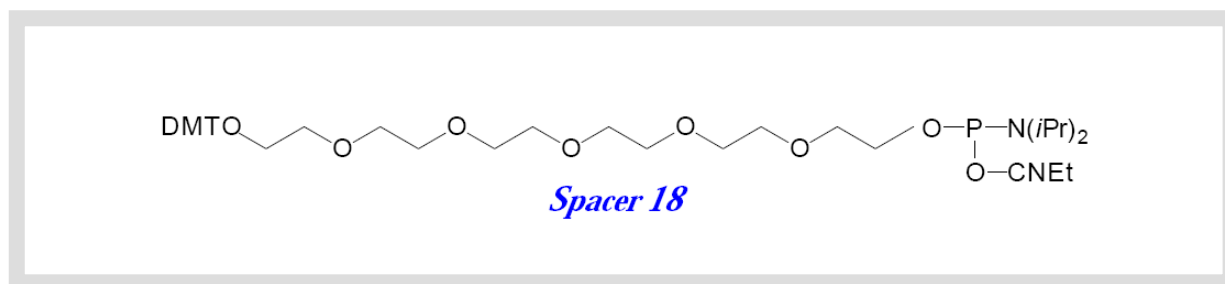


Abb. 43: Struktur des Spacer18-Phosphoramidits (Glen Research Corp.)

Der eigentliche Spacer besteht aus einem Polyethylenoxid mit sechs Wiederholungseinheiten. Durch zweifache Kopplung dieses Spacers wird also ein PEO-Block eingeführt, der mit dem verwendeten α -Amino- ω -hydroxypolyethylenoxid ($n = 12$) vergleichbar ist. Eine Probe der DNA-Sequenz S2, die am 5'-Ende zwei Spacer18-Einheiten mit endständiger OH-Gruppe trägt, wurden genau wie alle anderen Proben mit einer Lösung des Amino-dPEG₁₂TM-alkohols

in Dichlormethan mit 10 % Triethylamin behandelt. Eine zweite Probe wurde im gleichen Lösungsmittelgemisch ohne Polymer inkubiert. Anschließend erfolgte die Synthese der zweiten Oligonukleotidsequenz. Bei einer zusätzlichen Vergleichsprobe wurde die komplette Struktur, aus der Sequenz S2, zwei Spacer18-Einheiten und der Sequenz S1, direkt in einem Synthesesyklus hergestellt. Die Gelelektrophorese in Abb. 44 zeigt ganz deutlich, dass bereits die Inkubation der Probe im Lösungsmittelgemisch zu einer deutliche Störung der Synthese des zweiten Oligos führt.

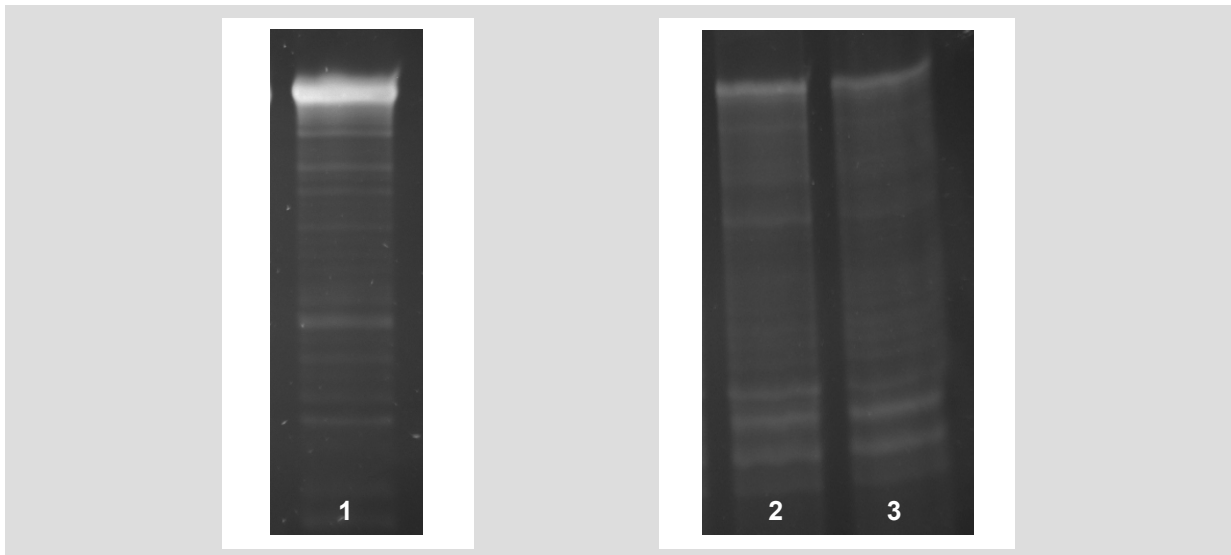


Abb. 44: Vergleichsprobe und Blindproben mit PEO-Blöcken aus zwei Spacer18-Einheiten: Die Vergleichsprobe (Spur 1), bei der die beiden DNA-Sequenzen und die PEG-Spacereinheiten in *einem* Synthesesyklus erzeugt wurden, zeigt eine gute Ausbeute an „Dreiblockstruktur“. Sowohl die Inkubation des Diblockcopolymers in einer Lösung des Amino-dPEG₁₂TM-alkohols (Spur 2), als auch die Inkubation im Reaktionsmedium ohne Polymer (Spur 3) führt zu einer deutlich schlechteren Ausbeute.

Eine mögliche Erklärung für die Störung der Festphasensynthese liegt in der bereits oben erwähnten basischen Natur der Aminogruppe des Amino-dPEG₁₂TM-alkohols bzw. des Triethylamins. Beide Spezies sind in der Lage die Schutzgruppe der Phosphateinheiten durch β -Eliminierung als Acrylonitril abzuspalten. Die Anwesenheit von freien Phosphatgruppen des ersten Oligonukleotids würde bei der Festphasensynthese des zweiten Oligos zu Störungen führen. Diese Interpretation wurde durch ein einfaches Experiment überprüft: Die erste DNA-Sequenz wurde ohne 5'-Funktionalisierung hergestellt. Das so erhaltene Oligonukleotid trägt am 5'-Ende eine OH-Gruppe und kann daher nicht mit dem Polyethylenoxidblock reagieren. Nach unterschiedlich langer Inkubation dieser Sequenz in einer Lösung des Amino-dPEG₁₂TM-alkohols in reinem Dichlormethan bzw. in einer Lösung von 10 % Triethylamin in Dichlormethan ohne PEO wurde die zweite Sequenz an die 5'-OH-Gruppe des ersten Oligos synthetisiert. Auch hier wurden zwei Blindproben und eine Vergleichsprobe hergestellt. Eine Blindprobe wurde in reinem Dichlormethan ohne Polymer inkubiert. Bei der anderen Blindprobe erfolgte keine Inkubation in Lösung aber die Probe wurde den gleichen

Waschschritten unterzogen, wie sie standardmäßig im Anschluss an die Kopplungsreaktion durchgeführt werden. Als Vergleichsprobe diente ein Oligonukleotid, bei dem beide Sequenzen im gleichen Syntheseyklus erzeugt wurden. In Abb. 45 ist klar zu erkennen, dass sowohl die Aminogruppe des PEOs (Abb. 45, links) als auch das Triethylamin (Abb. 45, mitte), mit zunehmender Inkubationszeit zu immer stärker ausgeprägten Fehlsequenzbanden kurz oberhalb der Bande des ersten Oligos führen. Der Einfluss des Triethylamins ist deutlich stärker, hier sind bereits nach 2 h vergleichbar intensive Fehlsequenzbanden zu sehen, wie sie im Falle der Aminogruppe des Polymers erst nach 2-7 d auftreten. Die Inkubation in reinem Dichlormethan und die durchgeführten Waschschritte haben keinerlei Auswirkungen auf die Qualität der zweiten Synthese (Abb. 45, rechts).

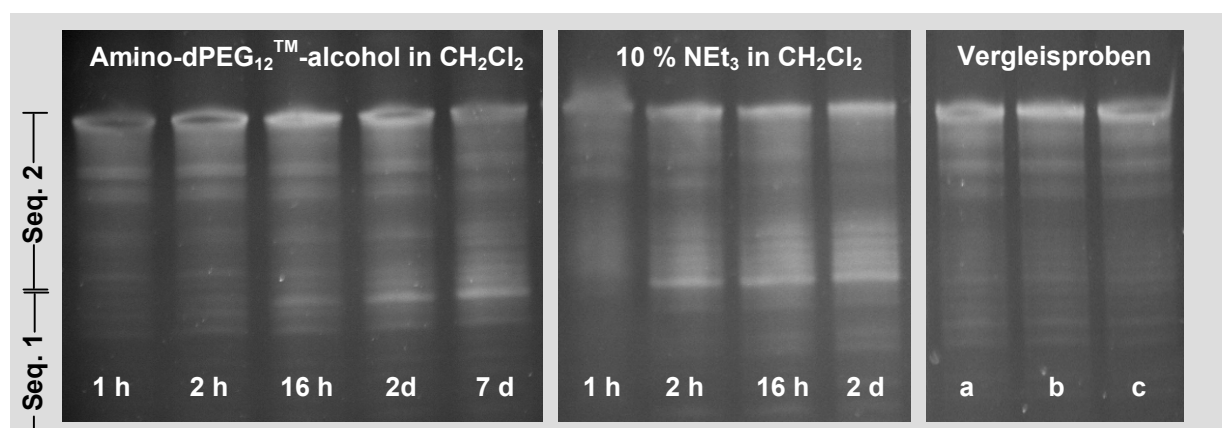


Abb. 45: Synthese des zweiten Sequenzabschnittes nach der Inkubation eines 5'-Hydroxy-Oligonukleotids in einer Lösung des Amino-dPEG₁₂TM-alkohols in Dichlormethan (links) bzw. in einer Lösung von 10 % Triethylamin in Dichlormethan (mitte). Die verschiedenen Inkubationszeiten sind am unteren Ende der jeweiligen Spur angegeben. Die Anwesenheit einer basischen Verbindung führt mit zunehmender Inkubationszeit zu immer stärker ausgeprägten Fehlsequenzen im Bereich kurz oberhalb des ersten Sequenzabschnittes. Die Inkubation des 5'-Hydroxy-Oligonukleotids in reinem Dichlormethan (b) bzw. die Durchführung verschiedener Waschschritte (c) zeigt keine Unterschiede zur Blindprobe (a) bei der beide Sequenzabschnitte im gleichen Syntheseyklus erzeugt wurden.

Die Störung der Oligosynthese am Diblockpolymeren scheint also tatsächlich durch die Freisetzung von Phosphatgruppen während der Kopplungsreaktion verursacht zu werden. Dieses Problem kann auf verschiedenen Wegen gelöst werden. Eine Möglichkeit wäre die Verwendung einer anderen Schutzgruppe am Phosphat. In diesem Fall müssten jedoch die Reaktionsbedingungen in der Festphasensynthese angepasst werden. Deutlich einfacher sind die beiden anderen Möglichkeiten: Sowohl eine Verkürzung der Reaktionszeit bei der Kopplung des Polymers mit der ersten DNA-Sequenz als auch die Kopplung in reinem Dichlormethan ohne den Zusatz von Triethylamin sollten dazu führen, dass weniger Schutzgruppen abgespalten werden*. Die Ergebnisse der entsprechenden Experimente mit einem α -Amino- ω -hydroxypolyethylenoxid ($n = 16$) sind in Abb. 46 gezeigt. Nach einer

* Die Optimierung der Reaktionsbedingungen und die Anwendung des Syntheseweges auf ein polydisperses PEO mit höherer Molmasse wurden in Zusammenarbeit mit Tina Kiefer durchgeführt.

Reaktionszeit von 2 h ist die Kopplungsreaktion noch nicht vollständig. Die Ergebnisse mit und ohne Triethylamin in der Reaktionslösung sind identisch (Abb. 46, „M4-PEG16 nach 2 h Reaktionszeit“). Nach 17 h ist die Kopplung in reinem Dichlormethan quantitativ (Abb. 46, „M4-PEG16 nach 17 h Reaktionszeit“). Die verbleibende Bande auf Höhe der verwendeten DNA-Sequenz ist der nicht funktionalisierte Anteil des Oligonukleotids, der nicht an der Reaktion teilnehmen kann. In Anwesenheit von Triethylamin hat sich die Ausbeute aufgrund der verlängerten Reaktionszeit nicht mehr verändert. Dieses Ergebnis scheint zunächst etwas erstaunlich, da Triethylamin ein typischer Katalysator für die Umsetzung von NHS-Estern in organischen Medien ist. Im Zusammenhang mit den hier besprochenen Nebenreaktionen ist der Befund aber durchaus erklärbar: Jedes Oligonukleotid trägt 24 Phosphatgruppen aber nur eine 5'-Funktionalisierung. Wenn ein großer Teil der Phosphatschutzgruppen abgespalten wird liegen diese im Vergleich zur Succinimidylgruppe des Oligos in rund zwanzigfachem Überschuss vor. Hinzu kommt, dass die abgespaltenen Schutzgruppen in Lösung vorliegen, wodurch die Reaktion mit der primäre Aminogruppe des PEOs weiter begünstigt wird. Es ist daher möglich, dass in Anwesenheit des Triethylamins ein großer Anteil der Aminogruppen des PEOs durch die Addition an Acrylonitril blockiert werden und somit die Ausbeute der Kopplungsreaktion stark herabgesetzt wird.

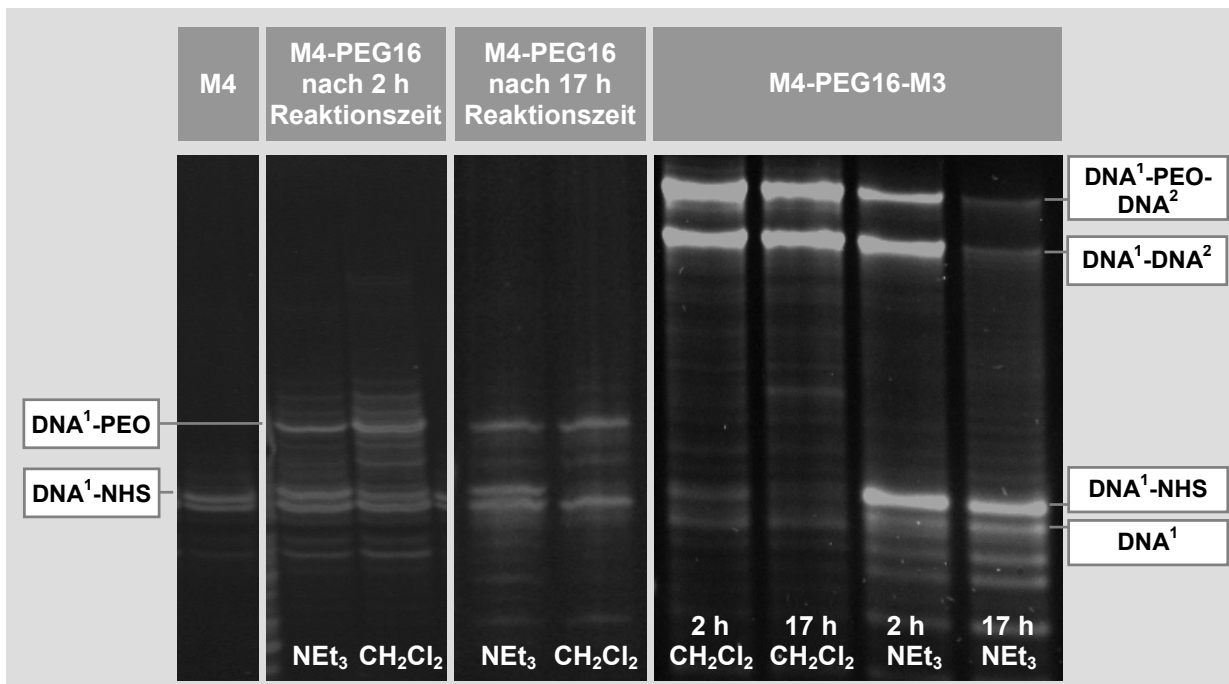


Abb. 46: Einfluss der Reaktionszeit und der Zugabe von Triethylamin im ersten Kopplungsschritt auf die Festphasensynthese des zweiten Oligonukleotids. Die verwendete Sequenz M4 zeigt die beiden Banden des funktionalisierten und nicht funktionalisierten Oligos. Nach einer Reaktionszeit von 2 h in Dichlormethan + 10 % Triethylamin („NEt₃“) bzw. in reinem Dichlormethan („CH₂Cl₂“) ist die Umsetzung noch nicht quantitativ. 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 DNA-Sequenz (Abb. 46, „M4-PEG16-M3“) bestätigen sehr schön die beschriebenen Zusammenhänge. An den beiden Proben, die in Dichlormethan gekoppelt wurden, ist die Festphasensynthese erfolgreich. Die Tatsache, dass hier zwei Banden im Bereich des Triblockcopolymers auftreten wird dadurch verursacht, dass der nicht funktionalisierte Anteil der verwendeten Sequenz (M4) ebenfalls eine 5'-OH-Gruppe trägt und somit in der Festphasensynthese verlängert wird. Die beiden Banden entsprechen also dem erwünschten Triblockcopolymer und der DNA-Sequenz M4-M3 ohne PEO-Block. Die Proben, bei denen Triethylamin in der Kopplungsreaktion zugesetzt wurde, zeigen deutliche Unterschiede in der Qualität der zweiten DNA-Synthese in Abhängigkeit von der Reaktionszeit des ersten Kopplungsschritts. Nach einer Kopplungsreaktion von 2 h wird noch ein deutlicher Anteil des Triblockcopolymers gebildet. Nach 17 h ist die erste DNA-Sequenz offenbar so stark entschützt, dass die Synthese der zweiten Sequenz überhaupt nicht mehr möglich ist. Bei diesen beiden Proben ist die Bande auf Höhe der verwendeten DNA-Sequenz M4 auf den nicht gekoppelten succinimidylfunktionalisierten Anteil des Oligos zurückzuführen. Aufgrund der 5'-Funktionalisierung können diese Moleküle in der zweiten Synthese nicht verlängert werden. Die hier besprochenen Ergebnisse liefern also einen direkten Beweis für die Zuordnung der beiden Banden auf Höhe der Sequenz M4, zu den funktionalisierten und nicht funktionalisierten Anteilen des Oligonukleotids.

Mit den so gewonnenen Erkenntnissen wurde versucht die Synthese des Dreiblockpolymers auf Polyethylenoxide mit höherer Molmasse zu übertragen. Hier sind monodisperse Polymere nicht mehr zugänglich. Es können aber α -Amino- ω -hydroxypolyethylenoxide verwendet werden, die über anionische Polymerisation gewonnen wurden und deshalb eine recht enge Molmassenverteilung haben. Das eingesetzte PEO hat eine mittlere Molmasse von 3400 g/mol ($n \approx 77$), bei einer Polydispersität von 1,028. Die Ergebnisse der Kopplungsreaktion und der Synthese zum Dreiblock sind in Abb. 47 gezeigt. Auch mit dem deutlich größeren PEO wird eine annähernd quantitative Kopplung erreicht. Die Bande des Zweiblocks ist aufgrund der Molmassenverteilung des verwendeten Polymers verbreitert. Durch die Synthese der zweiten Oligonukleotidsequenz verschiebt sich die Bande in einen Größenbereich, in dem die Auflösung der Gelelektrophorese geringer wird. Dadurch erfolgt eine Fokussierung der Bande. Die Verschiebung und Fokussierung der Bande ist gerade ausreichend, damit sich die Banden der Di- und Triblockcopolymeren nicht überlagern.

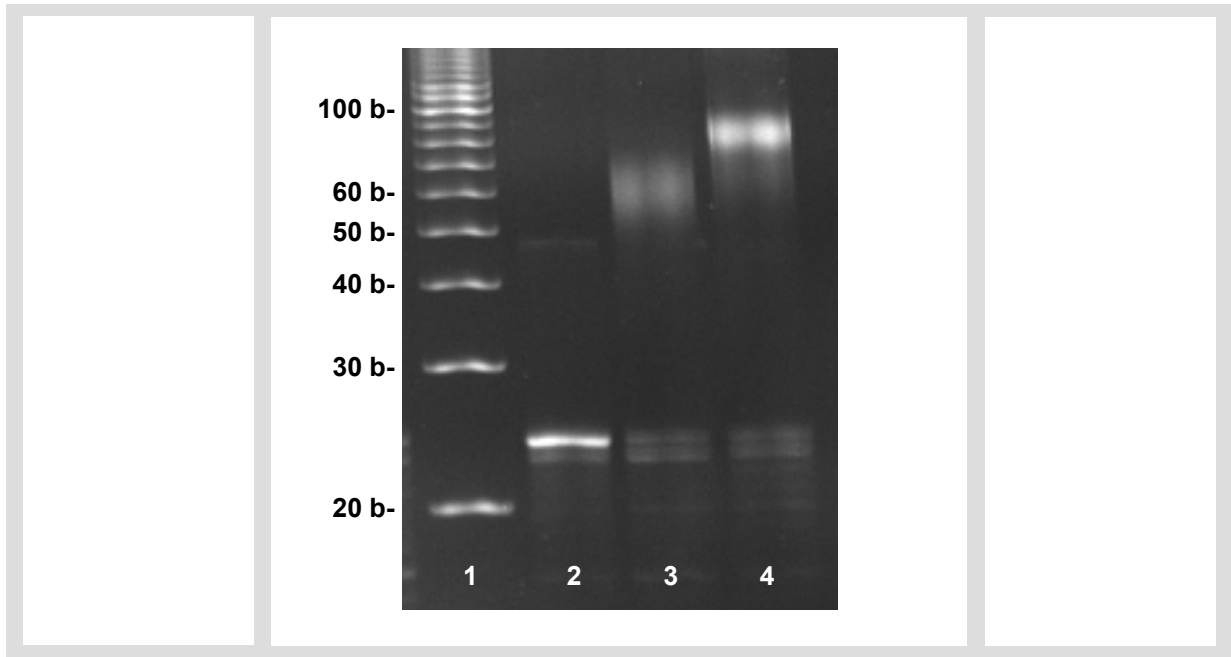


Abb. 47: Synthese eines Triblockcopolymers mit einem polydispersen α -Amino- ω -hydroxy-polyethylenoxid (Sunbright HO-034PA, NOF Corporation, $M_w = 3400$ g/mol, PD = 1,028). Spur 1: 10 bp-Marker, Spur 2: funktionalisiertes Oligo (DNA¹), Spur 3: Diblockcopolymer (DNA¹-PEO-OH), Spur 4: Triblockcopolymer (DNA¹-PEO-DNA²).

Der Einfluss des Polyethylenoxidblocks auf die elektrophoretische Mobilität des Zweiblockpolymers skaliert in etwa linear mit der Molmasse. In Abb. 40 ist gut zu erkennen, dass die Kopplung mit einem PEO mit 12 Wiederholungseinheiten die Bande der ersten DNA-Sequenz um 7 Basen verschiebt (DNA¹ \triangleq 23 Basen, DNA¹-PEO12 \triangleq 30 Basen). Die Bande des in Abb. 47 gezeigte Diblockcopolymers liegt bei etwa 60 Basen. Bei einem linearen Zusammenhang mit der Molmasse des Polymers würde man die Bande des Diblocks bei 68 Basen erwarten.

3.1.6 Zusammenfassung und Ausblick

Der Schlüsselpunkt für die gezielte Synthese von Triblockcopolymeren, die aus zwei verschiedenen Oligonukleotiden und einem synthetischen Polymer aufgebaut sind, liegt in der Adressierbarkeit der beiden Enden des synthetischen Blocks. Im ersten Syntheseansatz wurde dies durch die Verwendung eines einseitig geschützten α,ω -Diaminopolyethylenoxids erreicht. Die Umsetzung der freien Aminogruppe des PEOs mit der Succinimidylesterfunktion des trägergebundenen 5'-modifizierten Oligos führt in Dichlormethan zu einer quantitativen Blockkopplung. In anderen Lösungsmitteln ist die Reaktion deutlich weniger effektiv:

Na ₂ HPO ₄ / NaH ₂ PO ₄ -Puffer (0,2 M / pH 7,2) + 20 % DMF:	Ausbeute ca. 60 %
Formamid + 10 % Triethylamin:	Ausbeute ca. 30 %

Die Kopplung des so erhaltenen Diblockcopolymeren mit der zweiten trägergebundenen Oligonukleotidsequenz kann aufgrund des Löslichkeitsverhaltens der Hybridstruktur nicht in Dichlormethan durchgeführt werden. Der im ersten Kopplungsschritt eingesetzte zwanzigfache Überschuss der Aminokomponente ist ebenfalls nicht praktikabel, da das DNA-PEO-Diblockcopolymer die Aminokomponente im zweiten Kopplungsschritt darstellt und somit die zwanzigfache Menge des ersten Oligonukleotids erforderlich wäre. Außerdem ist die maximale Konzentration der Reaktionslösung mit der minimalen Anzahl an Äquivalenten des Diblockcopolymeren verknüpft, da ein gewisses Mindestvolumen an Reaktionslösung erforderlich ist. Wenn bei einer Konzentration von 60 mM, wie bei der ersten Kopplung in Dichlormethan gearbeitet werden soll, sind mindestens 4,3 Äq. des Diblockcopolymeren erforderlich. Die Kopplung mit der zweiten DNA-Sequenz liefert in Natriumphosphatpuffer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer (0,2 M / pH 7,2) + 20 % DMF) Ausbeuten von lediglich 10 %.

Aufgrund der schlechten Ausbeute der zweiten Kopplungsreaktion wurde der Syntheseweg modifiziert. In diesem Fall wird die Asymmetrie durch die Verwendung eines heterobifunktionellen α -Amino- ω -hydroxypolyethylenoxids eingeführt. 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 Triblockcopolymeren 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. Diese Nebenreaktion könnte auch eine Erklärung für die schlechten Ausbeuten der Kopplungsreaktionen zwischen dem aminofunktionalisierten Diblockcopolymer und der zweiten DNA-Sequenz liefern: Bei den verwendeten Proben wurde die Reaktionszeit des ersten Kopplungsschrittes auf 3 bzw. 6 d erhöht. Wenn in dieser Zeit eine verstärkte Abspaltung der Phosphatschutzgruppen erfolgt, kann die freie Aminogruppe des Diblockcopolymeren durch eine Addition an das gebildete Acrylonitril blockiert werden. Prinzipiell kann auch die Transamidierung bei längeren Reaktionszeiten als Nebenreaktion auftreten. Durch die sehr große Zahl an DNA-Signalen im NMR-Spektrum ist der Nachweis dieser Nebenreaktionen am Diblockcopolymer nicht trivial.

Der optimierte Syntheseweg konnte erfolgreich auf ein polydisperses α -Amino- ω -hydroxypolyethylenoxid mit einer höheren mittleren Molmasse (3400 g/mol, PD =1,028) übertragen werden. Die geänderte Synthesestrategie bietet einige generelle Vorteile: Die Umsetzung zum Triblockcopolymer erfolgt weitgehend quantitativ, die Schutzgruppenchemie am Polymer ist nicht mehr notwendig und sowohl die Transamidierung als auch die Addition des Acrylonitrils an das Diblockcopolymer sind als Nebenreaktionen nicht mehr möglich, da der Zweiblock keine Aminogruppe trägt. Die Umsetzung zum Triblockcopolymer ist außerdem nicht mehr auf wässrige Medien beschränkt. Dadurch sollte der Syntheseweg auch auf andere, nicht wasserlösliche Polymere übertragbar sein und ist somit deutlich universeller einsetzbar. Der einzige Nachteil liegt in der Bildung von Fehlsequenzen bei der Synthese des zweiten Oligos, die nur über eine präparative Gelelektrophorese abgetrennt werden können.

Die Modifizierung der Synthese bietet zusätzlich eine konzeptionelle Variationsmöglichkeit: Bei der zweifachen Kopplung sind beide Oligonukleotide über das 5'-Ende an das Polymer gebunden. Die DNA-Sequenzen sind dadurch gegensinnig orientiert. Durch die Kombination von Kopplung und Festphasensynthese wird ein Oligo am 5'-Ende, das andere jedoch am 3'-Ende mit dem Polymer verknüpft. Durch die resultierende gleichsinnige Orientierung der Oligos besteht die Möglichkeit zwei Triblockcopolymere durch Hybridisierung an eine Hilfssequenz und anschließende Ligation kovalent miteinander zu verbinden (Abb. 48). Bei antiparalleler Orientierung führt die Verknüpfung über Hilfssequenzen zu einer Geometrie die keine kovalente Fixierung der Struktur zulässt.

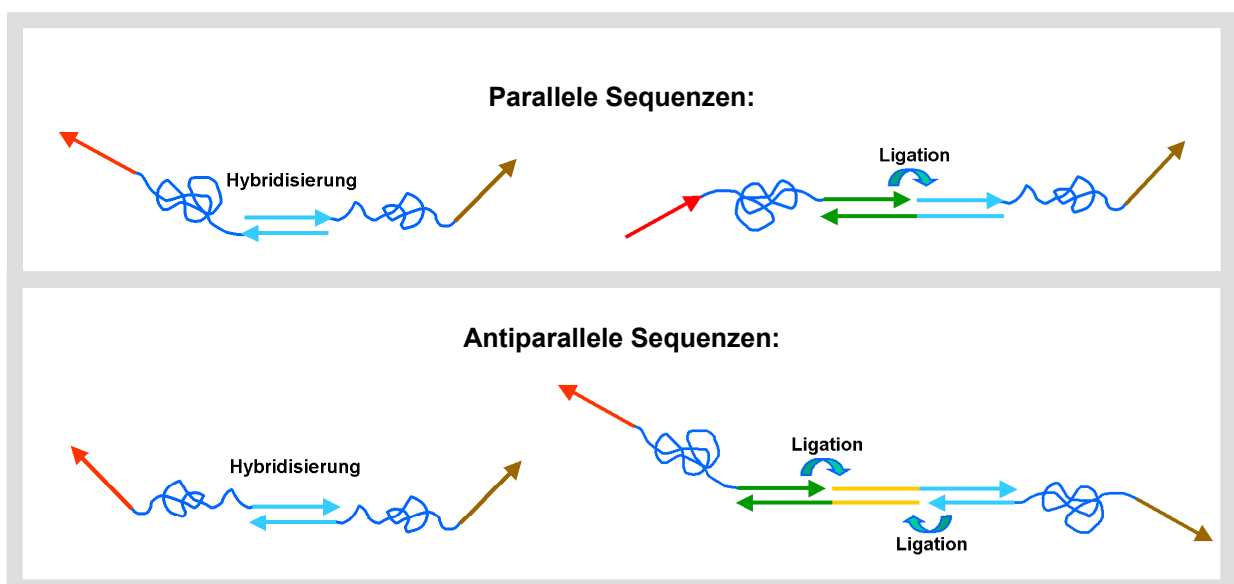


Abb. 48: In Abhängigkeit von der Orientierung der DNA-Sequenzen bieten Triblockcopolymere unterschiedliche Möglichkeiten zur Strukturbildung. Bei der Verwendung von Hilfssequenzen können Triblockcopolymere mit parallelen DNA Sequenzen durch Ligation kovalent miteinander verknüpft werden. Bei antiparallelen Sequenzen ist diese Möglichkeit nicht gegeben. In diesem Fall ist nur eine Verknüpfung durch Hybridisierung möglich.

Bei einer kovalenten Verknüpfung der Dreiblockstrukturen sollte es möglich sein, die Längen der Oligonukleotide deutlich zu reduzieren, da die Hybridisierung nur noch für die selektive Ligation erforderlich ist und keine langzeitige Stabilität bei RT gewährleisten muss. Für eine weitgehend quantitative Ligation sind bereits 4-6 Basen ausreichend. Bei kürzeren Oligonukleotiden entstehen deutlich weniger Fehlsequenzen. Bei einer stufenweisen Kopplungsausbeute von 99 % enthält ein 23-mer 21 mol% Fehlsequenzen, ein Tetramer enthält hingegen nur knapp 4 mol%. Die Aufarbeitung der Triblockcopolymeren über denaturierende PAGE wäre so evtl. nicht mehr erforderlich, wodurch große Probenmengen deutlich einfacher zugänglich werden.

Mit diesem Ansatz wäre es außerdem möglich Pentablockcopolymeren durch Denaturierung der ligierten Strukturen zu erzeugen (Abb. 49). Diese Verbindungen würden ganz neue Möglichkeiten zur Strukturbildung bieten, da die Verknüpfung mit anderen Molekülen sowohl über die beiden endständigen Sequenzen, als auch über den mittleren ssDNA-Block möglich wäre. Lineare Strukturen aus Pentablockcopolymeren, wie sie im unteren Teil von Abb. 49 gezeigt sind sollten eine deutlich höhere Stabilität zeigen, als vergleichbare Strukturen bei denen die DNA-Fragmente jeweils nur über einen Polymerblock verknüpft sind. Bei der Verknüpfung über einzelner Polymerblöcke führt bereits die Denaturierung von einem einzelnen DNA-Fragmente zum Bruch der linearen Struktur. Bei doppelter Verknüpfung müssen hingegen alle DNA-Fragmente gleichzeitig denaturiert werden.

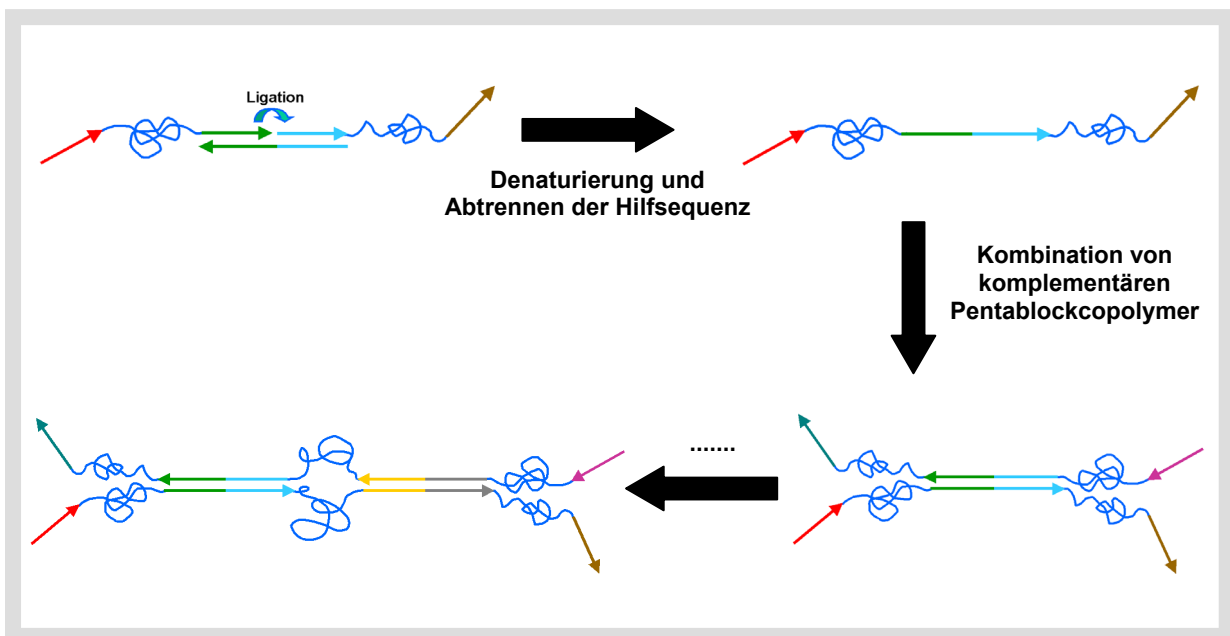


Abb. 49: Beispiel einer Strukturbildung aus Pentablockcopolymeren. Die parallele Anordnung der beiden DNA-Sequenzen im Triblockcopolymer bietet die Möglichkeit zwei verschiedene Dreiblocke nach der Hybridisierung an eine Hilfssequenz durch Ligation kovalent miteinander zu verknüpfen. Durch Denaturierung und Abtrennen der Hilfssequenz sind auf diesem Weg Pentablockcopolymeren zugänglich.

3.2 Lineare DNA-Strukturen aus Oligonukleotiden

Neben den biosynthetischen Blockcopolymeren sollen doppelsträngige DNA Fragmente mit überstehenden Enden hergestellt werden, die sich als semiflexible Bausteine in supramolekulare Strukturen integrieren lassen. Der einfachste Weg zur Erzeugung von Doppelstrangsegmenten mit überhängenden Enden ist die Kombination von komplementären Oligonukleotiden. Der große Vorteil bei der Verwendung synthetischer Oligonukleotide liegt in der vollständigen Kontrolle über den Aufbau der Sequenz. Dadurch können die Längen und die Basenabfolge der Doppelstrangsegmente und der sticky-ends in einem gewissen Rahmen frei variiert werden. Durch geeignete Wahl der Oligonukleotide können die sticky-ends sowohl am 5'-Ende als auch am 3'-Ende erzeugt werden. Außerdem ist es möglich an beliebigen Stellen die Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen einzuführen, die eine enzymatische Modifikation der gebildeten Strukturen ermöglichen. Kommerzielle Syntheseverfahren sind mittlerweile soweit fortgeschritten, dass die benötigten Oligonukleotide im großen Maßstab relativ preiswert hergestellt werden können. Ein Nachteil der Verwendung von synthetischen Oligonukleotiden liegt in der Beschränkung des zugänglichen Größenbereichs. Die maximale Länge von synthetischen Oligos liegt in der Regel bei etwa 100-140 Basen [138, 139]. Hochspezialisierte Verfahren ermöglichen die Kopplung von bis zu 300 Nukleotiden [140].

3.2.1 Verknüpfung von kleinen dsDNA-Segmenten über Polyethylenoxid-Linker

Zum Testen des Konzepts wurde ein System aus drei Doppelstrangfragmenten von 37 bp mit überstehenden Enden von jeweils 23 Basen entworfen, die über Triblockcopolymere miteinander verknüpft werden. Die Komplexität des Systems kann durch eine symmetrische Anordnung der beteiligten Sequenzen minimiert werden. Dadurch sind für die in Abb. 50 gezeigte supramolekulare Struktur lediglich vier verschiedene Oligonukleotide und ein Triblockpolymer erforderlich.

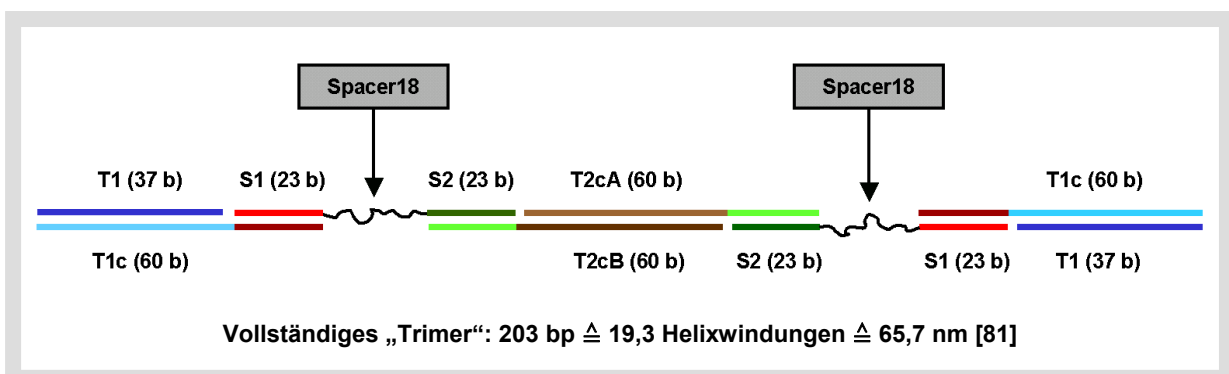


Abb. 50: Aufbau einer linearen Struktur aus Oligonukleotiden. Durch die symmetrische Anordnung der Sequenzen werden nur vier verschiedene Oligos und ein Triblockcopolymer benötigt. Die gebildeten Doppelstrangfragmente haben jeweils 60 bp und überstehenden Enden mit einer Länge von 23 Basen. Die PEO-Blöcke ($n = 6$) wurden in der Festphasensynthese der Oligos eingeführt.

Zu dieser Zeit war die im letzten Abschnitt beschriebene Synthese des Triblockcopolymeren noch nicht optimiert. Aus diesem Grund wurden die beiden Sequenzen des verwendeten Hybridmoleküls über einen Spacer¹⁸ miteinander verknüpft (Spacer¹⁸: PEO mit $n = 6$, vgl. Abschnitt 3.1, Abb. 43). Die vollständige Struktur besteht aus 203 bp und zwei Spacermolekülen. Unter Vernachlässigung der beiden Spacer entspricht dies einer Konturlänge von ca. 66 nm. Wie bereits in Abschnitt 2.8 erläutert, ist es wichtig, dass die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide so gewählt werden, dass keine unerwünschten Basenpaarungen auftreten. Die Sequenzen S1 und S2 stammen aus einer bereits experimentell überprüften Bibliothek von U. Feldkamp et al. [141]. Alle anderen Sequenzen wurden aus einer DNA-Struktur übernommen, die von Tong Wang im Arbeitskreis von Prof. Dr. N. C. Seeman entworfen wurde. Die Überprüfung der Oligonukleotide auf unerwünschte komplementäre Sequenzabschnitte erfolgte mit einem Excel Makro („Sequin Mismatch Decoder“, programmiert im Arbeitskreis von Prof. Dr. N. C. Seeman, New York University). In der gesamten Struktur ist für jeden Sequenzabschnitt von fünf oder mehr Basen nur eine eindeutige komplementäre Stelle enthalten. Der genaue Aufbau der Oligonukleotidsequenzen ist im Anhang zu finden.

Da es sich hier um eine sehr einfache supramolekulare DNA-Struktur handelt, wurde zunächst versucht die Hybridisierung mit („Trityl-On“) HPLC-gereinigten Oligonukleotiden durchzuführen. Die Kombination von jeweils zwei Oligonukleotiden führt zu einer mehr oder weniger vollständigen Doppelstrangbildung. Die Mischung von allen vier Oligos mit dem Dreiblockpolymer zeigt jedoch ein stark verschmiertes Signal (Abb. 51). Die Ergebnisse sind unabhängig davon, ob die einzelnen Komponenten lediglich bei RT zusammengegeben werden oder ob die Mischung auf 60°C erwärmt und anschließend langsam abgekühlt wird.

Das Oligonukleotid T2cA zeigt nach dem Erwärmen auf 60°C eine zusätzliche Bande mit verminderter Mobilität, obwohl die stabilste Sekundärstruktur ($\Delta G = -6,4$ kcal/mol) nur zwei Hairpins aufweist, die über lediglich drei bzw. fünf Basen zusammengehalten werden. Bei einer Selbstdimerisierung erwartet man eine noch deutlichere Retardation der Bande. Außerdem liegt auch hier die freie Enthalpie der stabilsten Struktur ($\Delta G = -8,35$ kcal/mol) deutlich niedriger als die des Heterodimers mit dem vollständig komplementären Strang ($\Delta G = -112,67$ kcal/mole). Thermodynamisch betrachtet sollten daher die beiden Alternativstrukturen keine Rolle spielen. Trotzdem tritt die zusätzliche Bande auch in der Mischung von T2cA mit dem komplementären Oligo T2cB auf, wenn der Ansatz auf 60 °C erwärmt und langsam abgekühlt wurde.

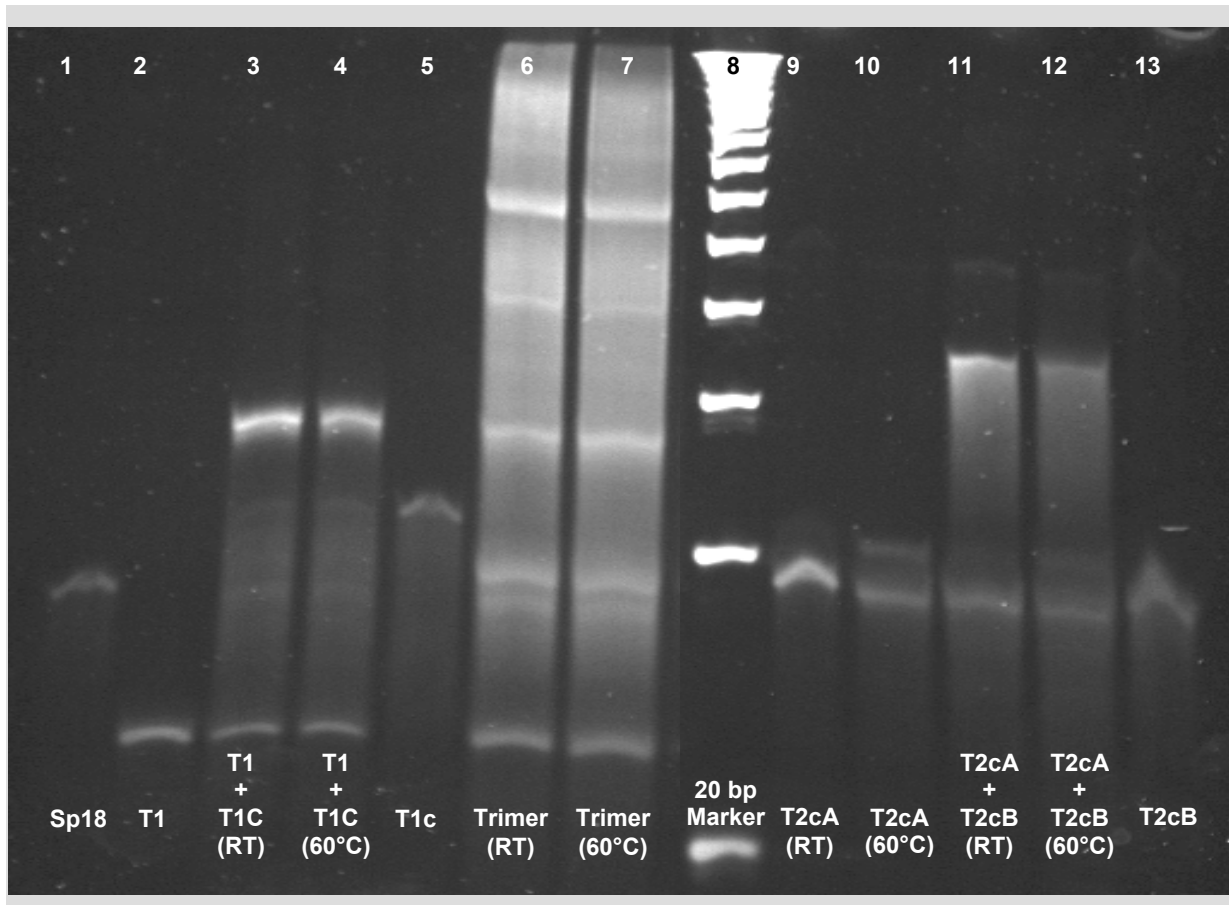


Abb. 51: Hybridisierungsversuche mit („Trityl-On“) HPLC-gereinigten Oligonukleotidsequenzen. (10 % Polyacrylamidgel in TBE-Puffer.) Die Kombination von jeweils zwei Oligos führt zu einer weitgehend vollständigen Doppelstrangbildung. Die „Trimer-Mischung“ von allen vier Oligos und dem Hybridmolekül liefert hingegen ein stark verschmiertes Signal. Die Ergebnisse der Hybridisierungsexperimente sind weitgehend unabhängig davon, ob die einzelnen Komponenten bei RT zusammengegeben werden oder ob die Mischungen auf 60°C erwärmt und langsam abgekühlt wird. Das Oligonukleotid T2cA zeigt jedoch nach dem Erwärmen eine zusätzliche Bande mit verminderter Mobilität. (Sp18 steht für die Hybridstruktur aus zwei DNA-Sequenzen mit jeweils 23 Basen, die über einen Spacer18 miteinander verknüpft sind.)

Das stark verschmierte Signal der vollständigen „Trimermischung“ zeigt, dass die Reinigung über HPLC offenbar nicht ausreicht, um eine klar definierte Strukturbildung zu ermöglichen. In einem Wiederholungsexperiment wurden daher die Fehlsequenzen über eine denaturierende PAGE abgetrennt. Zuvor wurden alle Oligonukleotide noch einmal über Nacht in ammoniakalischer Lösung erwärmt, um sicher zu gehen, dass keine Schutzgruppen mehr an die Basen der verwendeten Sequenzen gebunden sind. Die so gereinigten Proben wurden bei unterschiedlichen Konzentrationen in TAE- bzw. HEPES-Puffer hybridisiert. Neben einer Stammlösung, die alle Oligonukleotide im stöchiometrischen Verhältnis enthält, wurden zwei weitere Stammlösungen mit 0,5 Äq. T1 bzw. ohne T1 angesetzt. Eine der Proben in TAE-Puffer wurde „langsam“, d.h. über Nacht von 90°C auf RT abgekühlt. Bei allen anderen Proben wurde eine „schnelle“ Hybridisierung durchgeführt (5 min 90°C / 20 min 70°C / 20 min 50°C / 20 min 40°C / 20 min RT). Ein Vergleich von Abb. 52 und Abb. 51 zeigt welchen drastischen Einfluss die Fehlsequenzen auf den Erfolg der Strukturbildung ausüben.

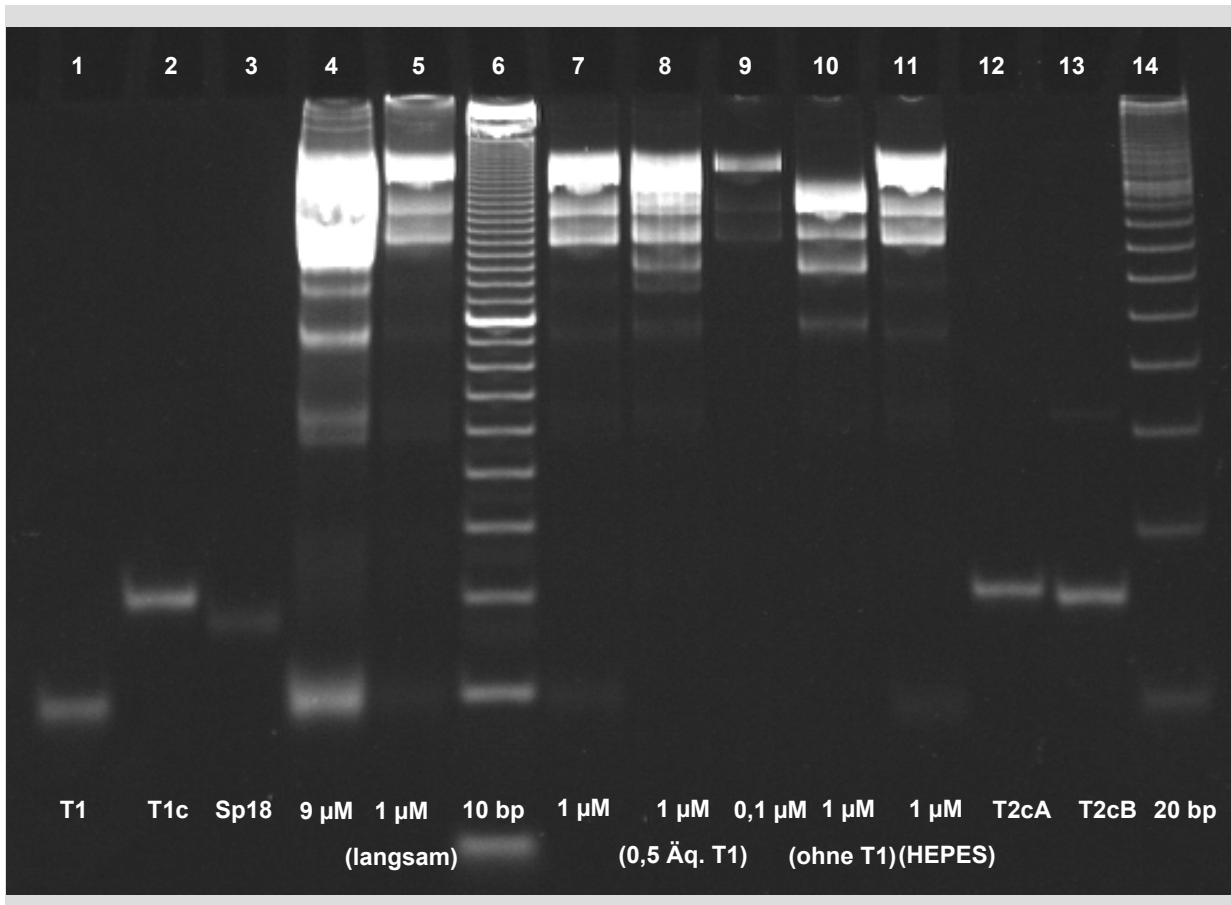


Abb. 52: Strukturbildung mit PAGE-gereinigten Oligonukleotiden (native PAGE, 10 % PAA). Auf den Spuren 1, 2, 3, 12 und 13 sind die verwendeten Oligos einzeln aufgetragen. Die Spuren 4, 5, 7, 9 und 11 zeigen die Hybridisierungsergebnisse der stöchiometrischen Mischungen, bei verschiedenen Konzentrationen in TAE- bzw. HEPES-Puffer. Die Mischung von Spur 8 enthält nur 0,5 Äq T1, Spur 10 zeigt die Hybridisierung der Stammlösung ohne T1. Die Probe auf Spur 5 wurde „langsam“, d.h. über Nacht von 90 °C auf RT abgekühlt. Bei allen anderen Proben wurde eine „schnelle“ Hybridisierung durchgeführt (5 min 90 °C / 20 min 70 °C / 20 min 50 °C / 20 min 40 °C / 20 min RT).

Mit den PAGE gereinigten Proben werden klar definierte scharfe Banden erhalten. In den stöchiometrischen Mischungen (Abb. 52, Spuren 4, 5, 7, 9 und 11) werden unabhängig vom Temperaturprogramm, dem verwendeten Puffer bzw. der Konzentration, neben der Hauptbande bei ca. 250 bp zwei Nebenprodukte mit etwas höherer Mobilität gebildet. Die Annahme, dass die oberste Bande die vollständige Zielstruktur repräsentiert, ist zunächst noch spekulativ. Aus dem Vergleich mit der Markerspur kann nicht exakt auf die Größen der gebildeten Strukturen geschlossen werden, da die flexiblen PEO-Einheiten das Laufverhalten der supramolekularen Strukturen beeinflussen. Eine exakte Zuordnung der Banden ist jedoch durch Beimischexperimente möglich. Hierfür wurde die vollständige stöchiometrische Mischung mit einem Überschuss verschiedener Oligonukleotide versetzt und erneut hybridisiert. Zur besseren Übersicht sind die verschiedenen Strukturen, die den Banden in Abb. 53 zugeordnet werden können in Abb. 54 schematisch dargestellt. Die orangen Ziffern in Abb. 53 geben die Zuordnung der jeweiligen Banden an. Am unteren Ende von jeder Spur ist die Zusammensetzung der Probenlösung in weißer Schrift vermerkt.

3 Ergebnisse und Diskussion

Auf Spur 4 (Abb. 53) ist die gleiche stöchiometrische Stammlösung (SL) wie in Abb. 52, Spur 7 noch einmal aufgetragen. Die Zugabe von T1 (Spur 5) führt zu keiner Veränderung des Bandenmusters im hochmolekularen Bereich. Die Zugabe von T1 und T1c (Spur 6) zeigt jedoch, dass die Bande direkt unterhalb des Hauptproduktes verschwindet. Die entsprechende Struktur *F* wurde zu *G* vervollständigt. Die Zugabe von T1, T1c und Sp18 (Spur 8) führt zur Vervollständigung des anderen Nebenproduktes. Bei dem zweiten Nebenprodukt muss es sich demnach um die Struktur *E* handeln. Bei dieser Probe ist es aber erstaunlich, dass die Nebenproduktbande *F* unverändert bestehen bleibt, obwohl die zur Bildung der vollständigen Struktur erforderlichen Sequenzen (T1 und T1c) im Überschuss vorliegen und der gesamte Ansatz während der Hybridisierung noch einmal für 5 min auf 90 °C erhitzt wurde. Offenbar ist es für das System günstiger die beiden Stränge T1 und T1c an ein Sp18-Molekül zu binden, anstatt die Struktur *F* durch T1 und T1c zur Zielstruktur zu vervollständigen und dafür einen Teil der Sp18-Moleküle in nicht hybridisierter Form zu belassen.

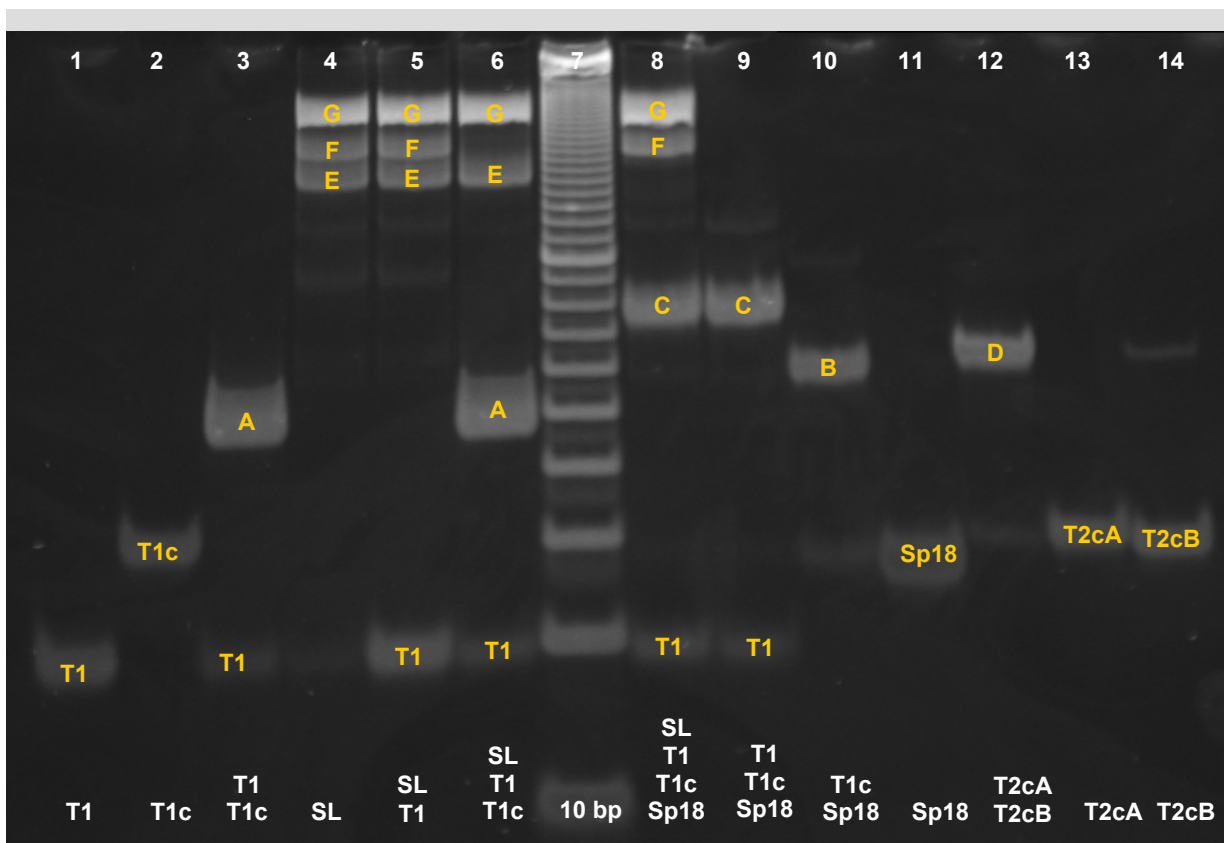


Abb. 53: Zuordnung der Banden im hochmolekularen Bereich durch Beimischexperimente (native PAGE, 10 % PAA). Die Zuordnung der einzelnen Banden ist in orange vermerkt, die Zusammensetzung der Proben ist am unteren Ende der jeweiligen Spur in weißer Schrift angegeben. Die stöchiometrische Stammlösung (SL) wurde mit einem Überschuss an T1 (Spur 5), T1 + T1c (Spur 6) bzw. T1 + T1c + Sp18 (Spur 8) versetzt. Durch die Zugabe von T1 tritt keine Veränderung ein. Bei Zugabe von T1 und T1c verschwindet die Nebenproduktbande *F*. Das gleiche gilt für die Bande *E*, wenn T1, T1c und Sp18 der Stammlösung beigemischt werden.

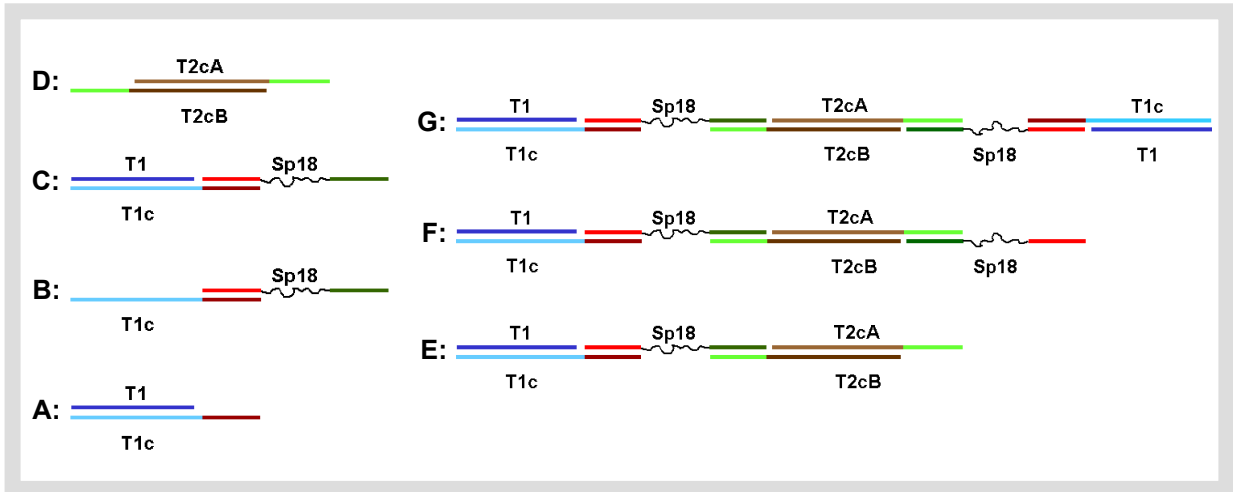


Abb. 54: Bezeichnungen und Aufbau der Strukturen, die den Banden in Abb. 53 zugeordnet werden können.

Rund 75 % der Oligonukleotide sind in der Zielstruktur gebunden. Die restlichen 25 % verteilen sich annähernd gleichmäßig auf die beiden Nebenprodukte. In Verbindung mit der Zuordnungen der Banden zu den Strukturen *E* und *F* bedeutet dieses Ergebnis, dass die Stammlösung ca. 13 % zu wenig Sp18 und rund 25 % zu wenig T1 und T1c enthält. Für eine Erklärung durch ungenaues Pipettieren oder apparative Fehler in den UV-Absorptionsmessungen sind diese Abweichungen deutlich zu groß. Die Fehler in der Konzentrationsbestimmung, aufgrund von Unsicherheiten in den Extinktionskoeffizienten von Oligonukleotiden ohne besondere Sequenzsymmetrie, sollten ebenfalls im Bereich von wenigen Prozent liegen (vgl. Abschnitt 2.9). Die genauen Zusammenhänge zwischen dem Aufbau der Sequenzen und den Abweichungen vom mittleren Extinktionskoeffizienten sind aber bisher noch nicht verstanden. Als alternative Erklärungen kommen eigentlich nur sehr subtile Zusammenhänge in Frage, wie z.B. Konzentrationsverluste durch die Adsorption der Oligos an die Gefäßwand, eine ungenügende Durchmischung nach dem Auftauen der Proben oder eine Verunreinigung durch UV-aktive Substanzen. Eine derartige Verunreinigung sollte allerdings im UV-Spektrum erkennbar sein. Prinzipiell wäre es aber auch denkbar, dass die Nebenprodukte nicht durch eine falsche Stöchiometrie sondern durch eine unvollständige Hybridisierung gebildet werden. Wenn sich die restlichen Oligonukleotide auf ausreichend viele Alternativstrukturen verteilen, sind diese evtl. nicht mehr in der Gelelektrophorese nachweisbar. Ein mögliches Kontrollexperiment wäre unter Einsatz von radioaktiv markierten Oligonukleotiden denkbar. Durch die Untersuchung von stöchiometrischen Mischungen, in denen jeweils nur eines der Oligos radioaktiv markiert ist, sollte es möglich sein die Lage der individuellen Oligonukleotide im Gel, mit einer deutlich höheren Sensitivität zu detektieren.

3.2.2 Ligation der supramolekularen Hybridstruktur

Bei der Untersuchung von supramolekularen Strukturen aus Oligonukleotiden können Ligationsexperimente in vielen Fällen hilfreiche Informationen über die gebildeten Strukturen liefern. Das Laufverhalten von DNA-Fragmenten, die aus einer Mischung von Doppel- und Einzelstrangabschnitten aufgebaut sind, ist extrem schwer vorherzusagen. Eine verlässliche Zuordnung verschiedener Banden kann daher problematisch sein. In der denaturierenden PAGE ist der Größenvergleich mit der Markerspür deutlich zuverlässiger. Durch die Ligation ist es möglich benachbarte Oligonukleotide einer Struktur kovalent miteinander zu verknüpfen und anschließend in der denaturierenden PAGE zu untersuchen. Aus den Längen der gebildeten Einzelstränge sind Rückschlüsse auf die Anordnung der Oligos innerhalb der untersuchten Struktur möglich.

Die im letzten Abschnitt beschriebenen Oligonukleotide T1 und Sp18 wurden am 5'-Ende während der Festphasensynthese chemisch phosphoryliert. Dadurch besteht die Möglichkeit, die Stränge T1, Sp18 und T2cA bzw. T2cB durch eine Ligation kovalent miteinander zu verknüpfen (Abb. 55). Zu diesem Zweck wurde die Stammlösung aus Abb. 53, Spur 4, mit 10 x Ligasepuffer versetzt, hybridisiert und anschließend bei ca. 10 °C mit T4 DNA Ligase über Nacht ligiert. Die denaturierenden PAGE an den ligierten Proben zeigt die drei erwarteten Banden der verschiedenen Einzelstränge (theoretisch: 60, 106 bzw. 143 Basen [Abb. 55], gefunden: 64, 116 bzw. 154 Basen [Abb. 56]). Die Abweichungen zwischen Theorie und Messung werden zum einen durch die Ungenauigkeit des Vergleichs mit dem Marker im hochmolekularen Bereich und zum anderen durch den Einfluss der PEG-Modifizierung verursacht. Neben den drei erwarteten Banden treten zusätzliche Signale bei 38 bzw. 89 Basen auf, die dem Oligonukleotid T1 (37 Basen) bzw. einem Ligationsprodukt aus T1 und Sp18 (83 Basen) zugeordnet werden können. Demnach konnten nicht alle Fragmente durch die Ligation verknüpft werden. Das Experiment hat aber gezeigt, dass eine Ligation von Hybridstrukturen aus Oligonukleotiden und Polyethylenoxid prinzipiell möglich ist.

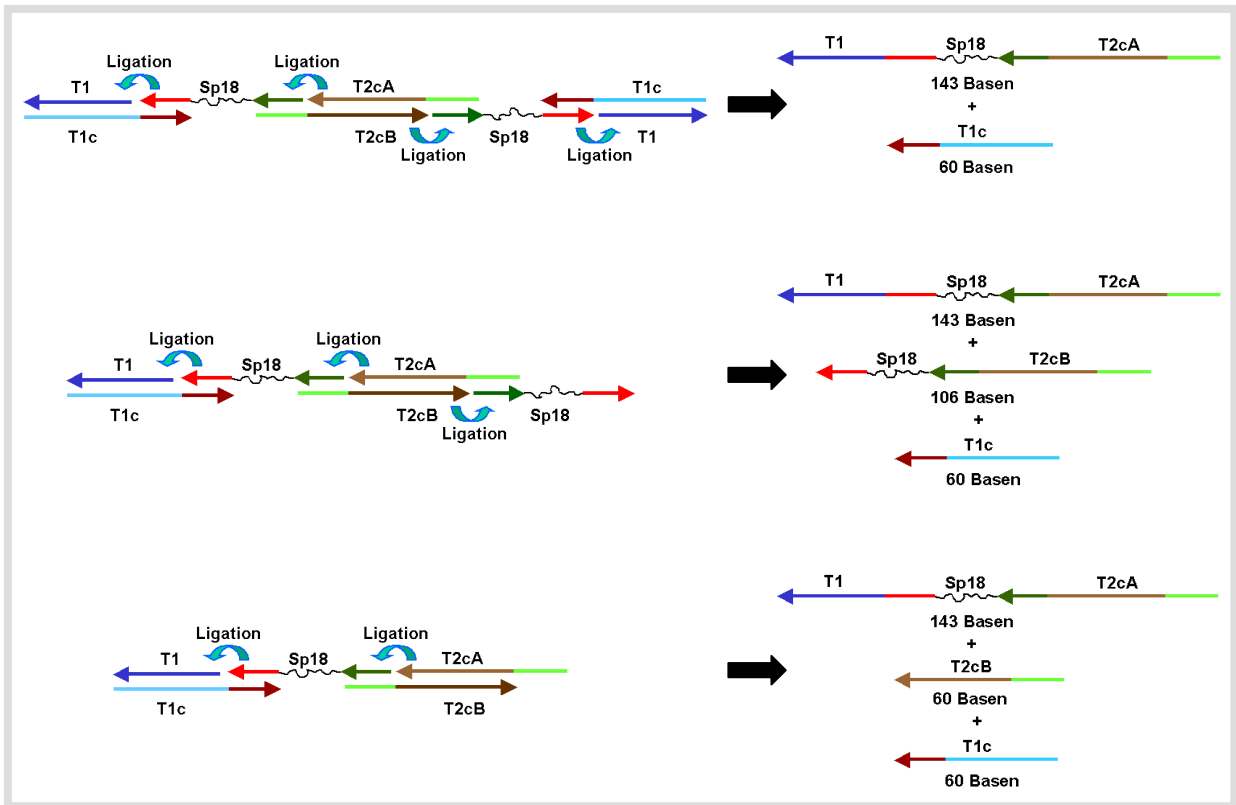


Abb. 55: Durch Ligation können die Oligonukleotide T1, Sp18 und T2cA bzw. T2cB kovalent verknüpft werden. Bei vollständiger Ligation sollten die relativen Intensitäten der verschiedenen Einzelstränge in der denaturierenden PAGE Rückschlüsse auf die Strukturen der ligierten Spezies zulassen.

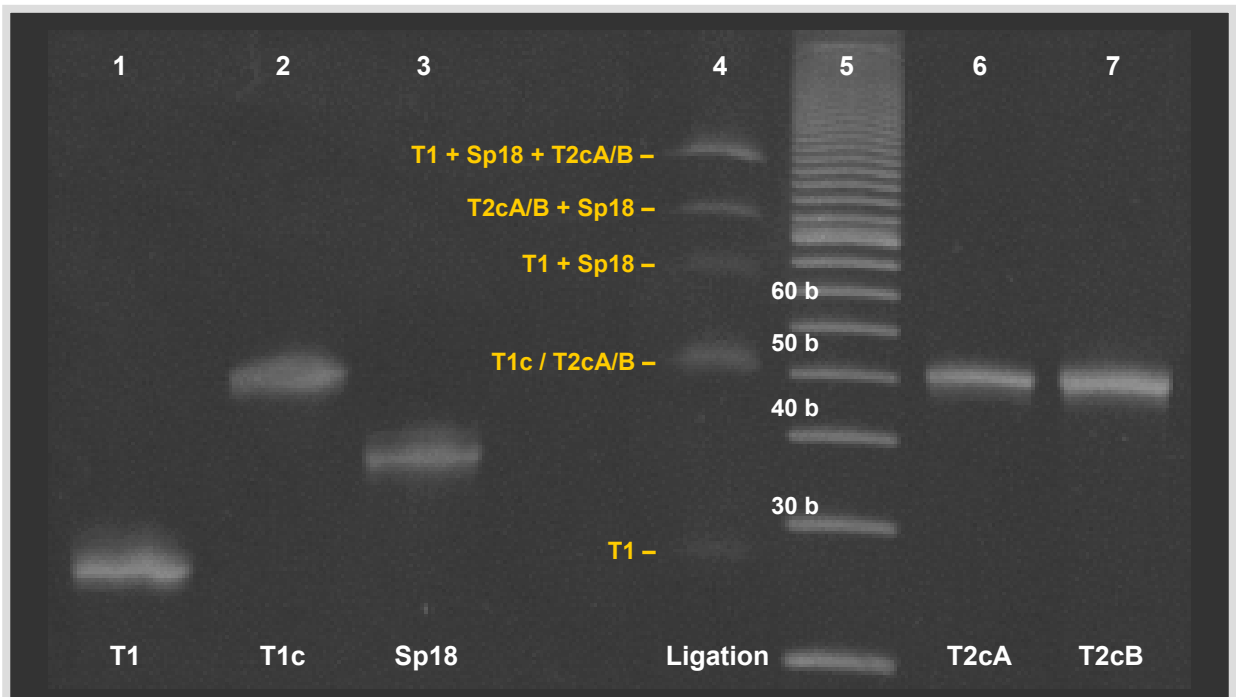


Abb. 56: Einzelstrangfragmente aus der Ligation (20 % denaturierendes PAA-Gel). Die erhaltenen Banden können den erwarteten Einzelsträngen zugeordnet werden. Bei vollständiger Ligation sollten jedoch lediglich drei Fragmente mit einer Länge von 60, 106 bzw. 143 Basen auftreten. Die Ligation war also offensichtlich nicht quantitativ.

3.2.3 Untersuchung der supramolekularen Hybridstruktur in Lösung

Die komplette „Trimer-Struktur“ hat eine Konturlänge von ca. 66 nm. Für eine Untersuchung in Lösung mittels statischer und dynamischer Lichtstreuung ist die Struktur zum einen etwas zu klein, zum anderen müssen deutlich größere Probenmengen erzeugt werden. Die Sequenzen für eine größere Struktur können nicht mehr „per Hand“ auf mögliche Fehlpaarungen überprüft werden, da diese die Kapazitäten des verwendeten Excel Makros übersteigen. Eine vollautomatische Symmetrieminimierung der Sequenzen, wie sie von U. Feldkamp et al. eingesetzt wurde [141] ist ebenfalls nicht möglich, da die Rechenzeit exponentiell mit der Sequenzlänge ansteigt. Aus diesem Grund wurde eine neue Sequenz aus 494 bp (Konturlänge ca. 160 nm) mit Hilfe des Computerprogramms „SEQUIN“ entworfen [111]. 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. Diese Sequenz wurde in fünf Stücke von jeweils 62 bp aufgeteilt, die über Triblockcopolymere miteinander verknüpft werden können. (Die vollständige „Pentamer-Sequenz“ ist im Anhang wiedergegeben.)

Für die Erzeugung ausreichender Probenmengen musste eine neue Methode zur Abtrennung der Fehlsequenzen entwickelt werden, da die Rückgewinnung von Oligonukleotiden aus PAA-Gelen auf relativ kleine Probenmengen beschränkt ist. Auf ein Gel (Geldimensionen: 200 x 200 x 0,8mm) können ca. 200 µg DNA aufgetragen werden. Durch das Ausschneiden der Banden und die Extraktion der Oligonukleotide aus dem Gel werden typischerweise 30-60 µg der gereinigten Sequenz gewonnen. Für Lichtstreuexperimente sind jedoch Probenmengen im Milligrammbereich erforderlich. Eine Methode, die es ermöglichen sollte größere Mengen an Oligonukleotiden von den Fehlsequenzen abzutrennen, ist die CEE (Continuous Elution Electrophoresis). Dieses System wird in der Regel zur präparativen Trennung von Proteinen über Acrylamidgele eingesetzt. Bei der CEE wird die Gellösung nicht zwischen zwei Glasplatten, sondern in eine Glasröhre gegossen, so dass eine Gelsäule gebildet wird, die eine deutlich größere Oberfläche aufweist als die typischerweise eingesetzten präparativen Flachgele. Die angelegte Spannung wird so lange aufrecht erhalten, bis die DNA am unteren Ende aus der Säule eluiert. Direkt unter der Gelsäule befindet sich die Elutionskammer, durch die ein kontinuierlicher Pufferstrom geleitet wird, der die aufgetrennten Moleküle durch einen Detektor in den Fraktionensammler transportiert. Mit dieser Methode konnten 500 µg eines Oligonukleotids (62 Basen) in einem Ansatz erfolgreich von den Fehlsequenzen abgetrennt werden. Auch bei Trennversuchen mit 1000 µg DNA wurden keine

Anzeichen einer Überladung festgestellt. Die maximal einsetzbare Probenmenge konnte bisher noch nicht bestimmt werden. Das Auflösungsvermögen der CEE erreicht annähernd das der analytischen PAGE. Nach drei Mischfraktionen, die noch einen gewissen Anteil an Fehlsequenzen enthalten (Abb. 57, Fraktionen 29-30), eluiert das reine Oligonukleotid.

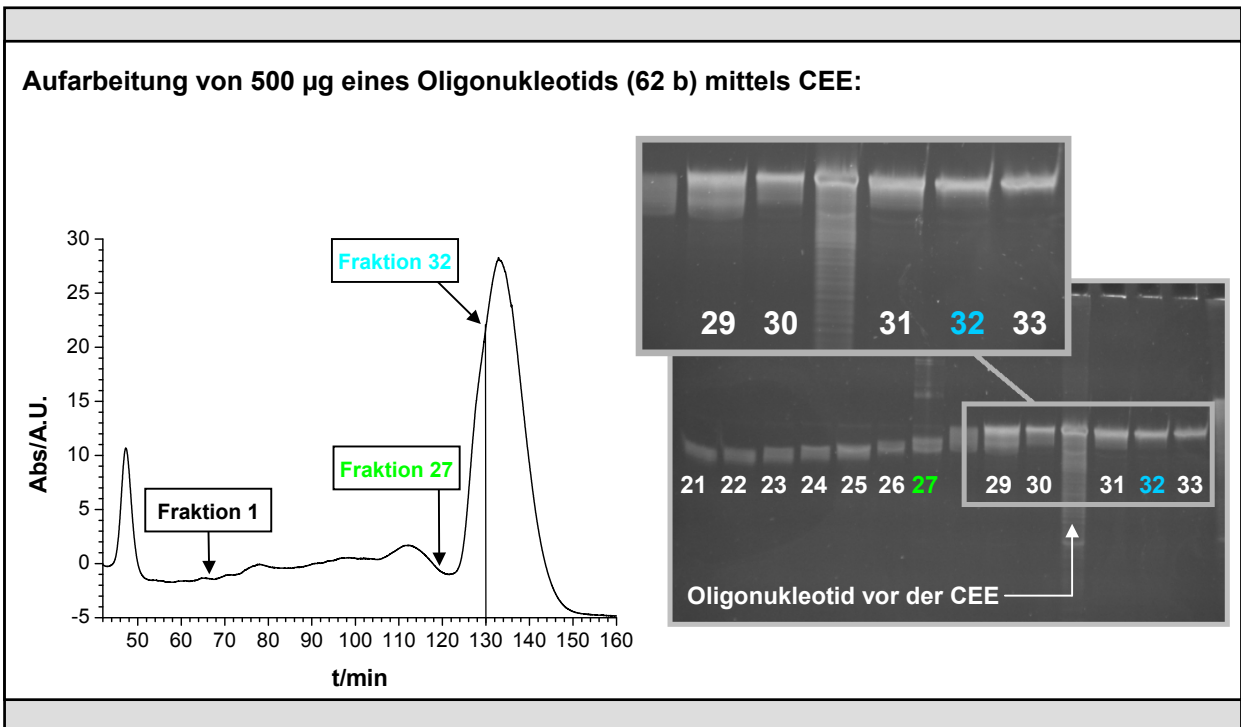


Abb. 57: Abtrennung der Fehlsequenzen über CEE. Links: UV-Signal bei der Aufarbeitung von 500 µg eines Oligonukleotids mit 62 Basen. Der Peak bei ca. 50 min wird durch den Farbstoff im verwendeten Ladepuffer verursacht. Rechts: Analytische PAGE der gesammelten Fraktionen. Nach drei Mischfraktionen (Fraktionen 29-31) eluiert das reine Oligonukleotid.

Die Ausbeute an gereinigtem Oligo liegt mit 36 % etwas höher, als bei der Rückgewinnung aus analytischen Gelen durch Extraktion. Die maximal mögliche Ausbeute ist von der schrittweisen Kopplungsausbeute in der Festphasensynthese des Oligonukleotids abhängig. Bei einem Oligo mit 62 Basen und einer stufenweisen Kopplungsausbeute von 98,5 % liegt die Ausbeute an gebildeter Zielsequenz bei lediglich 40 %. Ein großer Teil der Fehlsequenzen wird allerdings bereits in der standardmäßig durchgeführten Reinigung über HPLC abgetrennt. Dadurch kann die tatsächliche Ausbeute der Reinigungsmethode nicht exakt abgeschätzt werden. Die Rückgewinnungsrate der Methode liegt bei etwa 80-90 %. Die Gesamtmenge an gereinigter DNA, die in einem Trennungsschritt gewonnen werden kann, wurde im Vergleich zur herkömmlichen Methode um das Drei- bis Fünffache erhöht. Aus 500 µg des eingesetzten Oligonukleotids wurden 180 µg der reinen Zielsequenz erhalten. Bei den ersten Versuchen zum Aufbau der pentameren Struktur, durch Hybridisierung der gereinigten Oligonukleotide, sind jedoch Probleme aufgetreten [142], so dass die vollständige Struktur noch nicht untersucht werden konnte.

3.2.4 Zusammenfassung und Ausblick

Die Kombination von teilkomplementären synthetischen Oligonukleotiden wurde eingesetzt, um kleine Doppelstrangfragmente mit langen überstehenden Enden zu erzeugen. Diese Fragmente konnten erfolgreich durch Hybridisierung mit Triblockcopolymeren, die aus einem kleinen PEO-Block ($n = 6$) und zwei unterschiedlichen Oligonukleotidblöcken (jeweils 23 b) aufgebaut sind, miteinander verknüpft werden. Es hat sich gezeigt, dass selbst bei der sehr einfachen linearen „Trimer-Struktur“, die aus lediglich vier verschiedenen Oligos und einem Triblockpolymer aufgebaut ist, die Abtrennung der Fehlsequenzen eine entscheidende Rolle für den Erfolg der supramolekularen Strukturbildung spielt. Vor dem Abtrennen der Fehlsequenzen führt die Kombination der einzelnen Komponenten zu einer weitgehend unspezifischen Strukturbildung. Die Gelelektrophorese zeigt eine extrem stark verschmiertes Signal über den gesamten Größenbereich. Nach dem Abtrennen der Fehlsequenzen mit Hilfe der denaturierenden PAGE wird die erwünschte Struktur mit einer Ausbeute von etwa 75 % gebildet. Neben der Zielstruktur treten zwei Nebenprodukte auf, die durch Beimischexperimente identifiziert werden konnten. Hierbei handelt es sich um zwei Strukturen, bei denen zwei bzw. drei Oligonukleotide fehlen. Die entsprechenden Einzelstränge können nicht in der Gelelektrophorese detektiert werden, d.h. die unvollständigen Strukturen sind entweder auf eine falsche Stöchiometrie zurückzuführen oder die fehlenden Oligonukleotide verteilen sich auf viele verschiedene Alternativstrukturen, von denen jede einzelne in so geringen Mengen vorliegt, dass sie nicht mehr in der Gelelektrophorese nachweisbar ist.

Eine unvollständige Hybridisierung, die zu verschiedenen Alternativstrukturen führt, scheint wahrscheinlicher zu sein als eine falsche Stöchiometrie, da die beobachteten Abweichungen sowohl für eine fehlerhafte Konzentrationsbestimmung als auch für Pipettierfehler deutlich zu groß sind. Wenn jede der sieben Hybridisierungen zwischen komplementären Abschnitten zu 95 % erfolgreich verläuft, sind bereits 30 % der supramolekularen Strukturen fehlerhaft. Untersuchungen der Hybridisierung von Oligonukleotiden auf Microarrays haben außerdem gezeigt, dass sich die Hybridisierungseffektivitäten von Oligonukleotiden mit annähernd identischen Schmelzpunkten deutlich voneinander unterscheiden können [141]. Deshalb ist es möglich, dass selbst bei perfekter Zusammensetzung einer Hybridisierungsmischung keine „effektive Stöchiometrie“ erreicht wird.

Zum Aufbau einer größeren Struktur aus fünf dsDNA-Fragmenten wurde eine Sequenz von 494 bp entworfen, deren Symmetrie so weit minimiert wurde, dass alle Untersequenzen aus sechs oder mehr Basen nur jeweils einmal in der gesamten Struktur vorkommen. Damit diese Struktur im Milligrammmaßstab hergestellt werden kann wurde die CEE (Continuous Elution Electrophoresis), die eigentlich zur Trennung von Proteinen eingesetzt wird, auf die Abtrennung von Fehlsequenzen angewendet. Die entwickelte Methode erreicht annähernd das Auflösungsvermögen der analytischen PAGE. Die Menge an gereinigter Zielsequenz aus einem Reinigungsschritt liegt bei diesem Verfahren drei bis fünf mal höher als bei der herkömmlichen Isolierung von Oligonukleotiden aus Acrylamidgelen. Die maximal einsetzbare Probenmenge wurde bisher noch nicht erreicht. Bei der Reinigung von 1000 µg Oligo wurden noch keine Anzeichen für eine Überladung beobachtet.

3.3 Lineare Strukturen aus dsDNA Fragmenten

Durch molekulargenetische Methoden lassen sich DNA-Fragmente in einem deutlich breiteren Größenbereich herstellen, als es durch die Kombination von synthetischen Oligonukleotiden möglich ist. Mit geeigneten PCR Techniken können z.B. doppelsträngige DNA Sequenzen von ca. 30 bp bis zu einigen 10 000 bp vervielfältigt werden [143]. Ein gewisser Nachteil dieser Herangehensweise liegt jedoch in der Tatsache, dass biologische Systeme nicht zu einer *de novo* Synthese von DNA befähigt sind. Dadurch ist man auf die Replikation einer bereits bestehenden Sequenz angewiesen. Aus diesem Grund ist die Einführung spezieller Sequenzabschnitte und die Kontrolle über die Länge der erzeugten DNA Fragmente nicht so trivial wie im Falle der chemischen Synthese von Oligonukleotiden. Die Reproduzierung der ursprünglichen DNA Sequenz ist aber annähernd perfekt. Die Wahrscheinlichkeit für die Einführung einer falschen Base liegt bei gängigen Polymerasen im Bereich von 10^{-6} [144]. Durch die Verwendung von Endonukleasen können klar definierte Fragmente aus einer gegebenen DNA herausgeschnitten werden. Auch hier führt der Einsatz von biologischen Methoden zu einer sehr guten Selektivität [145, 146], die zugänglichen Längen der gebildeten Fragmente sind jedoch durch die Lage der entsprechenden Erkennungssequenzen vorgegeben. (Wie diese Einschränkung umgangen werden kann, wird in den Abschnitten 3.4 und 3.5 erläutert.) Die Einführung von langen überstehenden Enden ist ebenfalls etwas aufwändiger als bei der Kombination von synthetischen Oligonukleotiden. Molekulargenetische Problemstellungen, die eine Verknüpfung von unterschiedlichen Sequenzabschnitten erfordern, beruhen in der Regel auf der Verwendung von kurzen sticky-ends, die durch den Einsatz geeigneter Endonukleasen gebildet werden. Die hierbei genutzten überstehenden Enden haben üblicher Weise ein Länge von lediglich 2-4 Basen [147, 148]. Aus diesem Grund ist eine kovalente Verknüpfung der DNA Fragmente durch Ligation erforderlich. Eine 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.

3.3.1 Erzeugung von dsDNA Fragmenten durch Restriktion

In einem ersten Syntheseansatz soll ein dsDNA Fragment mit klassischen molekulargenetischen Methoden erzeugt werden. Hierfür muss die Ausgangs DNA zunächst mit Hilfe der PCR oder durch Transformation und Kultivierung von bakteriellen Zellen vervielfältigt werden, um eine ausreichende Probenmenge zu erhalten. Anschließend kann mit sequenzspezifischen Restriktionsenzymen ein genau definiertes Fragment aus der DNA herausgeschnitten werden. Durch die Verwendung geeigneter Enzyme bilden sich hierbei kurze

überhängende Enden. Die Adressierbarkeit der beiden Enden wird durch den Einsatz von zwei unterschiedlichen Endonukleasen erreicht. An diese Überhänge können dann selektiv zwei verschiedene Oligonukleotide angelagert und durch Ligation fixiert werden. Man erhält dadurch einen Grundbaustein definierter Größe, an dessen Enden je nach Bedarf verschiedene Einzelstrangsequenzen gebunden werden können. Sowohl die Sequenz als auch die Länge der Einzelstrangstücke sind hierbei frei wählbar.

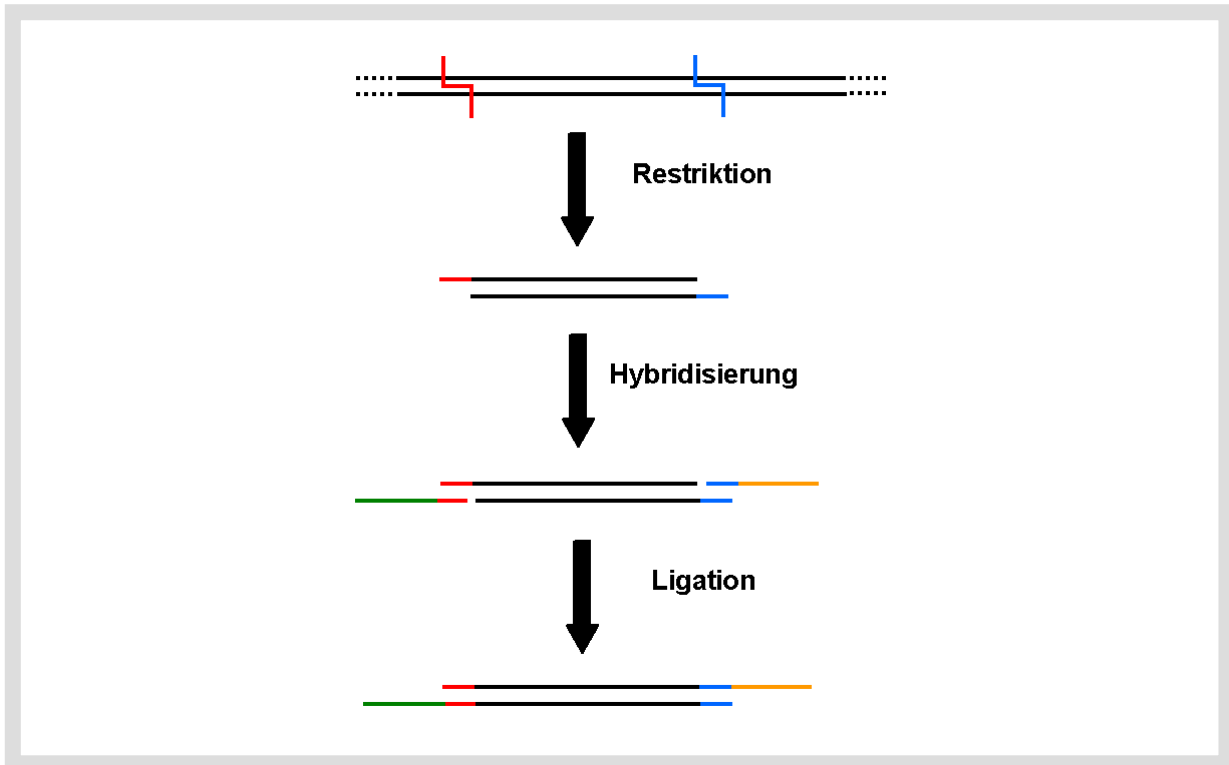


Abb. 58: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte zur Erzeugung von dsDNA-Fragmenten mit langen überhängenden Enden beliebiger Sequenz: Aus einer gegebenen DNA wird mit zwei verschiedenen Endonukleasen ein Fragment definierter Länge herausgeschnitten. Das erhaltene Fragment trägt zwei kurze überhängende Enden, an die zwei unterschiedliche Oligonukleotide angelagert und durch Ligation kovalent gebunden werden können.

Als Ausgangsmaterial dient ein pUC18 Klon (pDmirAmyRelXba0,6), der mir von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. E. R. Schmidt zur Verfügung gestellt wurde. Dieser Klon wurde durch Integration eines DNA Fragments von 559 bp in die multiple cloning site (MCS) des Vektors erzeugt. Die Restriktion von Vektor und Integrat erfolgte mit XbaI. Die Erkennungssequenz von XbaI liegt in der MCS zwischen den Schnittstellen von EcoRI und HindIII. Diese drei Schnittstellen treten nur jeweils einmal im verwendeten Plasmid auf. Durch einen Doppelverdau mit EcoRI und HindII sollte daher ein klar definiertes Fragment von etwa 600 bp aus der DNA erhalten werden. Die Sequenz des Integrats, sowie die Erkennungssequenzen und Schnittstellen der verwendeten Enzyme sind im Anhang zu finden.

3.3.1.1 Amplifikation durch PCR

Direkt außerhalb der MCS des verwendeten Klon liegen die Sequenzen der Standard Primer M13 universal (-20) und M13 reverse (-26). Die in Klammern vermerkten Zahlen geben die Abstände der 5'-Enden der Primer vom Beginn der multiple cloning site an. Eine PCR mit diesen beiden Primern führt also zur Amplifikation eines Fragments, das etwas größer ist als das eingeführte Integrat. Durch den extrem hohen Vervielfältigungsfaktor der PCR ist eine Abtrennung der Templat DNA nicht erforderlich.

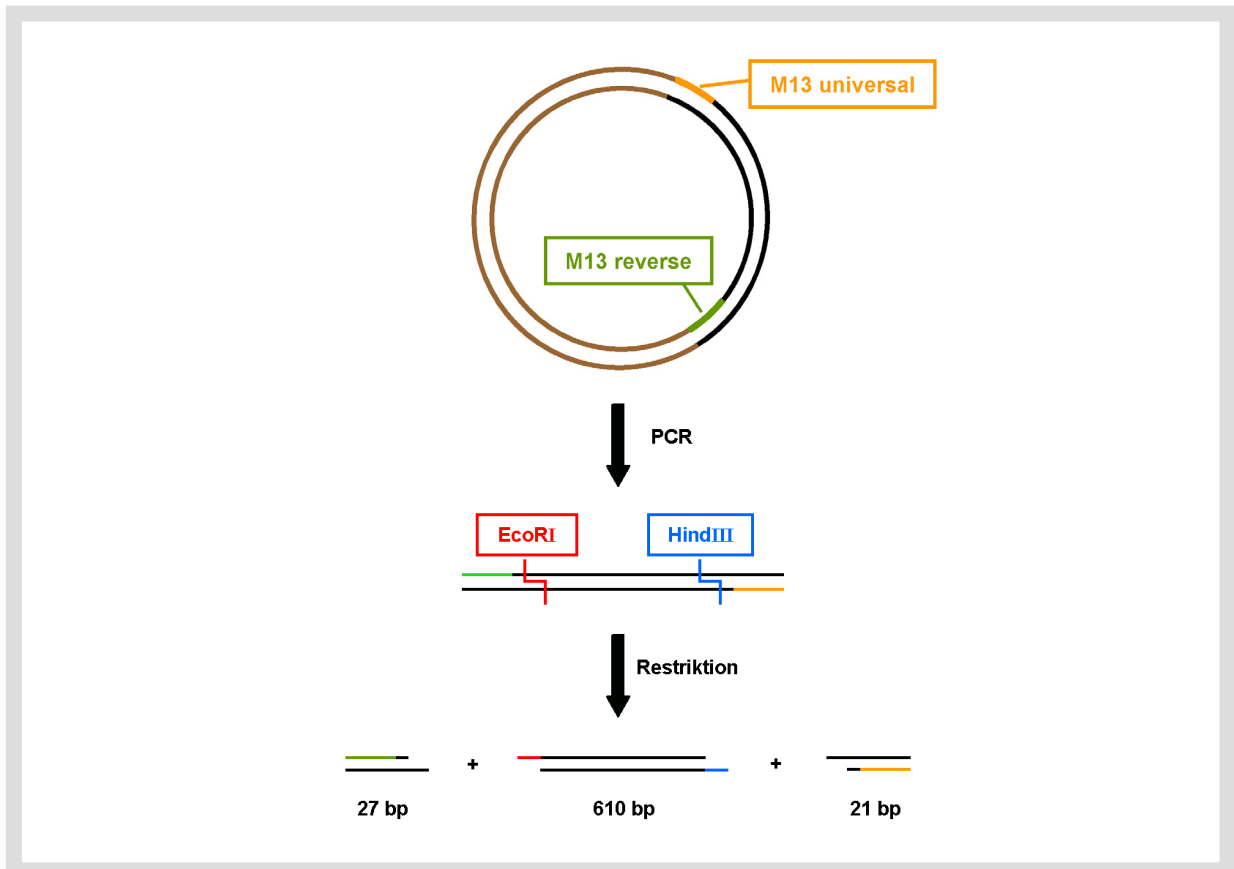


Abb. 59: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte zur Erzeugung von dsDNA-Fragmenten durch Amplifikation mittels PCR. Aufgrund der extrem hohen Vervielfältigung des Amplifikats sind nur vernachlässigbar kleine Mengen (einige ppm) der Templat-DNA im PCR-Produkt enthalten. Durch einen Doppelverdau mit EcoRI und HindIII werden von dem erhaltenen Produkt zwei Fragmente von 27 bp bzw. 21 bp abgeschnitten, die mit geeigneten Methoden abgetrennt werden müssen.

Das einzige Trennproblem in diesem Syntheseansatz ist also die Separation des erwünschten DNA-Abschnitts von nicht umgesetzten Primern und den beiden kleinen Fragmenten mit 21 bzw. 27 bp, die beim Doppelverdau mit EcoRI und HindIII gebildet werden. Für DNA-Fragmente, die sich so deutlich in ihren Größen unterscheiden, kommen verschiedene Trennmethode in Frage, wie z.B. Dialyse, Ultrafiltration, selektive Adsorption an Silika, selektive Fällung oder Größenausschlusschromatographie.

Die Reaktionslösung aus der PCR zeigt nach der Fällung in Ethanol die erwartete Produktbande bei ca. 700 bp (theoretisch 665 bp, Abb. 60 A). Die schwache Bande mit geringerer Mobilität ist auf Einzelstranganteile zurückzuführen, die in der PCR durch unvollständige Assoziation der synthetisierten Stränge oder durch unterschiedliche Affinitäten, bzw. unterschiedliche Konzentrationen der Primer in den letzten Zyklen der PCR entstehen können. Der Doppelverdau mit EcoRI und HindIII sollte zu drei Fragmenten von 610, 26 bzw. 21 bp führen. Wie erwartet, zeigt das Kombigel (Abb. 60 B) eine deutliche Verschiebung der Produktbande. Das Fragment ist aber mit rund 500 bp etwas zu klein. Außerdem treten zwei weitere Banden mit höherer Mobilität auf, die zunächst als Nebenprodukte aus der PCR gedeutet wurden. Die tatsächlichen Zusammenhänge konnten erst nach der Transformation des Klons und dem darauf folgenden Verdau des kompletten Plasmids geklärt werden (vgl. Abschnitt 3.3.1.2).

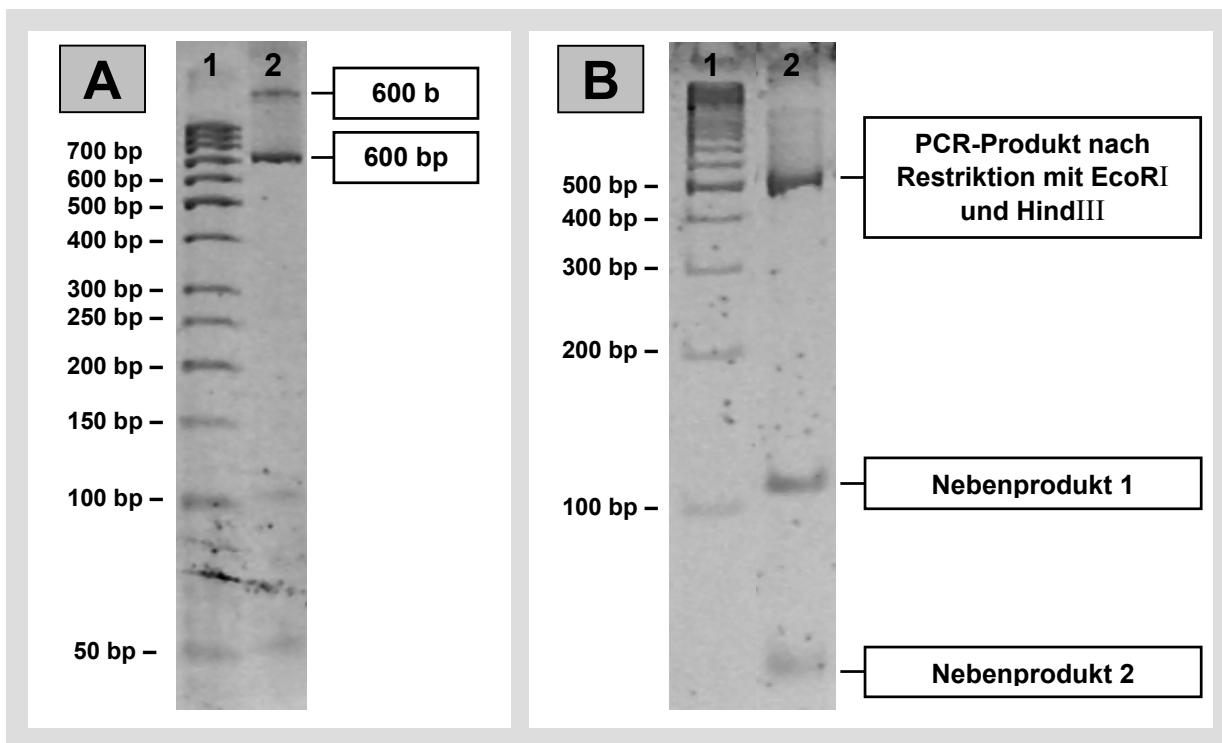


Abb. 60: PCR-Produkt vor und nach der Restriktion mit EcoRI und HindIII (Kombi Gel: 1% Agarose, 4% Polyacrylamid). A: Spur 1: GeneRuler (50 bp), Spur 2: PCR Produkt nach der Fällung in Ethanol. B: Spur 1: GeneRuler (100 bp), Spur 2: PCR-Produkt nach Doppelverdau mit EcoRI und HindIII und Fällung in Ethanol. Wie erwartet, wird die Produktbande durch die Restriktion zu kleineren Molmassen verschoben. Der Vergleich mit der Markerspur liefert eine Größe von ca. 500 bp. Theoretisch sollte der Doppelverdau zu drei Fragmenten von 610, 26 bzw. 21 bp führen. Das große Fragment hat auf Grund der Restriktion zwei 5'-Überhänge von jeweils 4 Basen. Bei den kleinen Fragmenten tritt dieser Überhang jeweils nur an einem Ende auf.

Für eine Abtrennung mittels Dialyse, Ultrafiltration, selektive Adsorption an Silika oder selektive Fällung, ist das Fragment von 100 bp im Vergleich zum Produkt mit ca. 500 bp bereits relativ groß. Aus diesem Grund schien die Größenausschlußchromatographie als Trennmethode am besten geeignet. Diese Methode hat eine ausreichende Trennleistung und

sollte für Probenmengen im Bereich von einigen Milligramm gut anwendbar sein. Das Verfahren wurde zunächst an einem Probeansatz getestet. Hierzu wurde eine 5 ml Einwegpipette ($\varnothing = 8$ mm) mit Sephacryl S-400 (Amersham) gepackt und die Probe unter leichtem N_2 -Überdruck fraktioniert (20 Fraktionen, 5 Tropfen pro Fraktion $\approx 1/6$ ml). Die Gelelektrophorese der erhaltenen Fraktionen zeigt, dass die Produktbande auf diese Weise sauber abgetrennt werden kann (Abb. 61).

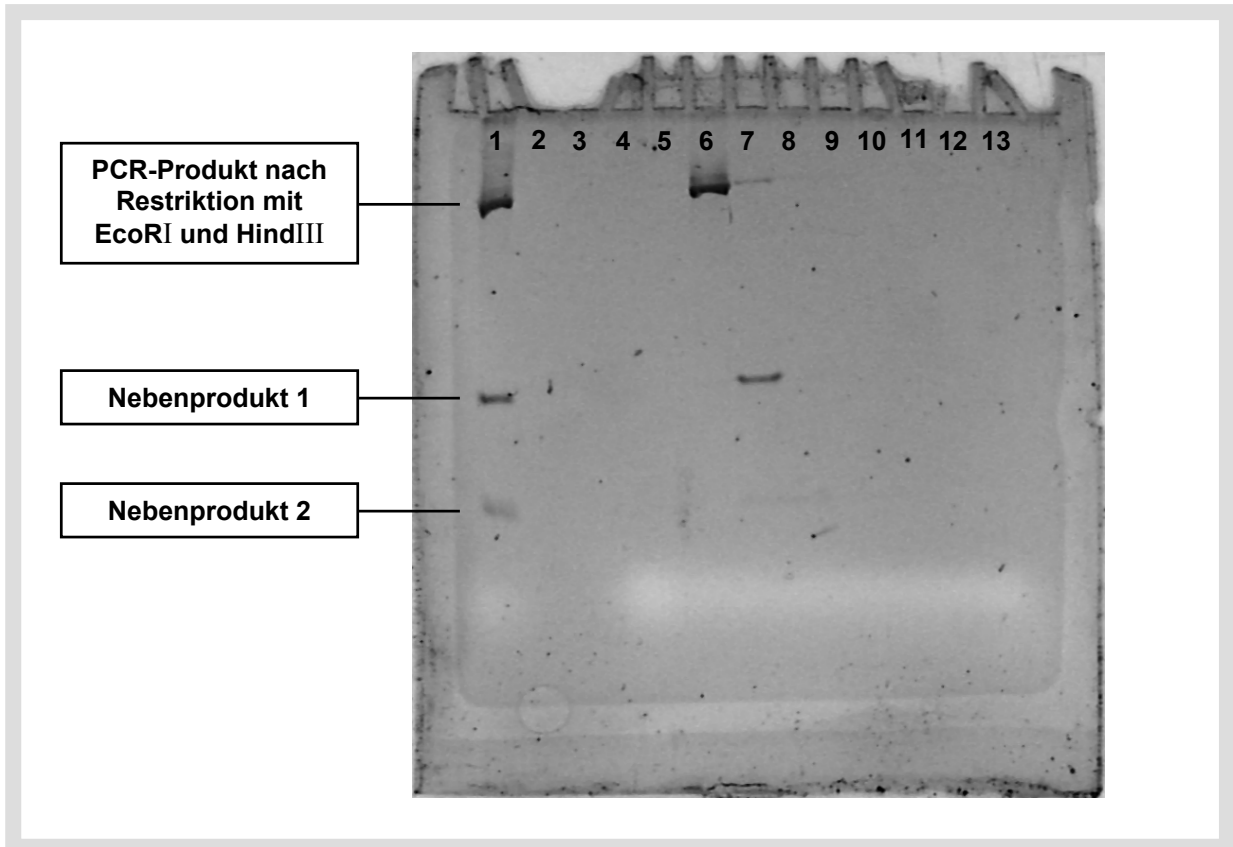


Abb. 61: Fraktionierung der Restriktionslösung über Größenausschlusschromatographie (Kombi Gel: 1% Agarose, 4% Polyacrylamid). Spur 1: PCR-Produkt nach Doppelverdau mit EcoRI und HindIII, Spuren 4-13: Fraktionen 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 und 19 aus der chromatographischen Trennung.

Zur Aufarbeitung der restlichen Probenlösung (ca. 100 μ g DNA) wurden das Säulenvolumen entsprechend angepasst (Column XK 26/70, Amersham Biosciences, i.d. = 26 mm). Das Eluogramm schien die Trennung zu bestätigen, die Probe war aber nach der Fraktionierung so stark verdünnt, dass sie nicht mehr zurückgewonnen werden konnte*. Wiederholungsversuchen der PCR am Institut für molekulare Genetik führten nur noch zu unspezifischen Amplifikationen. Auch durch eine systematische Kombination verschiedener Chargen der eingesetzten Komponenten konnte die Fehlerquelle nicht beseitigt werden.

* Spätere Experimente haben gezeigt, dass die Ultrafiltration hervorragend geeignet ist, wenn DNA aus extrem verdünnten Lösungen zurückgewonnen werden soll.

3.3.1.2 DNA Vervielfältigung durch Transformation von E. coli

Wenn das rekombinante Plasmid durch Transformation und Kultivierung von E. coli vervielfältigt wird, liefert der Doppelverdau mit EcoRI und HindII keine kleinen Restriktionsfragmente, sondern man sollte eine Mischung des erwünschten Produktes (ca. 600 bp) mit dem linearisierten Vektor (ca. 2600 bp) erhalten.

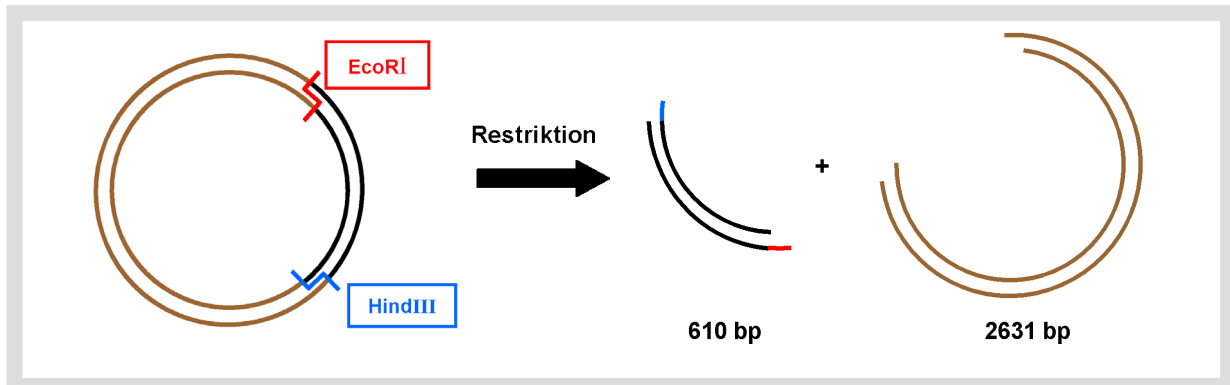


Abb. 62: Nach der Vervielfältigung und Isolierung des rekombinanten Plasmids, liefert die Restriktion mit EcoRI und HindIII zwei DNA-Fragmente von 610 bp bzw. 2631 bp. Die Trennung der beiden Fragmente erfordert Methoden mit einem hohen Auflösungsvermögen, wie z.B. die Gelelektrophorese oder die präparative Ultrazentrifugation.

In diesem Fall ist die Aufarbeitung deutlich anspruchsvoller als im Falle der Amplifikation mittels PCR, da sich die beiden Fragmente nur noch um einen Faktor 4 in ihrer Größe unterscheiden. Chromatographische Methoden stoßen hier bereits an ihre Grenzen. Andere Methoden wie z.B. die präparative Gelelektrophorese oder Ultrazentrifugation haben ein höheres Auflösungsvermögen, sind aber deutlich zeitaufwändiger, auf kleine Probenmengen beschränkt und schwieriger zu handhaben.

Der Doppelverdau wurde zunächst an einem Probeansatz getestet, der nach 2,5 bzw. 3,5 h auf Vollständigkeit überprüft wurde. Vor dem Verdau erkennt man die Banden der verschiedenen Formen des Plasmids: concatemere*, single nicked relaxed, lineare bzw. supercoiled DNA (Abb. 63 B, Spur 3). Nach 2,5 h ist das Plasmid vollständig linearisiert und zeigt daher auf dem Gel nur noch eine Bande (Abb. 63 A)**. Neben dem Plasmid treten aber nicht nur eine sondern gleich zwei zusätzliche Banden bei 500 bzw. 600 bp auf. Nach 3,5 Stunden ist die Bande bei 600 bp vollständig verschwunden. Gleichzeitig ist ein weiteres Fragment mit einer Größe von ca. 100 bp gebildet worden (Abb. 63 B, Spur 2).

* Concatemere sollten nicht mit Concatenaten verwechselt werden: Concatenate sind ineinander verschlaufte Ringe, Concatemere sind lineare DNA-Sequenzen, in denen identische Sequenzabschnitte in gleichsinniger Orientierung miteinander verknüpft sind.

** In dem hier gezeigten Beispiel zeigt die supercoiled DNA dieselbe Mobilität wie die linearisierte Form. Generell sind die relativen Mobilitäten der verschiedenen Formen des Plasmids von der Molmasse, der Gelkonzentration und dem Ausmaß des supercoilings abhängig. Dadurch kann die Reihenfolge in der die entsprechenden Banden auftreten für verschiedene Moleküle unterschiedlich sein.

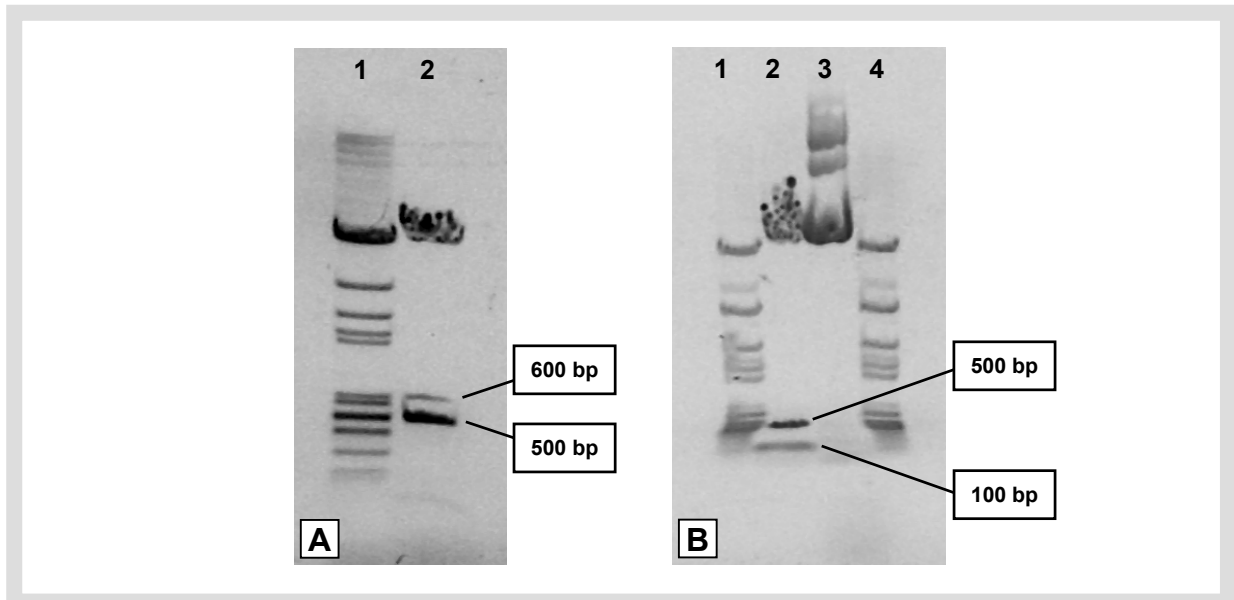


Abb. 63: Restriktion des isolierten Plasmids (1 % Agarose). A: Spur 1: pF-Marker, Spur 2: Probeansatz nach 2,5 h bei 37°C. B: Spur 1 u. 4: pF-Marker, Spur 2: Probeansatz nach 3,5 h bei 37°C, Spur 3: Isoliertes Plasmid vor der Restriktion. Nach einem unvollständigen Verdau (A) tritt neben dem erwünschten Fragment von 610 bp ein weiteres mit ca. 500 bp auf. Der vollständige Verdau (B) führt zur Spaltung des erwünschten Produktes in zwei Fragmenten mit ca. 500 bzw. 100 bp.

Diese Ergebnisse können nur durch eine unspezifische Restriktion („Star Aktivität“) bei einem der verwendeten Enzyme oder durch eine zusätzlich Schnittstelle innerhalb des 600 bp Fragments erklärt werden. Aus diesem Grunde wurde eine Sequenzierung des verwendeten Klons durchgeführt. Diese zeigt, dass neben den Schnittstellen der MCS noch eine weitere unerwünschte EcoRI Schnittstelle innerhalb des Integrats vorhanden ist. Dadurch können vier verschiedene Fragmente gebildet werden (Abb. 64).

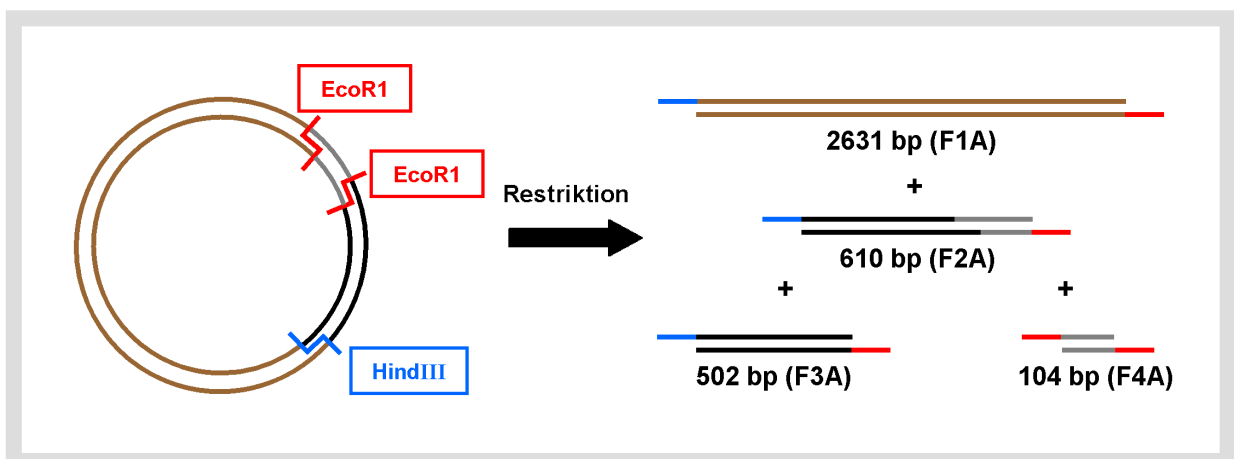


Abb. 64: Aufgrund der zusätzlichen Schnittstelle von EcoRI innerhalb des Integrats können vier verschiedene DNA-Fragmente mit 5'-Überhängen gebildet werden: Drei asymmetrische Fragmente von 2631, 610 bzw. 502 bp, die einen EcoRI (5'-AATT) und einen HindIII (5'-AGCT) Überhang tragen und ein symmetrisches Fragment von 104 bp, das an beiden Enden einen EcoRI-Überhang trägt.

Von diesen Fragmenten sind nur die asymmetrischen Stücke mit 502, 610 bzw. 2631 bp für die weiteren Experimente von Nutzen, da nur bei diesen eine gezielte Anlagerung von zwei verschiedenen oligomeren Einzelsträngen möglich ist.

Aufgrund des sehr geringen Größenunterschieds zwischen den Fragmenten mit 500 bzw. 600 bp ist die Trennung nur über eine präparative Gelelektrophorese möglich. Da es sich um DNA Fragmente > 100 bp und relativ große Mengen an Gelmatrix handelt, wurde zur Rückgewinnung die Methode der Elektroelution eingesetzt.

Obwohl alle Banden im präparativen Gel (Abb. 65) sauber von einander getrennt sind, treten nach der Rückgewinnung des 610 bp Fragmentes (F2A) zwei Banden mit 502 bp bzw. 610 bp auf (Abb. 66 A). Prinzipiell wäre eine Wechselwirkung zwischen den sticky-ends der verschiedenen Fragmente denkbar. Diese würde jedoch zu einem klar definierten Assoziat der entsprechenden Masse führen. Man würde also z.B. eine Verunreinigung der 610 bp Bande durch die Fragmenten mit 502 bp und 104 bp erwarten. Eine Assoziation der Fragmente mit 610 bp und 502 bp würde hingegen im präparativen Gel zu einer Bande mit deutlich niedrigerer Mobilität führen. Die Verunreinigung der isolierten Fragmente ist im rechten Gel (Abb. 66 B) noch sehr viel drastischer ausgeprägt. Die Probe des 502 bp Fragments in Abb. 66 B auf Spur 2 wurde aus einem Anteil der Restriktionslösung zurückgewonnen, in dem das 610 bp Fragment vollständig verdaut wurde, so dass nur die Banden mit 104 bp, 502 bp und 2631 bp im präparativen Gel auftreten. Trotzdem enthält hier das isolierte 502 bp Fragment sowohl das 104 pb Fragment als auch einen kleinen Rest des linearisierten Plasmids. Bei dieser Probe kann sowohl die Assoziation über sticky-ends als auch ein ungenaues Ausschneiden der Banden als Erklärung für das Auftreten der Verunreinigungen ausgeschlossen werden. Nach den Erfahrungen der Mitarbeiter im Institut für molekulare Genetik tritt eine derartige „Co-Migration“ in präparativen Gelen relativ häufig auf. In der Regel wird dieser Effekt durch die extrem hohe lokale DNA Konzentration innerhalb der Banden erklärt. Obwohl einige Änderungen der experimentellen Vorgehensweise getestet wurden konnten Trennleistung und Ausbeute dieser Methode nicht verbessert werden.

Bei späteren Experimenten mit anderen Proben konnten deutlich anspruchsvollere Trennprobleme mit der präparativen Gelelektrophorese bewältigt werden. So ist es z.B. möglich ein Nebenprodukt aus der PCR abzutrennen, das nur 20-50 bp kleiner ist als das Hauptprodukt mit rund 600 bp. Bei diesen Versuchen wurden aber anstelle der oben genannten 860 µg nur etwa 5 µg Probe auf das Gel aufgetragen. Außerdem wurde die Elektroelution durch eine vollständige Solubilisierung der Gelmatrix mit anschließender Aufarbeitung über NucleoSpin Extrakt II (Macherey Nagel) ersetzt. Die Ausbeuten lagen hier zwischen 30 und 60 %. Die mögliche Trennleistung der präparativen Gelelektrophorese ist also kaum zu übertreffen, die verwertbaren Probenmengen sind aber relativ klein.

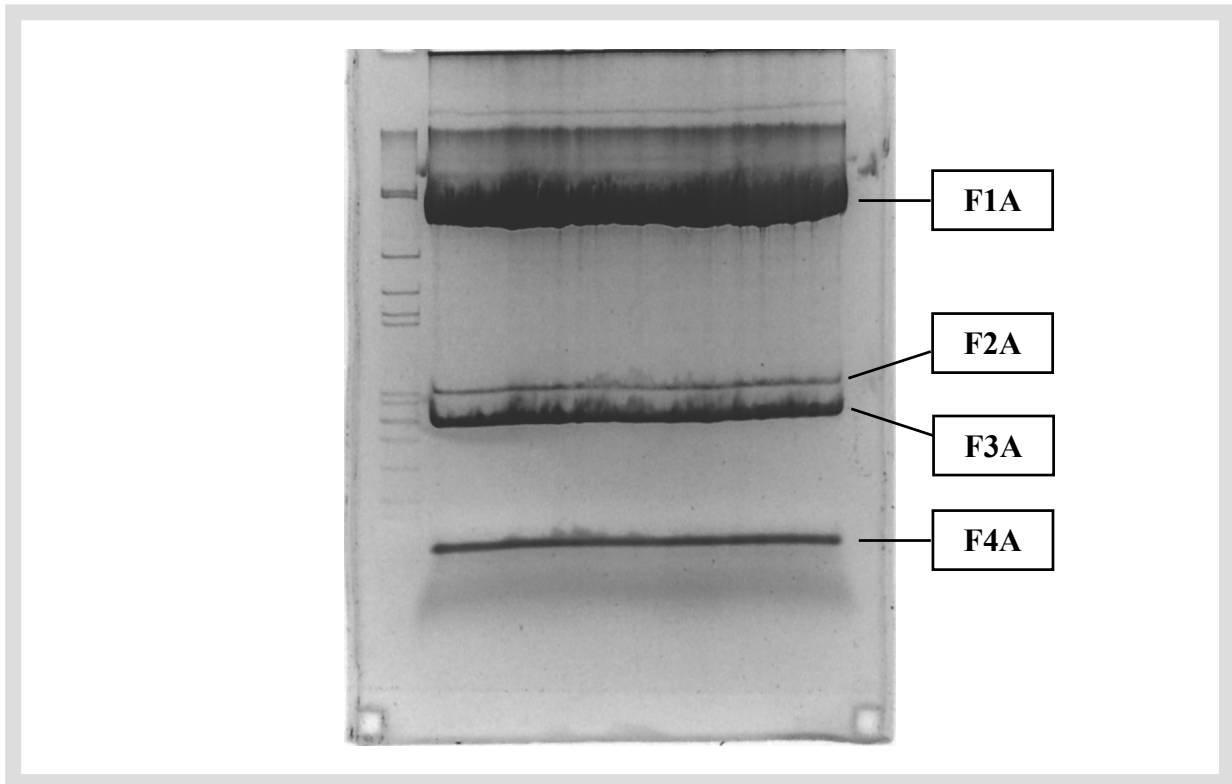


Abb. 65: Präparatives Gel zur Isolierung der verschiedenen Restriktionsfragmente (1,5 % Agarose, Geldimensionen: 180 x 130 x 3 mm). Spur 1: pF-Marker, Spur 2: Restriktionslösung. Die aufgetragene Probe (860 µg DNA) wurde bei 30 mA in ca. 3,5 h aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und die Banden auf dem UV-Tisch ausgeschnitten. Durch Elektroelution konnten lediglich 5 µg F2A aus dem Gel isoliert werden.

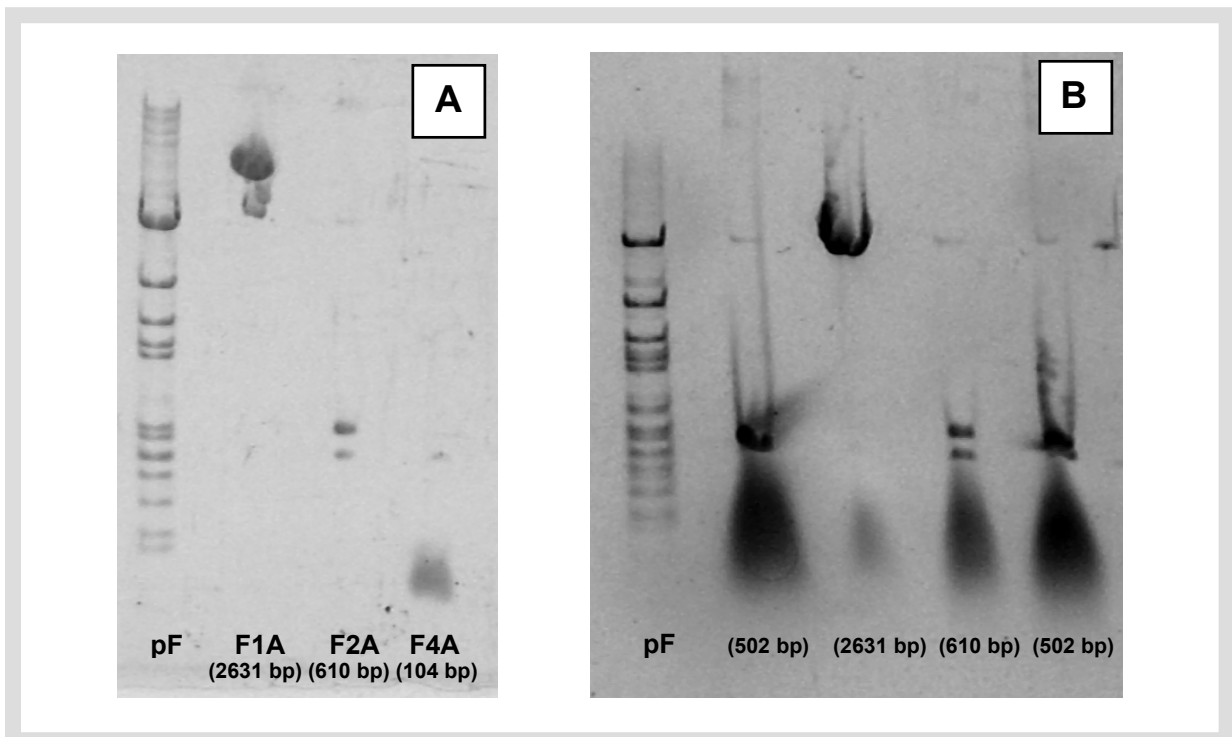


Abb. 66: Restriktionsfragmente aus der präparativen Gelelektrophorese, nach der Rückgewinnung durch Elektroelution (1 % Agarose). A: Spur 1: pF-Marker, Spur 2, 3, 4: Isolierte Fragmente mit 2631 bp (F1A), 610 bp (F2A) bzw. 104 bp (F4A) aus Abb. 65. B: Spur 1: pF-Marker, Spuren 2, 3, 4, 5: Isolierte Fragmente mit 502 bp, 2631 bp, 610 bp und 502 bp aus weiteren Isolierungsversuchen. Die Proben wurden durch Elektroelution aus dem präparativen Gel zurückgewonnen und anschließend mittels PCI-Extraktion und Fällung in Ethanol gereinigt. Aufgrund der extrem hohen DNA-Konzentration innerhalb der Banden im präparativen Gel kommt es zur Co-Migration verschieden großer Fragmente.

3.3.2 Einführung überstehender Enden durch Ligation mit Oligonukleotiden

Für den Aufbau definierter supramolekularer Strukturen muss garantiert sein, dass die Verknüpfung der einzelnen Bausteine nur über komplementäre Oligos erfolgt. Die entscheidenden Kriterien für das Design geeigneter Sequenzen sind im Abschnitt 2.8 erläutert worden. Für die Ligation der im letzten Abschnitt beschriebenen Doppelstrangfragmente wurden die Oligonukleotide S1c und S2c verwendet. Die entsprechenden Sequenzen stammen aus einer experimentell überprüften DNA-Bibliothek von U. Feldkamp et al. [141]. Für die hier vorgestellte Arbeit wurden die zu F2 und F6 komplementären Sequenzen (F2c und F6c) aus der Bibliothek übernommen und so modifiziert, dass die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme (EcoRI und HindII) bei der Ligation erhalten bleiben (Abb. 67). Dadurch besteht die Möglichkeit, die sticky-ends bei Bedarf selektiv vom Produkt wieder abzuspalten. Die synthetischen Oligos (S1c und S2c) wurden vor der Ligation am 5'-Ende enzymatisch phosphoryliert. Die Ligation der Oligos an die sticky-ends des dsDNA-Fragmentes erfolgte mit der Probe F2A (610 bp). Die Verunreinigung durch das 502 bp-Fragment sollte hierbei keine Rolle spielen, da beide Fragmente die gleichen überhängenden Enden tragen.

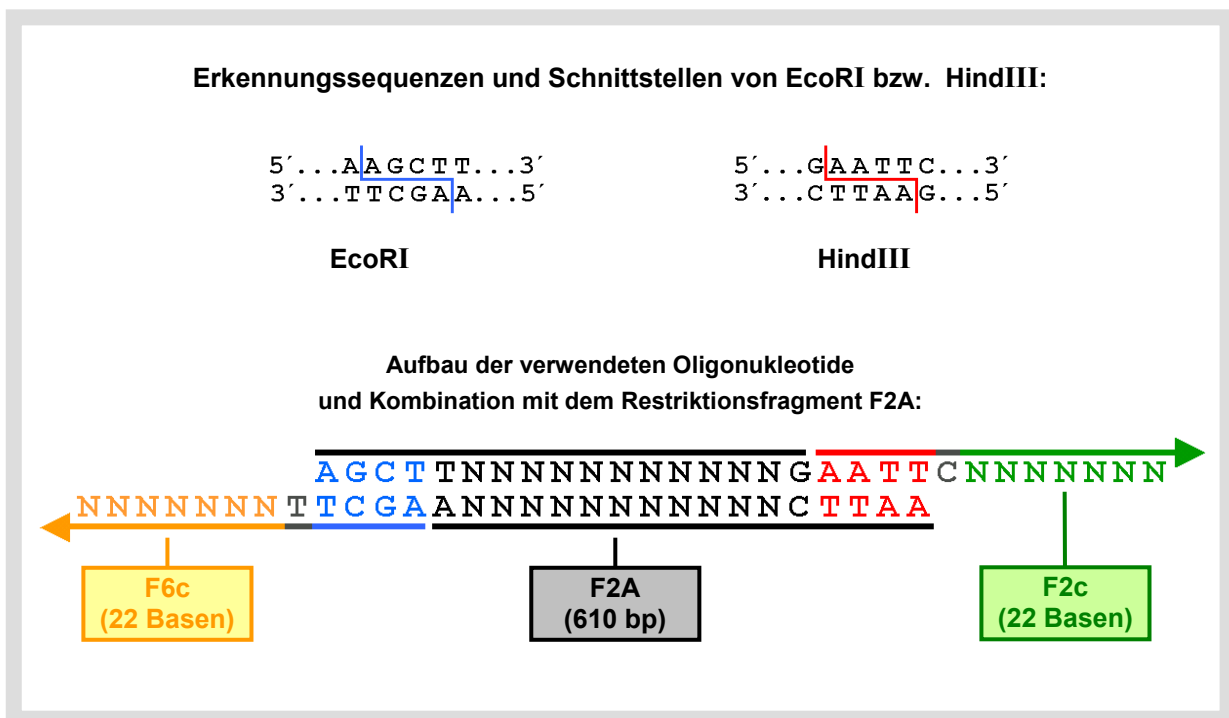


Abb. 67: Modifizierung der Sequenzen F2 und F6 aus der Bibliothek von U. Feldkamp et al. [141]. Die zu F2 und F6 komplementären Sequenzen (F2c und F6c) wurden am 5'-Ende um jeweils fünf Basen verlängert. Vier der Basen sind komplementär zu den sticky-ends des dsDNA-Fragmentes aus dem Doppelverdau mit EcoRI und HinIII. Die fünfte Base wurde eingefügt, um die Erkennungssequenzen der verwendeten Enzyme zu erhalten: S2c = 5'-AGCTT-F6c-3', S1c = 5'-AATTC-F2c-3'. (Die 3'-Enden der DNA-Stränge sind durch die Pfeilspitzen markiert.)

Für einen direkten Nachweis der Ligation durch eine Verschiebung der Bande in der Gelelektrophorese reicht die Auflösung des standardmäßig verwendeten analytischen Elelektrophoresesystems (GENterphorese™, Geldimensionen: 70 x 66 x 2 mm) nicht aus.

Versuche mit einem horizontalen System (PerfectBlue™ Maxi M, Geldimensionen: 200 x 250 x 10 mm) zeigten bei Testläufen mit DNA-Markern eine ausreichende Auflösung. Die Nachweisgrenze liegt hier aber etwas höher und die Diffusion der Proben im Gel spielt aufgrund der deutlich längeren Laufzeiten eine größere Rolle. Die untersuchten Proben konnten im Gel nicht mehr detektiert werden. Hier wäre die am Ende der Arbeit verwendete vertikale Gelelektrophorese deutlich besser geeignet. (Geldimensionen: 180 x 130 x 3 mm, Eigenbau AK Prof. E. R. Schmidt)

Neben den apparativen Problemen tritt aber auch ein konzeptionelles Problem bei der Ligation von Oligos an die überhängenden Enden der Restriktionsfragmente auf: Das dsDNA-Fragment kann zur Bildung von zwei verschiedenen supramolekularen Strukturen mit dem biosynthetischen Blockcopolymeren (S2-PEO-S1) eingesetzt werden. Wird das Fragment in zwei getrennten Ansätzen mit nur jeweils einem Oligo ligiert, führt die Hybridisierung zu einer Dimerisierung der beiden dsDNA-Fragmente. (S2 ist komplementär zu S2c und S1 zu S1c.) Ligiert man hingegen das Restriktionsfragment mit beiden Oligos gleichzeitig, sollte die Hybridisierung mit dem Dreiblock zur Ringbildung bzw. zu einer polymeren Struktur führen. In diesem Fall ist also keine direkte Kontrolle über die Größe der supramolekularen Strukturen möglich, sondern es wird sich eine statistisch bestimmte mittlere Molmasse einstellen. Die Ergebnisse der verschiedenen Ligationsversuche sind in Abb. 68 wiedergegeben. In allen Proben tritt eine Bande bei doppelter Molmasse des eingesetzten DNA-Fragments auf. Bei den Ligationsansätzen mit nur einem Oligo repräsentiert diese Bande sogar das Hauptprodukt.

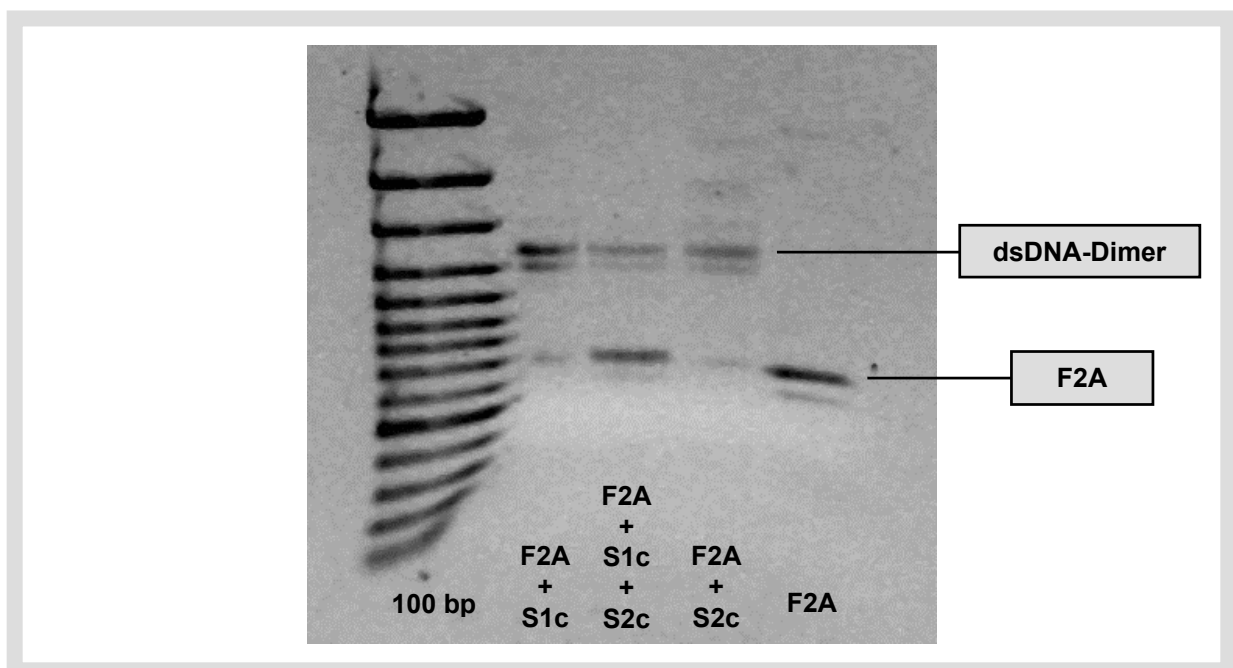


Abb. 68: Ligation des Restriktionsfragments F2A mit Oligonukleotiden (1 % Agarose). Spur 1: 100 bp-Marker, Spuren 2, 3, 4: Ligation von F2A mit S1c, S1c + S2c bzw. mit S2c, Spur 5: F2A vor der Ligation. In allen Proben tritt eine Bande bei doppelter Masse des Restriktionsfragments auf. In den Ansätzen, die jeweils nur ein Oligonukleotid enthalten, repräsentiert diese Bande sogar das Hauptprodukt.

3 Ergebnisse und Diskussion

Die Dimerisierung ist auf die selbstkomplementäre (palindromische) Struktur der überhängenden Enden zurückzuführen, die durch Restriktion mit EcoRI und HindIII erzeugt werden (Abb. 69). Bei Raumtemperatur spielt die Assoziation der sticky-ends keine Rolle, da sie auf der Wechselwirkung von lediglich vier Basen beruht und somit keine stabilen Dimere gebildet werden. Die Ligation wurde jedoch bei 10°C durchgeführt. Selbst wenn sich bei dieser Temperatur nur kleine Mengen des Assoziates bilden, kann die dimere Struktur durch die Ligation kovalent fixiert und so dem Gleichgewicht entzogen werden. Dabei entstehen „symmetrische“ Produkte, die für die weiteren Hybridisierungsexperimente mit dem Dreiblockcopolymeren S2-PEO-S1 nicht geeignet sind. Bei der Ligation mit beiden Oligos im gleichen Ansatz (Abb. 68, Spur 3) wird die Dimerbildung zu großen Teilen unterdrückt, da die Oligos offenbar bevorzugt angelagert werden.

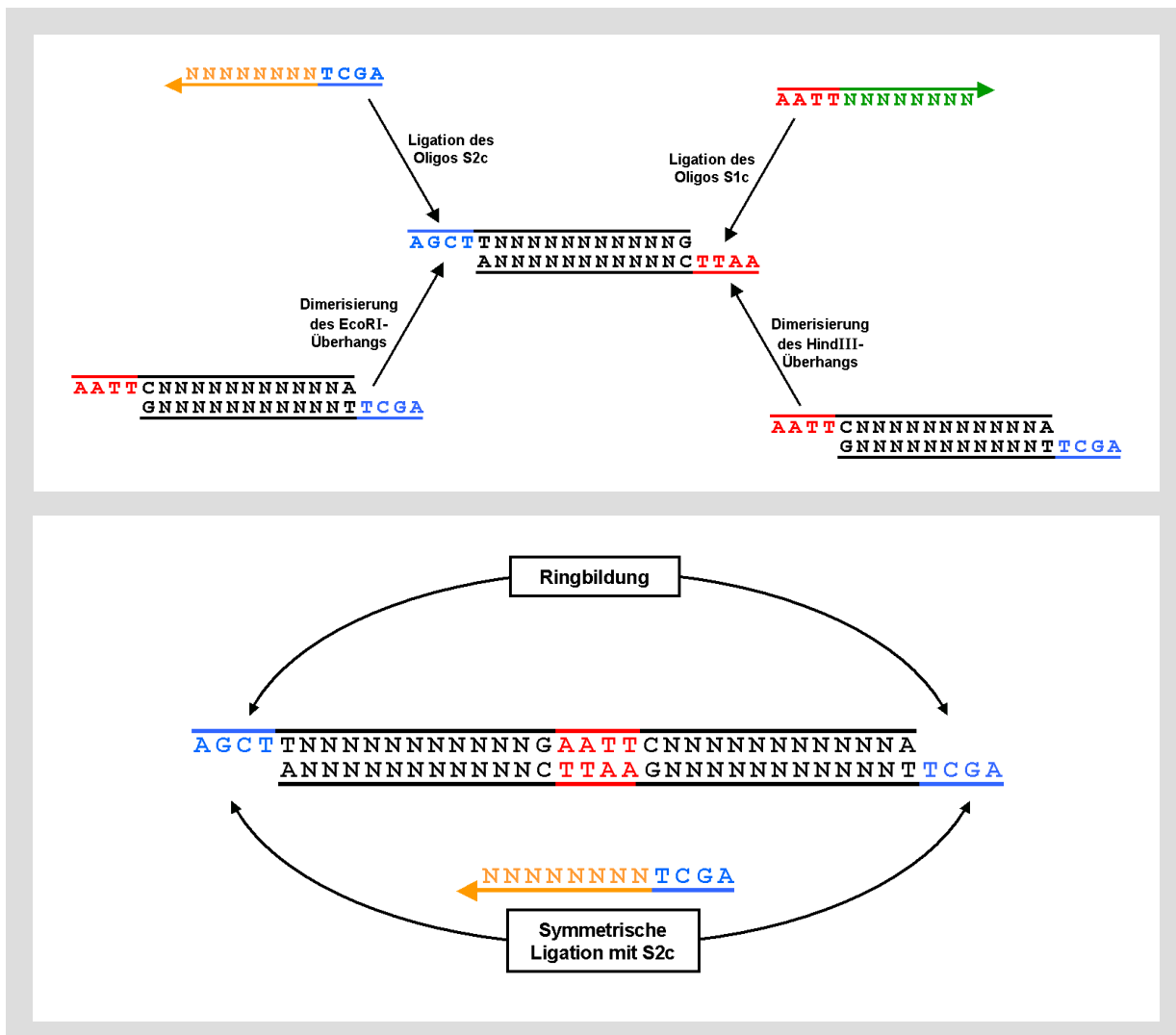


Abb. 69: Assoziation von selbstkomplementären (palindromischen) überstehenden Enden aus der Restriktion: Endonukleasen der Klasse II bilden in den meisten Fällen selbstkomplementäre sticky-ends (EcoRI: AATT, HindIII: AGCT). Oben: Im Ligationsansatz können neben dem „asymmetrisch“ doppelt ligierten Fragment zwei „symmetrische“ Dimere gebildet werden. Theoretisch wären auf diese Weise auch multimere Strukturen denkbar. Unten: Die Symmetrie der gebildeten Dimere führt dazu, dass sowohl eine Ringbildung, als auch eine symmetrische Ligation mit zwei Äquivalenten des entsprechenden Oligos erfolgen kann.

Es liegt also eine Mischung vor, in der die beiden möglichen „symmetrischen“ Dimere, das „asymmetrische“ doppelt ligierte Fragment und evtl. gewisse Anteile von einseitig oder nicht ligierten dsDNA-Fragmenten enthalten sind. (Für eine Unterscheidung der dsDNA-Fragmente, die beide, ein oder kein Oligonukleotid tragen reicht die Auflösung der verwendeten Gelelektrophorese nicht aus.) Ringförmige Dimere und multimere Strukturen werden in der Gelelektrophorese nicht beobachtet. Durch die gebildeten Nebenprodukte ist die Herstellung einer exakt stöchiometrischen Mischung nicht mehr möglich. Die Probelösung wurde aber trotzdem für einen ersten Test der Hybridisierungsfähigkeit des biosynthetischen Triblockpolymeren eingesetzt.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Gelelektrophorese (32 % der PCR-Produkte sind in Dimeren gebunden, 68 % liegen in monomerer Form vor), zeigt der verwendete Ligationsansatz im AFM in erster Linie monomere dsDNA-Fragmente mit einer Konturlänge von ca. 200 nm (Abb. 70 A). Von insgesamt 84 PCR-Produkten liegen 29 % in dimerisierter Form, 65 % als Monomer und 2,4 % als ringförmiges Dimer vor. (Vor der Zugabe des Triblockcopolymeren ist die Ringbildung nur bei dimeren dsDNA-Fragmenten möglich, die an beiden Seiten über die kurzen palindromischen Überhänge der Restriktionsenzyme aneinander ligiert wurden.) Neben diesen Molekülen treten drei Strukturen mit deutlich kürzeren Konturen auf. Ob es sich hierbei tatsächlich um Moleküle mit geringerer Molmasse handelt oder ob diese Fragmente während der Messung durch die AFM-Spitze von anderen Molekülen abgetrennt wurden ist unklar.

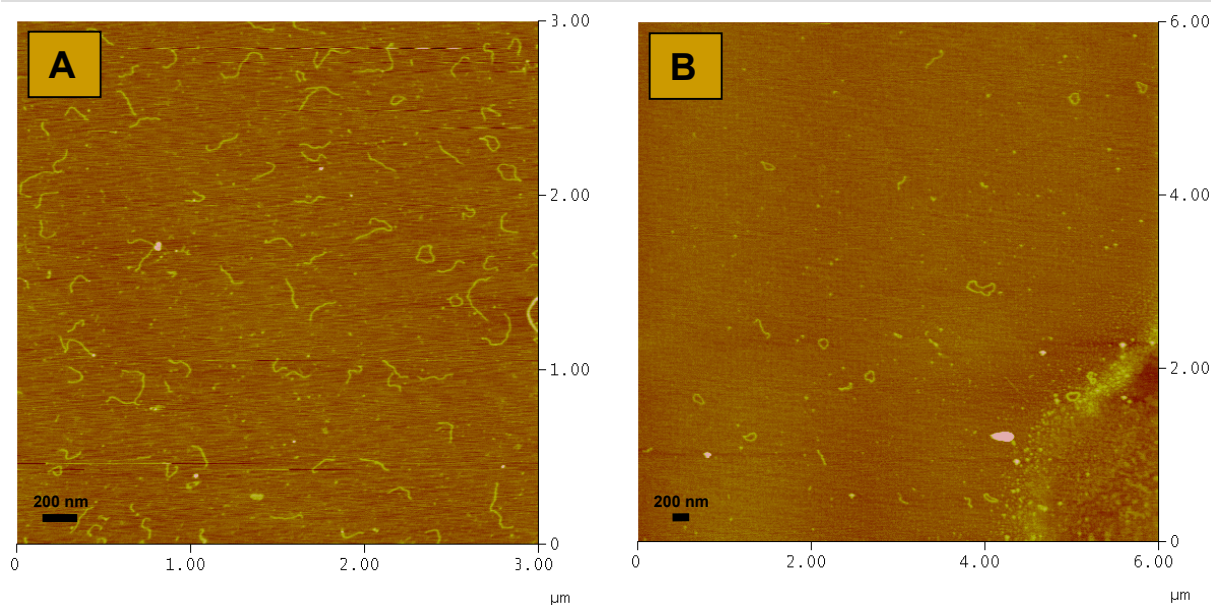


Abb. 70: Hybridisierung der beidseitig ligierten Probe mit einem DNA¹-PEO-DNA²-Dreiblockcopolymer (S2-PEO-S1), tapping-mode AFM auf Mica. A: Probelösung nach der Ligation von F2A mit S1c und S2c, B: Hybridisierung des Ligationsansatzes mit S2-PEO-S1. (S1 ist komplementär zu S1c und S2 zu S2c.) Die Hybridisierung mit dem Dreiblockcopolymer führt in den meisten Fällen zur Ringbildung.

Die Hybridisierung mit dem Dreiblockcopolymer (Abb. 70 B) führt in den meisten Fällen zur Ringbildung. Obwohl die Konzentrationen des Ligationsansatzes und der Hybridisierungslösung annähernd identisch sind, zeigt die Probe nach der Hybridisierung in einem viermal größeren Bildausschnitt nur noch 32 PCR-Produkte, d.h. die Belegungsdichte ist zehnmal kleiner als vor der Hybridisierung. Ob dieser Effekt durch die experimentellen Rahmenbedingungen bei der Hybridisierung oder durch die Probenpräparation für das AFM verursacht wird konnte nicht geklärt werden. Von den 32 PCR-Produkten sind 63 % an ringförmigen Dimeren und 12,5 % an ringförmigen Tetrameren beteiligt. Die restlichen Moleküle verteilen sich gleichmäßig auf lineare Dimere und Monomere. Der Anteil von monomere PCR-Produkten wird also durch die Hybridisierung um einen Faktor von 2,6 erniedrigt. Die Effektivität der Hybridisierung mit dem Dreiblockpolymer kann aus diesen Ergebnissen nicht zuverlässig quantifiziert werden, da bereits im Ligationsansatz dimere Strukturen auftreten und die Ausbeute der Ligation nicht bestimmt werden konnte. (Bei 32 bzw. 84 Molekülen ist es natürlich ohnehin ziemlich gewagt aussagen über die Probe machen zu wollen.)

3.3.3 Mögliche Modifikationen des Ligationsexperiments

Die Oligonukleotide werden mit ihrem phosphorylierten 5'-Ende an das dsDNA-Fragment gebunden. Die von Natur aus vorhandenen 5'-Phosphatgruppen der dsDNA sind an dieser Ligation nicht beteiligt. Durch eine Dephosphorylierung der dsDNA kann daher die Ligation zwischen zwei Restriktionsfragmenten ausgeschlossen werden. Die Assoziation zu unerwünschten Dimerstrukturen ist zwar immer noch möglich, die gebildeten Assoziate werden aber nicht mehr kovalent fixiert. Durch den Einsatz eines größeren Überschusses an Oligonukleotiden im Ligationsansatz sollte es möglich sein, die Bildung unerwünschter Strukturen weiter zurückzudrängen. Zum Testen dieser Vorgehensweise wurde das isolierte 502 bp Fragment dephosphoryliert und die Ligation einmal stöchiometrisch und einmal mit fünf- bzw. achtfachem Überschuss der beiden Oligos durchgeführt. Bei diesen Experimenten konnten die Proben nach der Ligation nicht mehr im Gel detektiert werden. Auch nach einer erneuten Kultivierung, Isolierung und Restriktion von drei anderen Klonen, die jeweils nur eine EcoRI- bzw. HindIII-Schnittstelle enthielten, konnte diese Problematik nicht zufriedenstellend gelöst werden.

3.3.4 Zusammenfassung

Es wurden zwei verschiedene Möglichkeiten vorgestellt, die Polymerase Kettenreaktion und die Replikation von Plasmiden in bakteriellen Zellen, die zur Erzeugung von dsDNA-Fragmenten mit klar definierter Länge geeignet sind. Die offensichtlichsten Unterschiede, die sich aus der Art der Vervielfältigungsmethode ergeben, liegen im Zeitaufwand und der erzeugbaren Probenmenge. Die vorgestellte Variante der PCR liefert knapp 4 µg DNA aus einem 500 µl Ansatz. Das verwendete Gerät bietet 40 Probenplätze. Die Probenvorbereitung, Durchführung der PCR und die anschließende Aufarbeitung der Proben ist gut an einem Tag zu bewältigen. Mit dem beschriebenen Vorgehen können demnach ca. 160 µg DNA an einem Arbeitstag erzeugt werden. Die Kultivierung von DNA in E. coli ist im Vergleich dazu sehr viel zeitaufwändiger. Probenpräparation, Kultivierung und Aufarbeitung nehmen etwa 4-6 d in Anspruch. Dieser Zeitraum beinhaltet aber 1 - 2 d, die lediglich für das Wachstum der Bakterien benötigt werden und somit keine Arbeit verursachen. Aus einem großen Ansatz (1 L Nährmedium) können in dieser Zeit ca. 2,5 mg DNA gewonnen werden. Letztlich ist also diese Methode trotz der langwierigen Arbeitsschritte deutlich effektiver. Für das Volumen der Kulturlösung bestehen keine prinzipiellen Grenzen, es wird lediglich durch apparative Möglichkeiten beschränkt. Insofern ist diese Methode zur Erzeugung großer DNA-Mengen besser geeignet als die PCR. Ein weiterer Vorteil liegt in der Spezifität der Vervielfältigung. Die Selektion zwischen rekombinanten Plasmiden und solchen die kein Integrat tragen, erfolgt erst auf Ebene der Zellen und ist absolut eindeutig. Bei der anschließenden Kultivierung werden keine Nebenprodukte gebildet.

Es gibt aber auch konzeptionelle Unterschiede: Die Kultivierung von DNA in Bakterien ist durch die Natur der Sache auf replikationsfähige Ausgangsmaterialien angewiesen. Bei dem gezeigten Verfahren wird die Länge des erzeugten DNA-Fragments durch die Länge des verwendeten Integrats vorgegeben. Für die Herstellung von dsDNA-Fragmenten mit unterschiedlichen Längen müsste also ein sehr komplexes Integrat konstruiert werden, das in verschiedenen Abständen die Möglichkeit zur selektiven Restriktion bietet, oder es müsste für jede Fragmentlänge separat ein passender Klon hergestellt werden. Ist der entsprechende Klon erst einmal in die Zelle eingeführt, liefert die Kultivierung immer wieder absolut zuverlässig das gleiche Produkt. Die PCR ist in Bezug auf Länge und Sequenz des Amplifikats sehr viel flexibler. Durch geeignete Wahl der Primer kann jeder beliebige Abschnitt einer Templat-DNA vervielfältigt werden. Die Reaktionsbedingungen müssen jedoch auf das jeweils verwendete Primerpaar und die Templat-DNA optimiert werden, d.h. letztlich ist die PCR deutlich anfälliger gegenüber der Bildung von Nebenprodukten.

Ein weiterer entscheidender Unterschied zwischen den beiden Methoden liegt in der Art der gebildeten Nebenprodukte: Wird das komplette Plasmid in Bakterien vervielfältigt muss das erwünschte DNA-Fragment nach der Restriktion vom restlichen Plasmid abgetrennt werden. Dieses Trennproblem ist nicht trivial, da sich die DNA Fragmente im gezeigten Fall nur um einen Faktor 4 in ihren Massen unterscheiden. Die präparative Gelelektrophorese ist zwar in der Lage solche Fragmente aufzutrennen, die Ausbeuten sind aber relativ schlecht und die maximale Probenmenge liegt deutlich unterhalb von einem Milligramm. Eine Trennung mit Probenmengen im Milligrammbereich sollte prinzipiell durch eine entsprechend optimierte Größenausschlußchromatographie möglich sein, ist aber sicherlich nicht ganz einfach. Erste Versuche mit der präparativen Ultrazentrifuge im linearen Saccharosegradienten (5-20 % Saccharose) zeigten eine sehr gute Auftrennung. Die Grenzen dieser Methode, bezüglich der maximalen Probenmenge, Trennleistung und Ausbeute an gereinigter DNA lassen sich anhand der Ergebnisse noch nicht einschätzen. Im Fall der PCR spielt die Abtrennung von Plasmidresten keine Rolle, da hier der Vervielfältigungsfaktor während der Amplifikation so groß ist, dass die Templat-DNA im Produkt nicht detektierbar ist. Nach der Restriktion müssen daher nur DNA-Fragmente abgetrennt werden die deutlich kleiner sind als das erwünschte Produkt. Dieses Trennproblem ist sehr viel einfacher zu bewältigen als im Falle der Restriktion des rekombinanten Plasmids. Da es außerdem mit der standardmäßigen Abtrennung von Primern vergleichbar ist, stehen verschiedene etablierter Methoden zur Verfügung, wie z.B. die selektive Fällung, Adsorption an Silika, Dialyse oder Ultrafiltration.

Bei der Ligation der Oligos an die kurzen überhängenden Enden der Restriktionsfragmente zeigte sich schließlich ein konzeptionelles Problem des beschriebenen Synthesewegs: Da die von Endonukleasen der Klasse II erzeugten überhängenden Enden typischer Weise eine palindromische Sequenz zeigen, tritt bei der Ligation eine Konkurrenz zwischen der Anlagerung des Oligos und der Dimerbildung über gleiche Enden des Restriktionsfragments auf. Obwohl es möglich ist die Ligation von zwei dsDNA-Fragmenten durch eine vorherige Dephosphorylierung zu unterbinden, konnte keine zufriedenstellende Verknüpfung der Oligonukleotide mit dem dsDNA-Fragment nachgewiesen werden. Eine weitere Möglichkeit, die Dimerisierung der Restriktionsfragmente zu unterbinden, liegt in der Verwendung von Endonukleasen mit nicht palindromischen Erkennungssequenzen. Eine Datenbankrecherche nach Klonen bzw. Plasmiden, die zwei entsprechende Schnittstellen im passenden Abstand aufweisen, blieb jedoch erfolglos. Es muss also ein ganz neues Konzept zur Synthese der dsDNA-Bausteine entwickelt werden.

3.4 Integration neuer Sequenzabschnitte durch PCR

Wie bereits im letzten Abschnitt dargestellt, ist die PCR die deutlich flexiblere Vervielfältigungsmethode. 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. Nach dem im letzten Abschnitt vorgestellten Konzept ist man jedoch auf die passende Lage von geeigneten Restriktionsstellen angewiesen. Dieses Problem kann durch eine kleine Modifikation der verwendeten Primer gelöst werden: Primer müssen nicht zwangsläufig vollständig komplementär zur Sequenz des Templats sein, entscheidend ist nur das zur Verlängerung genutzte 3'-Ende. Nach einer Primer-Sequenz von typischer Weise 18-22 Basen, die durch das Templat vorgegeben ist, kann am 5'-Ende der Sequenz eine beliebige Basenfolge angehängt werden. Diese darf natürlich zu keiner anderen Stelle des Templats komplementär sein. Der angehängte Sequenzabschnitt wird durch die erste Verlängerung des Primers an den Tochterstrang gebunden. Im zweiten Zyklus wird die komplementäre Sequenz des eingefügten Abschnitts synthetisiert, so dass in den folgenden Zyklen eine exponentielle Vervielfältigung des modifizierten DNA-Fragments erfolgt.

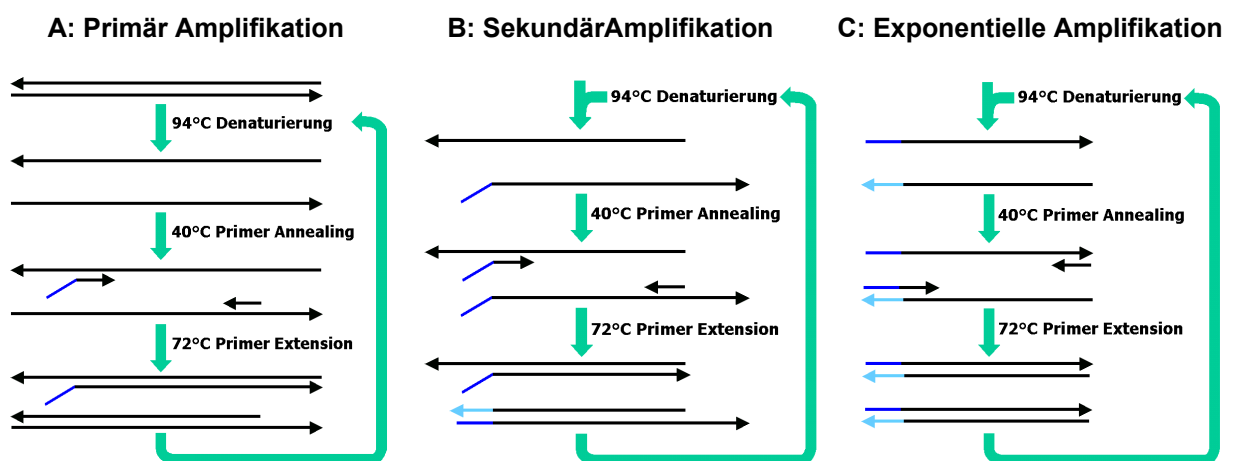


Abb. 71: Einführung beliebiger Sequenzen durch teilkomplementäre Primer. Im ersten Zyklus der Amplifikation (A) wird der teilkomplementäre Primer verlängert. Im zweiten Zyklus (B) kann die neu eingeführte Sequenz bereits als Templat für die Synthese des Gegenstrangs dienen. Anschließend erfolgt die exponentielle Vervielfältigung der modifizierten Sequenz (C).

Mit dieser Methode könnte der den im letzten Abschnitt beschriebenen Syntheseweg weiter verfolgt werden: Mit zwei teilkomplementären Primern wäre es möglich die Erkennungssequenzen von beliebigen Endonukleasen mit nicht palindromischen Erkennungssequenzen an den beiden Enden des PCR-Produkts einzuführen. Die Länge des amplifizierten Segments wäre somit frei variierbar und völlig unabhängig von der Wahl der Nukleasen. Hinter der Erkennungssequenz sollte eine „Spacer-Sequenz“ von einigen Basen eingefügt werden, da die Effektivität von Endonukleasen durch eine zu direkte Nähe des DNA-Endes negativ beeinflusst werden kann.

Die Möglichkeit durch die Primer eine beliebige Sequenz in das PCR-Produkt einzubauen, liefert aber noch einen deutlich effektiveren Syntheseweg. Die Primersequenz kann während der Festphasensynthese mit 2'-Desoxyuridin modifiziert werden. Diese Markierung ermöglicht die selektive Spaltung des modifizierten Stranges durch die USER-Reaktion (USER = UracylSpecificExcisionReagent). Dieses Reagenz ist eine Mischung von Enzymen, die eine dUMP-Einheit aus der DNA herauschneiden. Die neu gebildeten DNA-Enden erhalten beide ihre „biologisch intakte“ Form, d.h. es wird eine 3'-OH-Gruppe und eine 5'-Phosphatgruppe gebildet. Diese Möglichkeit führt zu folgendem Syntheseansatz: Eine Oligonukleotidsequenz, die zum erwünschten sticky-end komplementär ist, wird am 3'-Ende mit 2'-Desoxyuridin modifiziert. An diese Modifizierung wird die eigentliche Primersequenz angehängt. Der komplette Sequenzabschnitt wird durch die PCR in das Amplifikat eingebaut. Durch die USER-Reaktion kann nun direkt an der Schnittstelle zwischen sticky-end-Sequenz und Primersequenz ein Einzelstrangbruch erzeugt werden. Das dabei gebildete komplementäre Oligonukleotid lässt sich unter denaturierenden Bedingungen vom PCR-Produkt abtrennen.

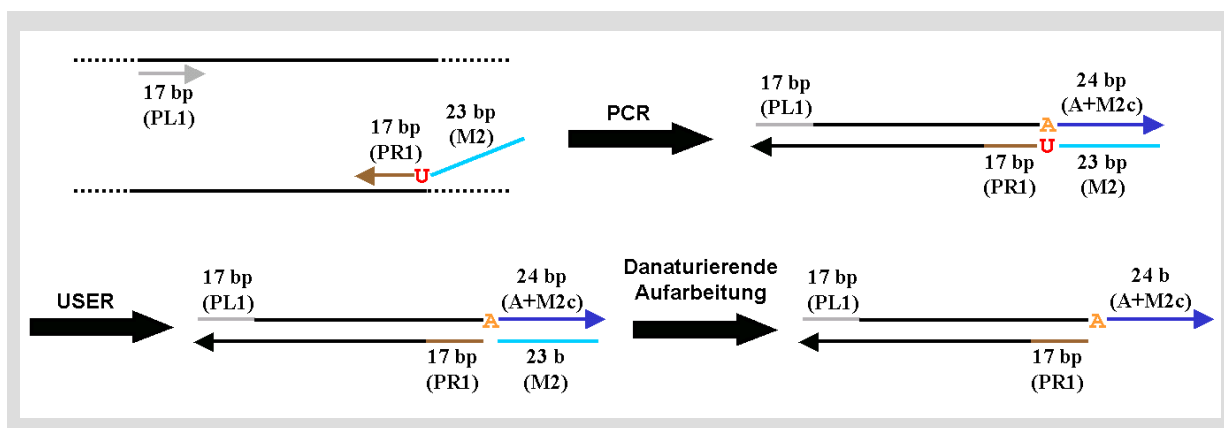


Abb. 72: Syntheschema unter Verwendung der USER-Reaktion: Die sticky-end-Sequenz wird über die Primer in der PCR eingefügt. Die anschließende USER-Reaktion führt zu einem selektiven Einzelstrangbruch. Durch die folgende denaturierende Aufarbeitung wird das sticky-end frei gesetzt.

Durch diesen Synthesansatz kann die PCR unabhängig von Restriktionsstellen innerhalb der Templat-DNA gestaltet werden, so dass sich die Fragmentlänge frei variieren lässt. Gleichzeitig können zwei Reaktionsschritte eingespart werden. Sowohl die Phosphorylierung als auch die Ligation der Oligos ist nicht mehr erforderlich. Die Aufarbeitung unterscheidet sich von der typischen Primerabtrennung nur dadurch, dass die erzeugten Oligonukleotide zum PCR-Produkt komplementär sind. Bei diesem Syntheseweg müssen jedoch zwei entscheidende Details berücksichtigt werden: Es können keine proofreading Polymerasen aus Archaeen eingesetzt werden, da sich gezeigt hat, dass diese Polymerasen spezifisch an Uracil binden und somit die PCR abgebrochen wird. (Diese Reaktion wird auf die Erkennung des Uracils als promutagene Modifizierung des Templatstrangs zurückgeführt [149]. Ähnliches gilt auch bei der Verwendung von anderen modifizierten Basen, wie z.B. Fluoreszenz-Markierungen.) Die gängigste thermophile Polymerase, die zahlreiche Modifizierungen akzeptiert, ist die Taq-DNA-Polymerase. Bei der Verwendung von Taq muss aber berücksichtigt werden, dass bei einem gewissen Anteil der PCR-Produkte ein zusätzliches Adenin an die 3'-Enden der beiden Stränge gebunden wird. Das Auftreten einer solchen Nukleotidyltransferaseaktivität wurde das erste Mal von J. M. Clark beschrieben [150]. Wie groß der Anteil an PCR-Produkten mit zusätzlichem 3'-Adenin ist, hängt sowohl vom verwendeten Temperaturprogramm [151] als auch von den Primersequenzen ab [152, 153].

Das vorgestellte Syntheschema stellt eine modifizierte Anwendung des „USER Friendly Cloning Kits“ (NEB) dar. In diesem Kit läuft die Erzeugung von sticky-ends analog zum oben gezeigten Syntheschema, die überhängenden Enden besitzen aber jeweils nur 8 Basen. Der mitgelieferte linearisierte Vektor (pNEB206A) trägt die zu den sticky-ends komplementären überstehenden Enden. Durch die unterschiedlichen Sequenzen der sticky-ends wird das Integrat, im Unterschied zu „normalen“ Klonierungs Experimenten, in einer vorgegebenen Orientierung eingebaut. Das experimentelle Vorgehen ist hierbei sehr simpel. Die Reaktionslösung aus der PCR wird ohne vorherige Aufarbeitung mit dem linearisierten Vektor und dem USER-Enzym gemischt und für 15 min bei 37°C inkubiert. (Bildung des Einzelstrangbruchs.) Nach weiteren 15 min bei RT (Anlagerung der sticky-ends von Vektor und Integrat) erfolgt die Transformation. Mit diesem Verfahren können laut Hersteller aus 20 ng des linearisierten Vektors (ca. 7×10^9 Moleküle), bei dreifachem Überschuss an Integrat, durchschnittlich 10^5 rekombinante Zellklone generiert werden (d.h. 0,001%).

Dieses Standardprotokoll unterscheidet sich in zwei wesentlichen Punkten von dem oben beschriebenen Syntheseplan: Durch die Transformation und anschließende blau-weiß Selektion (vgl. Abschnitt 2.5) werden alle DNA-Strukturen aussortiert, bei denen die Anlagerung

zwischen Vektor und Integrat nicht funktioniert hat. Diese Möglichkeit der Selektion ist bei dem vorgestellten Syntheseplan nicht gegeben. Aus diesem Grund kann eine schlechte Ausbeute bei der USER-Reaktion bzw. eine unvollständige Abtrennung der erzeugten Oligonukleotide nicht toleriert werden. Es muss also eine Methode zur Detektion und Abtrennung der gebildeten Einzelstränge entwickelt werden. Der zweite Unterschied liegt in der Länge der sticky-ends. Diese soll um einen Faktor 3 erhöht werden (24 b statt 8 b), um eine bei RT stabile Hybridisierung zu ermöglichen. Die erhöhte thermische Stabilität wird zu einer erschwerten Abtrennung der komplementären Oligos führen.

3.4.1 PCR mit uridinmodifizierten Primern

Als Templat für die PCR diente das mitgelieferte, linearisierte Plasmid pNEB206A. Auf dieser Sequenz wurden mehr oder weniger willkürlich zwei Abschnitte im Abstand von ca. 600 bp ausgewählt, die sich als Primersequenzen anbieten [154, 155]. Zur Etablierung der PCR-Bedingungen wurden diese Primersequenzen mit den im „USER Friendly Cloning Kit“ beschriebenen sticky-end-Sequenzen versehen, um einen störenden Einfluss durch die Verlängerung der überstehenden Enden zunächst ausschließen zu können. Mit den in Abb. 73 gezeigten Primern, wird ein klar definiertes Produkt der erwarteten Größe erhalten (Abb. 74). Templatkonzentrationen von 1 ng/ml bzw. 0,1 ng/ml liefern identische Ergebnisse.

Verwendete Primer:

PL1: Primersequenz L1 (grau), sticky-end-Sequenz U1 (grün)

5'-GGA GAC AUG TCT ATT TCG TTC ATC C-3'

PR1: Primersequenz R1 (braun), sticky-end-Sequenz U2 (cyan)

5'-GGG AAA GUA AGT TCT GCT ATG TGG C-3'

Schmelzpunkte: PL1: T_m (nur Primer-Sequenz) = 44,9 °C
 T_m (komplette Sequenz mit U = T) = 62,2 °C

PR1: T_m (nur Primer-Sequenz) = 48,85°C
 T_m (komplette Sequenz mit U = T) = 63,43 °C

Abb. 73: Uridinmodifizierte Primer: Die kurzen sticky-end-Sequenzen wurden aus dem „USER Friendly Cloning Kit“ (NEB) übernommen. Die Berechnung der Schmelzpunkte erfolgte mit dem OnlineTool „OligoPerfect™ Designer“ von Invitrogen [156]. Die Berechnungen beruhen auf dem Nearest-Neighbour Verfahren von Breslauer et al. [157]. Die komplette Sequenz der verwendeten Templat-DNA (pNEB206A), die Annealing Sites der Primer, so wie die Restriktionskarte von pNEB206A und das verwendete Temperaturprogramm (PCR1.CYC) sind im Anhang wiedergegeben.

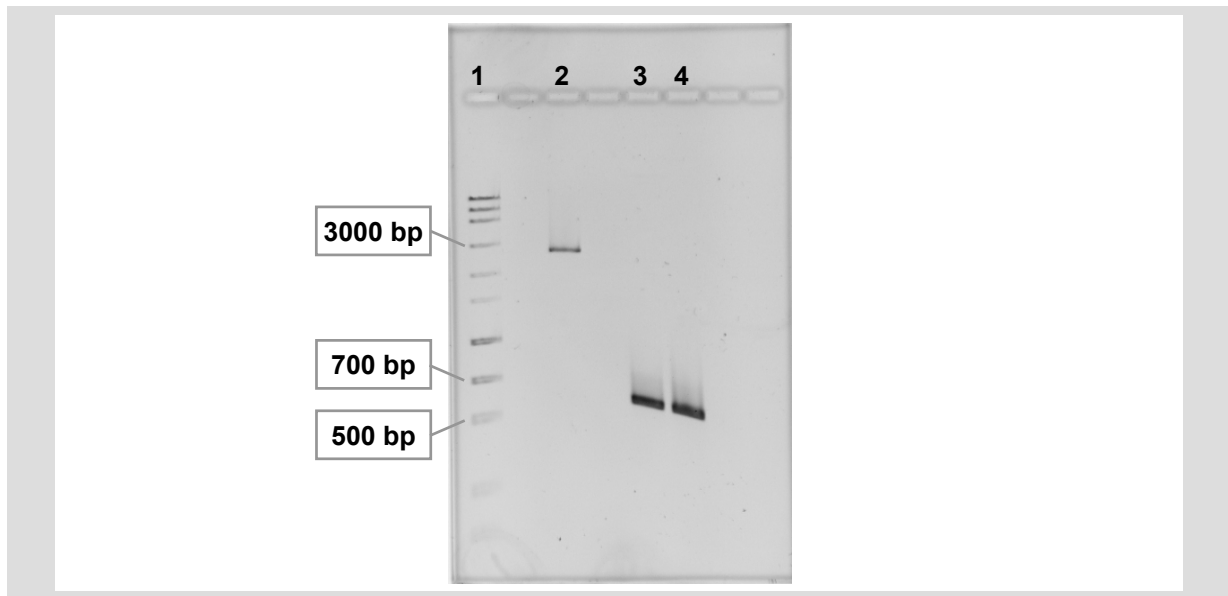


Abb. 74: PCR mit uridinmodifizierten Primern (1 % Agarose, horizontales Gel). Spur 1: MassRuler, Spur 2: pNEB206A, Spuren 3 u. 4: PCR-Produkte bei Templatkonzentrationen von 0,01 ng/ml bzw. 0,1 ng/ml. Die PCR-Produkte zeigen die erwartete Größe von ca. 600 bp, Nebenprodukte können nicht detektiert werden.

Das PCR-Produkt wurde analog zu dem oben beschriebenen Standardprotokoll in Gegenwart des linearisierten Vektors der USER-Reaktion unterzogen. Auf diesem Weg konnte keine Hybridisierung zwischen Vektor und PCR-Produkt in der Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Auch ein Versuch die komplementären Oligos nach der USER-Reaktion durch Adsorption an Silika abzutrennen, lieferte keine verbesserte Hybridisierungstendenz. Dieses Ergebnis ist auf die niedrigen Schmelzpunkte der sticky-ends mit nur 8 Basen zurückzuführen*. Das Experiment hat aber gezeigt, dass die verwendeten Primer ein sauberes Produkt liefern. Die Primersequenzen wurden daher beibehalten und die Sequenzen der sticky-ends verlängert.

Verwendete Primer:

PL2a/b: Primersequenz L1 (grau), sticky-end-Sequenz M3 (grün)

PL2a: 5'-TAG ATA GTT CTC GCA CGA CGC TAT GTC TAT TTC GTT CAT CC-3'

PL2b: 5'-TAG ATA GTT CTC GCA CGA CGC TAU GTC TAT TTC GTT CAT CC-3'

PR2: Primersequenz R1 (braun), sticky-end-Sequenz M2 (blau)

PR2: 5'-TTA CTG TGA CTT GTC CTA AGA CAU AAG TTC TGC TAT GTG GC-3'

Abb. 75: Uridinmodifizierte Primer zur Einführung von langen überstehenden Enden. Die Primersequenzen L1 (grau) und R1 (braun) wurden beibehalten, die sticky-end-Sequenzen (M3: grün, M2: blau) wurden aus der Pentamersequenz übernommen (vgl. Anhang E). Der Primer PL2a unterscheidet sich von PL2b nur durch das Fehlen der Uridinmodifizierung. Durch diese Variation können PCR-Produkte mit einem oder mit zwei überstehenden Enden erzeugt werden. Zum Teil wurden diese Primer mit einer 5'-Fluoreszenzmarkierung eingesetzt. (PL2bTXR bzw. PR2TXR, 5'-Markierung: Texas Red)

* Die Berechnung des Schmelzpunkts liefert für derart kurze Sequenzen je nach Modell sehr unterschiedliche Ergebnisse. Aus dem GC-Gehalt der Sequenzen ergibt sich ein Schmelzpunkt von 24 °C, das Nearest-Neighbour Verfahren liefert einen Wert von -1 bzw. 2 °C.

Auch mit diesen deutlich größeren nicht komplementären Abschnitten am 5'-Ende der Primer wird ein klar definiertes Produkt erhalten. Bei diesen Experimenten tritt aber zum ersten Mal ein zunächst verwirrender Effekt auf. Neben der Produktbande zeigt sich völlig unsystematisch bei einigen Proben eine relativ diffuse Bande bei etwa 100-200 bp (Abb. 76, Spur 6).

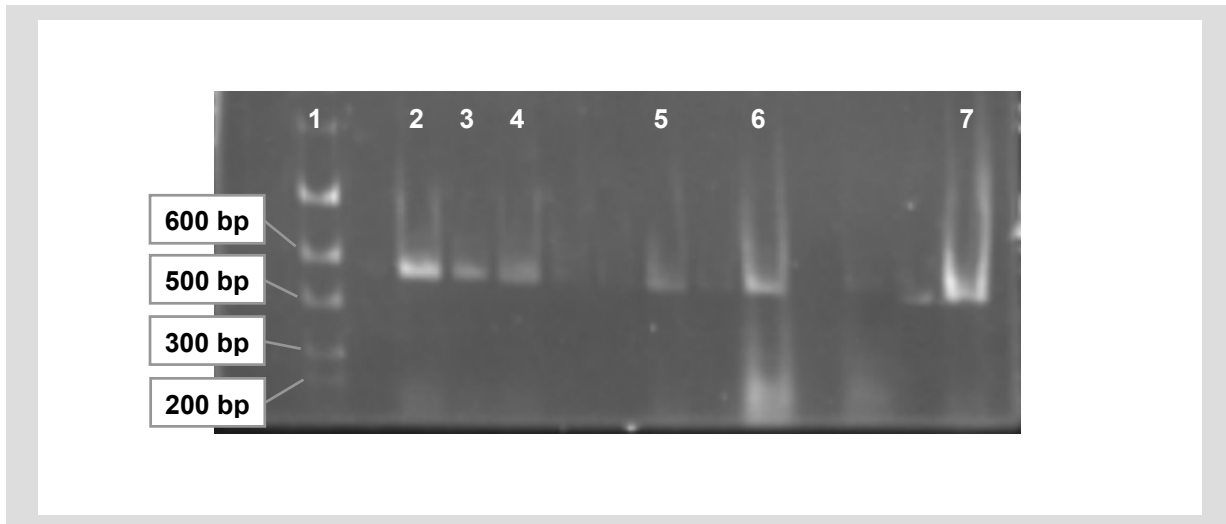


Abb. 76: PCR-Tests mit Primern für lange überstehende Enden (1 % Agarose). Spur 1: MassRuler, Spuren 2-7: PCR-Produkte aus verschiedenen Testreaktionen. Auf Spur 6 tritt zum ersten Mal eine zusätzliche Bande bei ca. 100-200 bp auf.

Durch Überprüfung der einzelnen PCR-Komponenten auf einem Gel zeigte sich, dass diese Banden auf die Primer zurückzuführen sind, obwohl man bei einer Länge von 31 Basen eine deutlich höhere elektrophoretische Mobilität erwarten würde. Diese scheinbare Verschiebung erklärt sich durch den Trennbereich des verwendeten Gels. Die Gelmatrix ist im Vergleich zu den molekularen Dimensionen bereits so weitmaschig, dass sich die Moleküle weitgehend ungehindert im elektrischen Feld bewegen können. Die maximale Migrationsgeschwindigkeit von DNA in einem Gel ist durch die elektrophoretische Mobilität in freier Lösung begrenzt. Da die elektrophoretische Mobilität von DNA in freier Lösung weitgehend unabhängig von der Molmasse ist [158], liegen die Banden aller Sequenzen, die kürzer sind als ein gewisser Grenzwert, in der Gelelektrophorese auf gleicher Höhe.

Im Unterschied zu den Erfahrungen mit der PCR des oben beschriebenen pUC18-Klons ist das hier entwickelte System gut reproduzierbar und die Ausbeute weitgehend unabhängig vom verwendeten Primerpaar. Drei gleiche, separat angesetzte Reaktionen liefern identische Ausbeuten (Abb. 77, Spur 3-5). Die Länge der sticky-end-Sequenzen (Abb. 77, Spur 3-6: 23 b, Spur 7: 8 b) bzw. die 5'-Markierung der Primer mit Texas Red (Abb. 77, Spur 2 und 8) zeigen keinen erkennbaren Einfluss auf das Ergebnis der PCR.

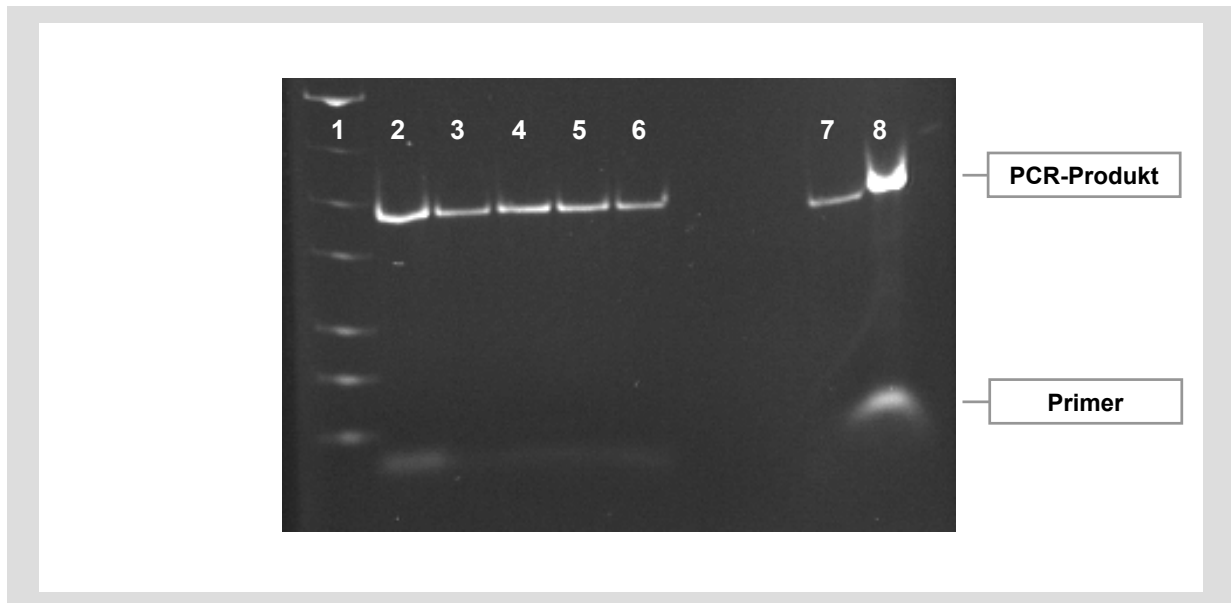


Abb. 77: Reproduzierbarkeit der PCR (2 % Agarose). Spur 1: MassRuler, Spur 2: PCR mit PL2bTXR und PR2TXR (jeweils 23 Basen im sticky-end, beide Primer sind am 5'-Ende mit Texas Red modifiziert), Spur 3-5: Drei separat angesetzte PCR's mit PL2a und PR2 (jeweils 23 Basen sticky-end-Sequenz, PL2a enthält ein Thymin an Stelle des Uridins), Spur 6: PCR mit PL2b und PR2 (jeweils 23 Basen im sticky-end, beide Primer sind uridinmodifiziert), Spur 7: PCR mit PL1 und PR1 (jeweils nur 8 Basen sticky-end), Spur 8: 5-Fache Menge der gleichen Probe wie auf Spur 2. Die gezeigten Proben wurden ohne Aufarbeitung direkt aus der PCR-Reaktionslösung genommen.

Die Ausbeute der PCR kann nicht direkt aus der Reaktionslösung bestimmt werden, da sowohl die Polymerase als auch die Primer und dNTP's die Konzentrationsbestimmung mittels UV-Absorption verfälschen. Die ersten Aufarbeitungsversuche über Dialyse bzw. NucleoSpin lieferten Ausbeuten von 1,2 bis 2,3 µg je 100 µl-Ansatz. Durch kleine Änderungen des Temperaturprogramms (Verkürzung der einzelnen Schritte bei 94°C und Erhöhung der Zyklenzahl) und eine andere Zusammensetzung der Reaktionslösung (Erhöhung der Templatkonzentration von 0,1 ng/ml auf 1 ng/ml, Einsatz von 7,5 statt 0,25 Units Taq/100 µl) konnte die Ausbeute weiter verbessert werden. Mit der im experimentellen Teil beschriebenen Versuchsvorschrift (Abschnitt 5.3.1) und den Temperaturprogrammen PCR2.CYC bzw. PCRPGEM2.CYC (vgl. Anhang F) werden nach der Aufarbeitung typischerweise 5 µg DNA (600 bp) aus einem 100 µl-Ansatz erhalten. Im Vergleich zu der im Abschnitt 2.3.1 beschriebenen PCR im 500 µl-Maßstab, konnte die Ausbeute somit um mehr als das Sechsfache gesteigert werden.

3.4.2 Aufarbeitung von PCR-Lösungen

Die quantitative Abtrennung der Primer spielt in diesem System eine ganz entscheidende Rolle, da die Primersequenzen zu den gebildeten sticky-ends komplementär sind und somit zu Störungen bei Hybridisierungsexperimenten führen. Im Verlauf der Arbeit wurden verschiedene Methoden getestet.

3.4.2.1 Selektive Adsorption an Silika

Die schnellste Methode ist die Adsorption an Silika im Spincolumn-Format (NucleoSpin Extrakt II, Macherey Nagel). Dieses System zeigt eine gute Trennleistung und hohe Rückgewinnungsraten von ca. 85-95 %. Die Säulen sind aber relativ teuer und ihre Kapazität ist auf kleine Probenmengen beschränkt (Laut Hersteller: 15 µg/Säule). In einigen Fällen trat nach der Aufarbeitung eine Verunreinigung auf, die bei kurzen Wellenlängen (< 240 nm) eine starke UV-Absorption bzw. Streuung zeigt. Bei dieser Verunreinigung handelt es sich um Pufferreste (wahrscheinlich Puffer NT) oder kleine Silikapartikel, die sich während der Zentrifugation von der Membran ablösen. Bisher konnte noch nicht geklärt werden ob diese Problematik durch Feinheiten in der praktischen Durchführung oder durch die individuellen Eigenschaften von einzelnen Säulen verursacht wird.

3.4.2.2 Dialyse

Der Unterschied in den hydrodynamischen Radien von Primern und PCR-Produkten ist in der Regel ausreichend groß, um eine Trennung mittels Dialyse zu ermöglichen. Eine PCR-Probe wurde mit dieser Methode erfolgreich aufgearbeitet. Bei stark verdünnten DNA-Lösungen treten jedoch teilweise sehr schlechte Rückgewinnungsraten auf, das Verfahren ist langwierig und die Handhabung kleiner Probenvolumen (Spectra/Por Micro DispoDialyzer, 100 µl) ist problematisch.

3.4.2.3 Ultrafiltration

Bei der Ultrafiltration biologischer Proben bietet sich der Einsatz von Zentrifugenfiltereinheiten an. Diese Methode ist über einen sehr breiten Volumenbereich (250 µl-70 ml) einsetzbar und bietet daher ein hohes Maß an Flexibilität, bezogen auf Probenmengen und Volumen. Das Trennprinzip ist in gewissem Sinne mit der Dialyse vergleichbar, ist aber deutlich schneller und liefert gerade für stark verdünnte Proben sehr viel bessere Ergebnisse. Zusätzlich bietet es die Möglichkeit die Probenkonzentration während der Aufarbeitung zu erhöhen. Bei biologischen Proben ist es oft ein großer Vorteil, wenn für das Aufkonzentrieren von Lösungen keine erhöhten Temperaturen notwendig sind. Es wurden zwei unterschiedliche Systeme mit horizontaler, bzw. vertikaler Filtermembran getestet. Das

vertikale System (Amicon Ultra, Millipore) liefert deutlich höhere Ausbeuten und ist einfacher zu handhaben, da in jedem Fall ein gewisses Probenvolumen über der Membran zurückgehalten wird. Bei Primern mit einer Größe bis 40 Basen zeigt diese Methode eine gute Trennleistung und annähernd quantitative Ausbeuten (> 90 %). Der einzige Nachteil bei der Aufarbeitung mittels Ultrafiltration (MWCO = 50 kDa) liegt in der Tatsache, dass die Taq Polymerase (M ≈ 90 kDa) nicht vollständig abgetrennt werden kann.

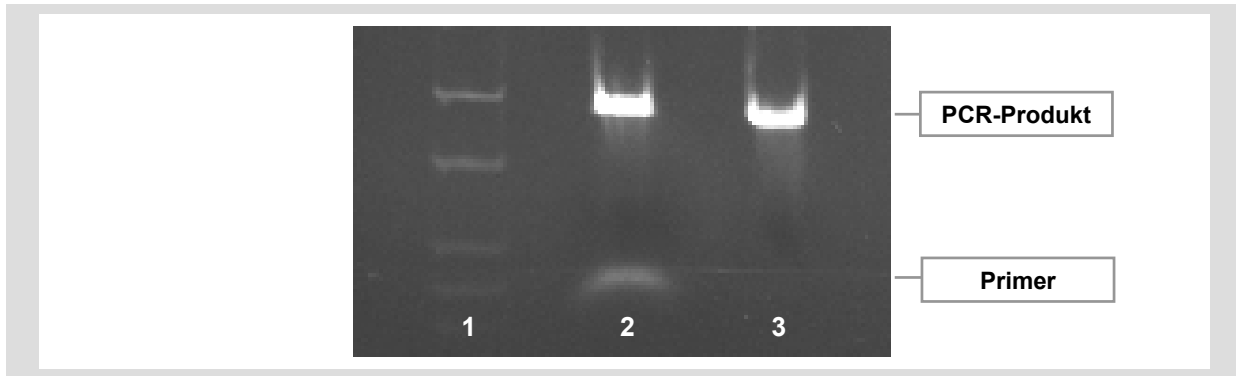


Abb. 78: Primerabtrennung durch Ultrafiltration. Spur 1: MassRuler, Spur 2 u. 3: PCR-Produkt vor und nach der Primerabtrennung durch Ultrafiltration mit Amicon Ultra.

3.4.2.4 Selektive Fällung mit Roti[®]-PCR Clean

Die selektive Fällung mit Roti-PCR-Clean (Roth) beruht letztlich auf einer Fällung der DNA mit Ethanol. Durch eine spezielle Optimierung von Salzkonzentration und anderen niedermolekularen Fällungszusätzen wurde dieses System auf die selektive Fällung von dsDNA mit mehr als 100 bp eingestellt. Kleinere Moleküle bleiben in Lösung. Die genaue Zusammensetzung der Fällungszusätze wird vom Anbieter nicht preisgegeben. Diese Methode wurde nur bei vier Proben, bei der Abtrennung der ungewöhnlich großen Primer mit PEG-Spacer (vgl. Abschnitt 3.6.3.3), eingesetzt. Hierbei zeigte die selektive Fällung eine hervorragende Trennleistung, während Trennversuchen mit NucleoSpin bzw. Ultrafiltration zu unbefriedigenden Ergebnissen führten.

Letztlich scheint die selektive Fällung die Methode mit den meisten Vorzügen zu sein. Prinzipiell gibt es hier keine Einschränkungen bezüglich des Volumens bzw. der Probenmenge. Die Durchführung ist annähernd so schnell wie die Aufarbeitung über NucleoSpin. Bei sehr großen Primern (63 Basen) mit PEG-Modifikation zeigt diese Methode bei weitem die beste Trennleistung. Zusätzlich kann davon ausgegangen werden, dass die Polymerase bei dieser Methode annähernd vollständig abgetrennt wird. Nur im Preis ist die Ultrafiltration bei großen Probenvolumen der selektiven Fällung überlegen. Die Reproduzierbarkeit und die Anwendung auf sehr verdünnte Lösungen muss bei der selektiven Fällung noch getestet werden.

3.4.3 USER-Reaktion und Nachweis der sticky-ends

Die verwendeten sticky-end-Sequenzen haben unter Standardbedingungen einen Schmelzpunkt von 52 °C bzw. 59 °C. In der Gegenwart von Mg^{2+} liegt dieser noch etwas höher. Die Bildung des entsprechenden Doppelstrangs sollte daher bei Raumtemperatur quantitativ erfolgen. Die ersten Hybridisierungsexperimente mit PCR-Produkten aus der USER-Reaktion lieferten jedoch deutlich schlechtere Ergebnisse. Aus diesem Grund musste eine Methode entwickelt werden, die eine Bestimmung der Ausbeute der USER-Reaktion und der Abtrennung der komplementären Oligos erlaubt.

3.4.3.1 Nachweisversuche mit fluoreszenzmarkierten Primern

Durch eine Fluoreszenzmarkierung der Primer mit Texas Red am 5'-Ende sollte es möglich sein, nicht abgetrennte Oligos direkt im Gel zu detektieren. Die USER-Reaktion wurde einmal nach dem Standardprotokoll und einmal mit der doppelten Menge an Enzym durchgeführt. Zum Abtrennen der gebildeten Oligos wurden die Proben 5 min bei 94°C denaturiert, auf Eiswasser abgeschreckt und über NucleoSpin gereinigt. Als interner Fluoreszenzstandard in der Gelelektrophorese wurde das Ausgangsmaterial in verschiedenen Mengen auf das gleiche Gel aufgetragen. Vor dem Anfärben der DNA mit Ethidiumbromid wird nur die Fluoreszenz der Texas Red Markierung detektiert.

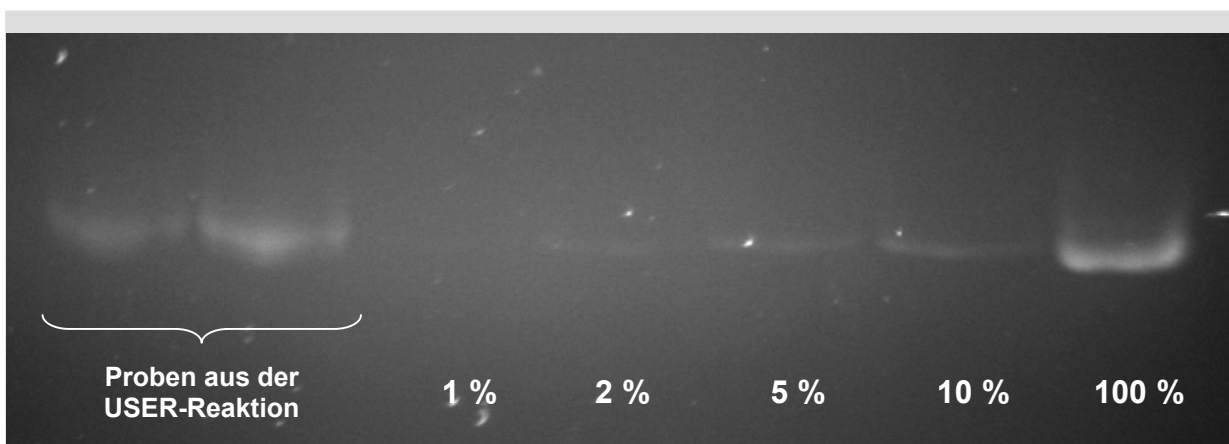


Abb. 79: Nachweis von Texas Red in Agarosegelen, 2 % Agarose. Spur 1 und 2: PCR-Produkt nach der USER-Reaktion unter Standard Bedingungen bzw. mit doppelter Menge an Enzym und Abtrennung der komplementären Oligos. Spuren 3-7: PCR-Produkt vor der USER-Reaktion. Die aufgetragenen Mengen entsprechen 1, 2, 5, 10, bzw. 100 % der eingesetzten Texas Red Intensität. Die Dokumentation des Gels erfolgte vor dem Anfärben der DNA. Die Nachweisgrenze der Fluoreszenz liegt im Bereich von 2-5 % der Ausgangsintensität.

In Abb. 79 ist gut zu erkennen, dass das PCR-Produkt nach der USER-Reaktion noch deutliche Anteile der eingesetzten Fluoreszenzintensität trägt. Ein Vergleich mit dem 100 % Standard liefert Werte von 75-80 %, d.h. entweder die USER-Reaktion oder die Abtrennung der komplementären Oligos hat nicht funktioniert. Die Nachweisgrenze von Texas Red liegt hier im Bereich von 2-5 % der eingesetzten Menge. In einem weiteren Versuch wurde die heiße

Lösung desselben PCR-Produktes aus der USER-Reaktion nicht abgeschreckt, sondern direkt auf die Silikamembran gegeben und zentrifugiert, um eine Rehybridisierung der Oligos zu vermeiden. Bei dieser Probe ist die Fluoreszenzmarkierung des PCR-Produkts im Gel nicht mehr nachweisbar (Abb. 80, Spur 1). Vor dem Anfärben des Gels können nur die Vergleichsproben mit 5 bzw. 50 % der Ausgangsintensität detektiert werden. Die starke Fluoreszenzintensität der beiden Proben in Abb. 79 ist also auf eine unvollständige Abtrennung der Oligos und nicht auf eine schlechte Ausbeute der USER-Reaktion zurückzuführen.

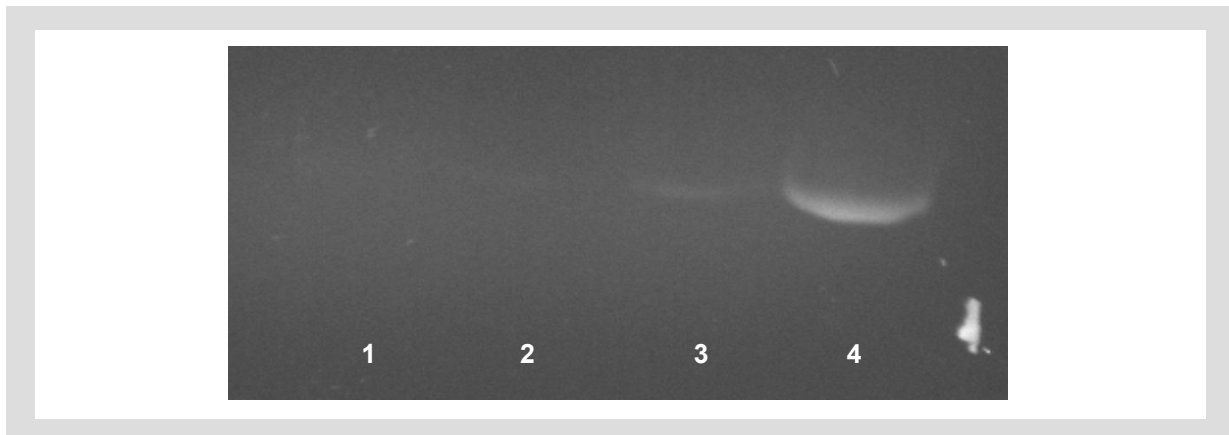


Abb. 80: Agarosegel vor dem Anfärben der DNA. Die Fluoreszenzmarkierung des PCR-Produkts (Spur 1) kann nach der USER-Reaktion nicht mehr detektiert werden. Von den Vergleichsproben sind nur die mit 5 % (Spur 3) und 50 % (Spur 4) der Ausgangsintensität zu erkennen.

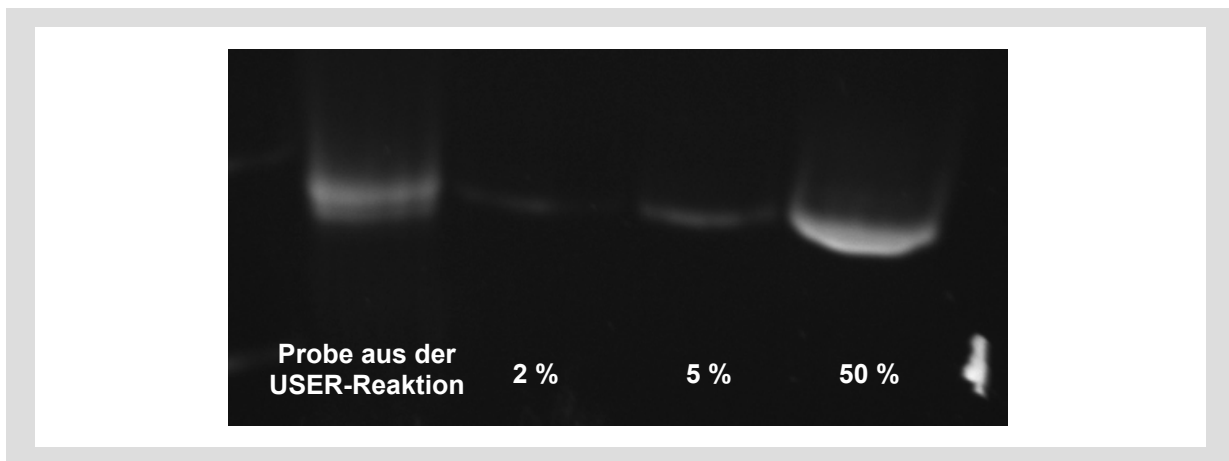


Abb. 81: Agarosegel aus Abb. 80 nach dem Anfärben der DNA mit Ethidiumbromid. Spur 1: PCR-Produkt nach der USER-Reaktion mit doppelter Menge an Enzym, Spur 2-4: Vergleichsproben mit 2, 5 bzw. 50 % der eingesetzten Menge an DNA.

Ein Vergleich der Probe nach dem Anfärben der DNA mit dem 50 % Standard zeigt jedoch, dass ein großer Teil der DNA bei der Aufarbeitung verloren geht. Die Ausbeute liegt bei ca. 35 % (Abb. 81, Vergleich von Spuren 1 und 4). In Abb. 80, Spur 3 ist zu sehen, das 5 % der ursprünglichen Fluoreszenzintensität gerade noch nachweisbar sind, d.h. im PCR-Produkt sind weniger als 14 % der sticky-ends durch die komplementären Oligos blockiert.

Die Auswertung der Fluoreszenzsignale im Gel ist aufgrund der schwachen Intensitäten der Vergleichsproben nur semiquantitativ möglich. Spektroskopische Methoden sind hier weitaus präziser, benötigen aber deutlich größere Probenmengen als die Gelelektrophorese. Die Absorptionsmaxima von reiner DNA (260 nm) und Texas Red (583 nm) zeigen keine Überschneidungen. Dadurch ist es möglich, die Ausbeute an DNA mittels UV-Absorption und die Abtrennung der komplementären Oligos mittels Fluoreszenzemission, ohne Interferenzen, an derselben Probe zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurden zehn 100 µl PCR-Ansätze parallel durchgeführt und die Primer über NucleoSpin abgetrennt. An den vereinigten Lösungen wurde ein UV-Spektrum und ein Fluoreszenzemissionsspektrum gemessen. Als Vergleichsproben wurde ein Teil der gereinigten PCR-Lösung 1:10 bzw. 1:100 verdünnt. Die Fluoreszenzintensität dieser Proben wurde verwendet um apparative Schwankungen, wie z.B. Variationen in der Intensität der Anregungsstrahlung und Abweichungen vom linearen Zusammenhang zwischen Intensität und Konzentration zu detektieren. Anschließend wurde die Probelösung in Ansätze von 45 µl aufgeteilt und der USER-Reaktion unterzogen. Zum Abtrennen der komplementären Oligos wurde das gleiche Verfahren wie zuvor verwendet. (Aufarbeitung der heißen Probelösung über NucleoSpin.) Da nach der ersten USER-Reaktion noch gut 10 % der Oligos im PCR-Produkt enthalten sind, wurde die Prozedur noch einmal wiederholt. Die Fluoreszenzspektren der verschiedenen Proben sind in Abb. 82 gezeigt.

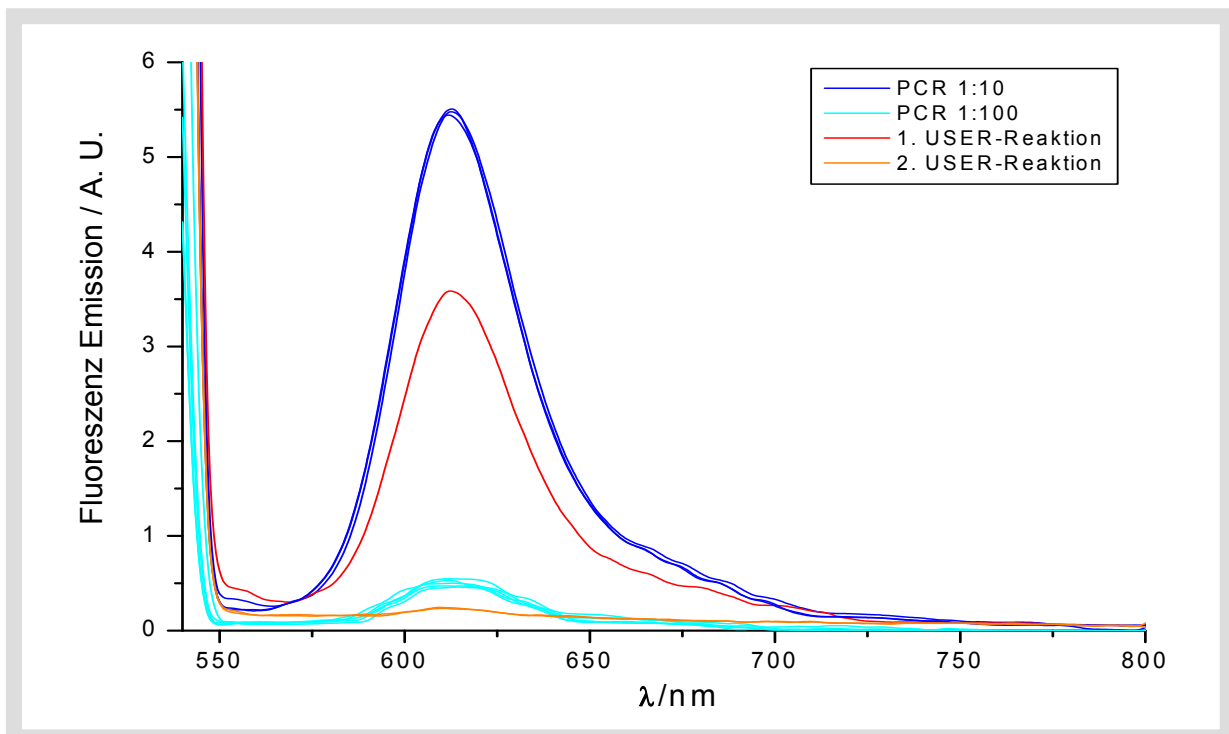


Abb. 82: Fluoreszenzemissionsspektren. Die mittleren Intensitäten der Vergleichsproben skalieren im betrachteten Messbereich linear mit der Konzentration: PCR-Produkt vor der USER-Reaktion (nicht dargestellt): $I = 53,7$ A.U., PCR-Lösung 1:10 verdünnt: $I = 5,4$ A.U., PCR-Lösung 1:100 verdünnt: $I = 0,5$ A.U. Das Emissionsmaximum liegt bei 612 nm. Wiederholungsmessungen an verschiedenen Tagen zeigen eine gute Reproduzierbarkeit. Die Anregung erfolgte bei 520 nm. Da nur die Intensitäten bestimmt werden sollten, wurde mit relativ großen Spaltbreiten gemessen ($\Delta\lambda_{\text{ex}} = \Delta\lambda_{\text{em}} = 15$ nm).

Um den Anteil der PCR-Produkte zu bestimmen, die nach der USER-Reaktion in fluoreszenzmarkierter Form vorliegen, müssen die Fluoreszenzintensitäten aus Abb. 82 durch die Ergebnisse der Absorptionsmessungen korrigiert werden. Die entsprechenden Daten sind in Tab. 6 zusammengefasst. Bereits nach der ersten USER-Reaktion tragen nur noch 12 % der PCR-Produkte eine Fluoreszenzmarkierung, d.h. 88 % der sticky-ends sollten in der erwünschten Form vorliegen. Nach der zweiten USER-Reaktion ist die Erzeugung von sticky-ends annähernd quantitativ.

Tab. 6: Zusammenfassung und Auswertung der spektroskopischen Daten aus UV-Absorption (Carry 100, Varian) und Fluoreszenz (LS50B, Perkin Elmer).

Probe	A(260nm) / A.U.	c (DNA) / %	I(max) / A.U.	Fluoreszenzmarkierte PCR-Produkte / %
Vor USER	1,25	100	53,7	100
1. USER	0,73	58	3,6	12
2. USER	0,25	21	0,2	2

Die verwendete Methode zum Abtrennen der komplementären Oligos zeigt also eine gute Effektivität, die Ausbeute an DNA ist aber relativ schlecht. Zur Bestimmung der Ausbeute müssen die DNA-Konzentrationen aus Tab. 6 mit dem jeweiligen Volumen korrigiert werden, da in diesem Experiment die Volumina vor und nach der USER-Reaktion nicht identisch waren. Es ergeben sich Ausbeuten von 53 % nach der ersten bzw. 24 % nach der zweiten USER-Reaktion. Die schlechten Ausbeuten sind auf die hohe Temperatur der Lösung während der Adsorption an die Silikamembran zu erklären. Eine Denaturierung mit Agenzien wie Harnstoff oder Formamid ist hier nicht möglich, da der verwendete Puffer durch Art und Konzentration der enthaltenen Salze auf die selektive Adsorption der doppelsträngigen DNA Fragmente > 100 bp an die Silikamembran abgestimmt ist. Die Zugabe von denaturierenden Agenzien würde daher zu einer Störung des Systems führen. Außerdem ist die Methode aufgrund der praktischen Durchführung auf kleine Probenmengen beschränkt, da jede Probe einzeln, direkt nach dem Erhitzen auf die Silika-Säulchen aufgebracht werden muss. Bei der Aufarbeitung mit Hilfe der Ultrafiltration ist der Einsatz von denaturierenden Agenzien unproblematisch, da die Filtermembranen gegen Harnstofflösungen stabil sind. Die Methode lässt sich außerdem sehr flexibel für verschiedene Probenmengen einsetzen.

Für die folgenden Experimente wurden Referenz- und Blindproben hergestellt, d.h. die PCR-Lösung wurde aufgeteilt (C1, C2: jeweils 500 µl, C3: 400 µl, C4: 80 µl). Mit C1, C2 und C3 wurde die USER-Reaktion und die folgende Aufarbeitung unter möglichst identischen Bedingungen durchgeführt. Bei C3 wurden jedoch keine Enzyme zugesetzt. C4 wurde als Referenz im Kühlschrank gelagert. Für die Aufarbeitung mittels Ultrafiltration wurden die Proben C1, C2 und C3 auf 90 °C erhitzt und anschließend in einer eisgekühlten Harnstofflösung verdünnt. Nach drei Filtrationsschritten mit Harnstofflösung wurde die Probe durch mehrfache Filtration mit Wasser vom Harnstoff befreit. Die Fluoreszenzmessungen an diesen Proben wurden an einem anderen Spektrometer mit deutlich höherer Sensitivität durchgeführt (Jasco FP-6500). Bei diesen Messungen kam es zu Interferenzen zwischen den Ramanbanden von Wasser [159] und den Fluoreszenzsignalen der Probe. Die Subtraktion des Lösungsmittelsignals liefert jedoch ein sauberes Spektrum (Abb. 83).

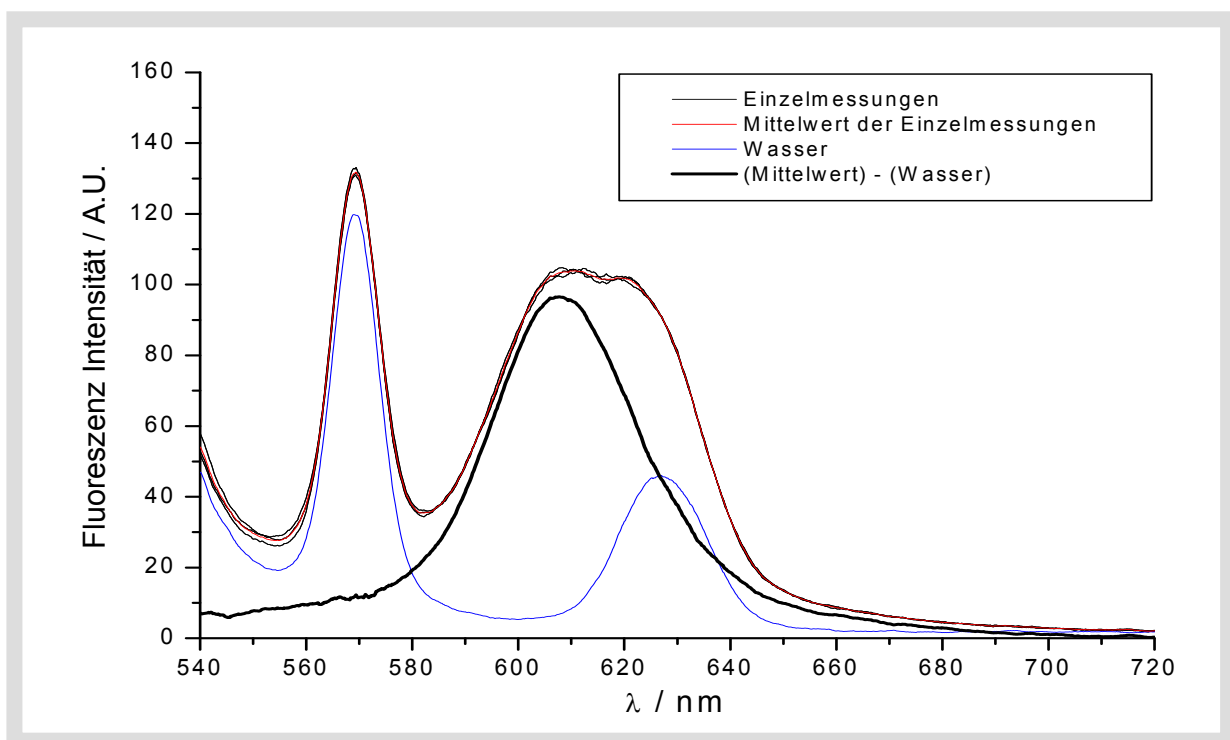


Abb. 83: Überlagerung des Ramanspektrums von Wasser mit dem Fluoreszenzsignal von Texas Red. Das resultierende Differenzspektrum ist in schwarz dargestellt. Obwohl diese Korrektur bei niedrigen Probenkonzentrationen erforderlich ist, zeigt eine Verdünnungsreihe mit 100, 10, 2, 1 und 0,5 % der verwendeten DNA-Konzentration eine hervorragende Linearität ($R^2 = 0.9999991$).

Nach der Ultrafiltration wurden C1, C2 und C3 auf ein Volumen von 500 µl verdünnt. C4 musste für die Fluoreszenzmessung 1:10 verdünnt werden, um ein ausreichendes Probenvolumen zu erhalten. Die Ausbeuten an DNA liegen bei den Proben C1, C2 und C3 zwischen 74 und 84 %, also deutlich höher als bei der Aufarbeitung über NucleoSpin. Der berechnete Anteil an abgetrennten Oligos von ca. 90 % steht in Einklang mit den Ergebnissen der oben beschriebenen Experimente. Diese Übereinstimmung kann so interpretiert werden,

dass sowohl die Aufarbeitung der heißen Lösung über NucleoSpin als auch die denaturierende Ultrafiltration in der Lage sind, die komplementären Oligos annähernd vollständig abzutrennen, die USER-Reaktion erfolgt jedoch nicht quantitativ*. Die Ergebnisse der Messungen an diesen Proben sind in Tab. 7 zusammengefasst. Die Blindprobe C3 zeigt eine viel zu geringe Fluoreszenz. Obwohl keine USER Enzyme zugesetzt wurden, können nur noch 30 % der ursprünglichen Intensität detektiert werden.

Tab. 7: Zusammenfassung und Auswertung der Spektroskopischen Daten aus UV-Absorption (Carry 100, Varian) und Fluoreszenz (Jasco FP-6500).

Probe	A(260nm) / A.U.	c (DNA) / %**	I(max) / A.U.	Fluoreszenzmarkierte PCR-Produkte / %
Vor USER	0,43	100	894	100
C1	0,36	84	71	8
C2	0,32	74	61	7
C3	0,27	78	270	30
C4	0,04	9	83	9***

Die Proben C1 bis C3 zeigen außerdem eine Verschiebung des Peakmaximums um 5-6 nm im Vergleich zur Referenzprobe C4 (Abb. 84). Die Zuverlässigkeit der Messungen wurde durch einen Vergleich der Referenzprobe C4 mit einer separat angesetzten Probe identischer Konzentration (PCR 1:10) überprüft. Die Ursache für die drastische Abnahme der Fluoreszenz von C3 konnte nicht geklärt werden. Die Stabilität des Farbstoffes gegen die Anregungsstrahlung wurde getestet. Selbst nach 1,5 h im Anregungsstrahl tritt keine signifikante Abnahme der Signalintensität auf. Bei den Messungen der Verdünnungsreihen zeigte sich die Anfälligkeit der Spektren von sehr verdünnten Lösungen gegen geringe Mengen an Verunreinigungen, wie z.B. Fingerfett. Die Blindprobe C3 hat aber ein so starkes Signal, dass diese Effekte nur eine geringe Störung verursachen würden. Auch die Zugabe von 1-10 Vol% der verwendeten Harnstofflösung hatte keinen Einfluss auf das Fluoreszenzspektrum der Proben. Die Art der verwendeten Gefäße und das Einfrieren der Probenlösung zeigten ebenfalls keinen systematischen Zusammenhang mit den erhaltenen Messwerten. Nur bei einer Probe trat

* Die Qualitätskontrolle des Herstellers bezieht sich auf ein Klonierungsexperiment, bei dem mehr als 95 % der Zellkolonien ein rekombinantes Plasmid enthalten. Genaugenommen liefert diese Qualitätskontrolle überhaupt keine Aussage über die Vollständigkeit der USER-Reaktion.

** In diesem Experiment sind die angegebenen, relativen Konzentrationen von C1, C2, und C4 mit der DNA-Ausbeute identisch, da das Probenvolumen bei diesen Proben konstant gehalten wurde. Bei der Berechnung der relativen Konzentration von C3 wurde der entsprechende Verdünnungsfaktor bereits berücksichtigt.

*** Dieser Wert ergibt sich natürlich nicht aus einer Abtrennung von markierten Oligos, sondern lediglich durch die Verdünnung der Probe.

durch das Einfrieren eine Verringerung der Fluoreszenzintensität von gut 10 % auf. Bei diesen Störungen scheint es sich also um sehr diffizile Zusammenhänge zu handeln. Es ist durchaus möglich, dass es sich bei der Blindprobe lediglich um einen „Ausreißer“ handelt. Durch die parallele Aufarbeitung mehrerer gleicher Proben sollte es möglich sein solche Ausreißer in zukünftigen Experimenten zu identifizieren. Die Verschiebung des Peakmaximums, bei den beiden Proben (C1 bzw. C2) und der Blindprobe (C3), könnte evtl. durch den in der USER-Reaktion verwendete tensidhaltige ThermoPol Puffer erklärt werden. Dieser Zusammenhang wurde aber nicht näher untersucht.

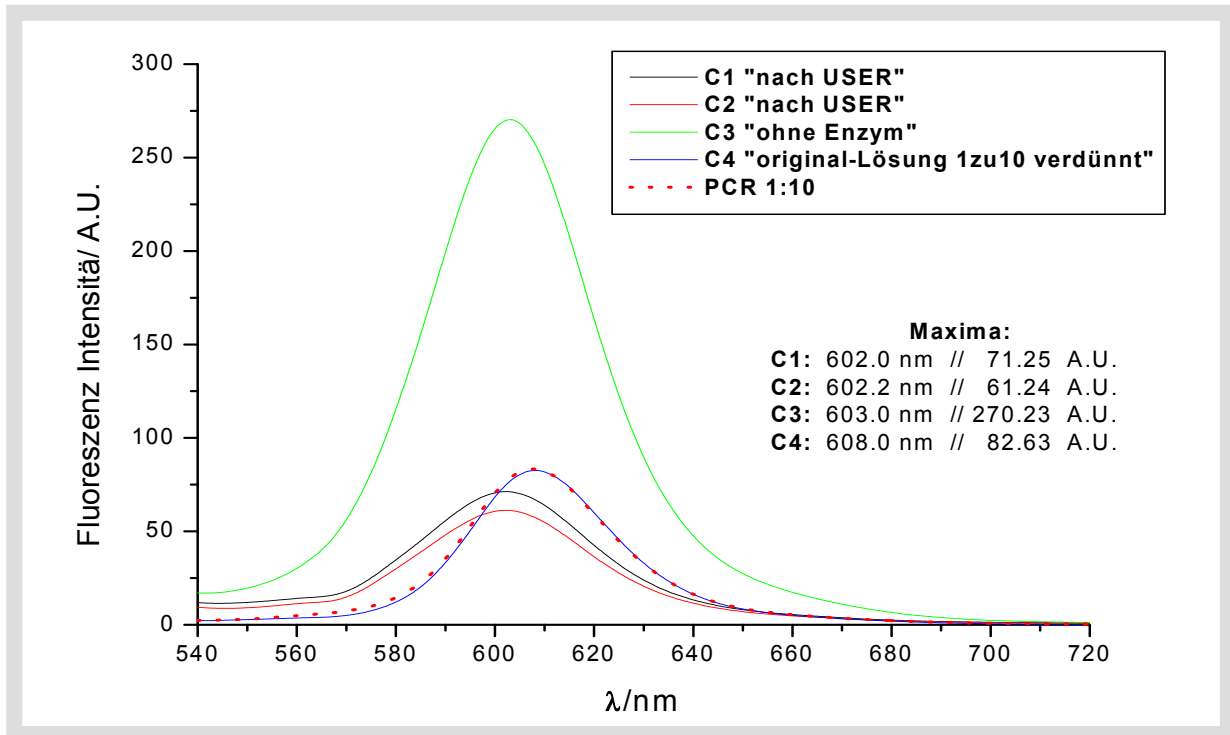


Abb. 84: Fluoreszenzemissionsspektren der Proben nach der USER-Reaktion (rot bzw. schwarz), der Blindprobe (grün) und der Referenzprobe (blau). Zum Vergleich ist die Messung der 1:10 verdünnten PCR-Lösung aus der verwendeten Verdünnungsreihen dargestellt (rote Punkte). Die Messungen wurden mit einer Anregungswellenlänge von 520 nm und $\Delta\lambda_{\text{ex}} = \Delta\lambda_{\text{em}} = 10$ nm durchgeführt.

3.4.3.2 Nachweis der sticky-ends durch Restriktionsanalyse

Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis der sticky-ends liefert die Restriktionsanalyse. Durch die Verwendung einer Endonuklease, deren Schnittstelle nur einmal kurz vor dem Ende des PCR-Produkts auftritt, können kleine DNA-Fragmente mit klar definierter Größe erzeugt werden. Diese lassen sich dann problemlos in der denaturierenden PAGE vom PCR-Produkt abtrennen. Bei kleinen einzelsträngigen Fragmenten kann die Größe relativ präzise durch den Vergleich mit dem DNA-Marker bestimmt werden. Für einen ersten Versuch wurde aus der Restriktionskarte des verwendeten Plasmids das Enzym (BcgI) entnommen, dessen Schnittstelle den kleinsten Abstand zum Ende des PCR-Produkts hat. Bei einer unvollständigen USER-Reaktion sollte neben dem Fragment mit 61 Basen ein zusätzliches Oligo mit 63 Basen

auftreten (Abb. 85, unten links). Wie in Abb. 85 unten rechts zu sehen ist, ist es möglich diesen Unterschied mit der denaturierenden PAGE zu detektieren. (Die Abbildung zeigt das Ergebnis einer misslungenen Synthese eines Oligonukleotids mit 62 Basen, bei der die Zielsequenz die gleiche Intensität wie die Fehlsequenzen aufweist.) Eine unvollständige Abtrennung der Oligos sollte ebenfalls klar erkennbar sein, da in diesem Fall eine zusätzliche Bande bei 23 Basen auftreten würde.

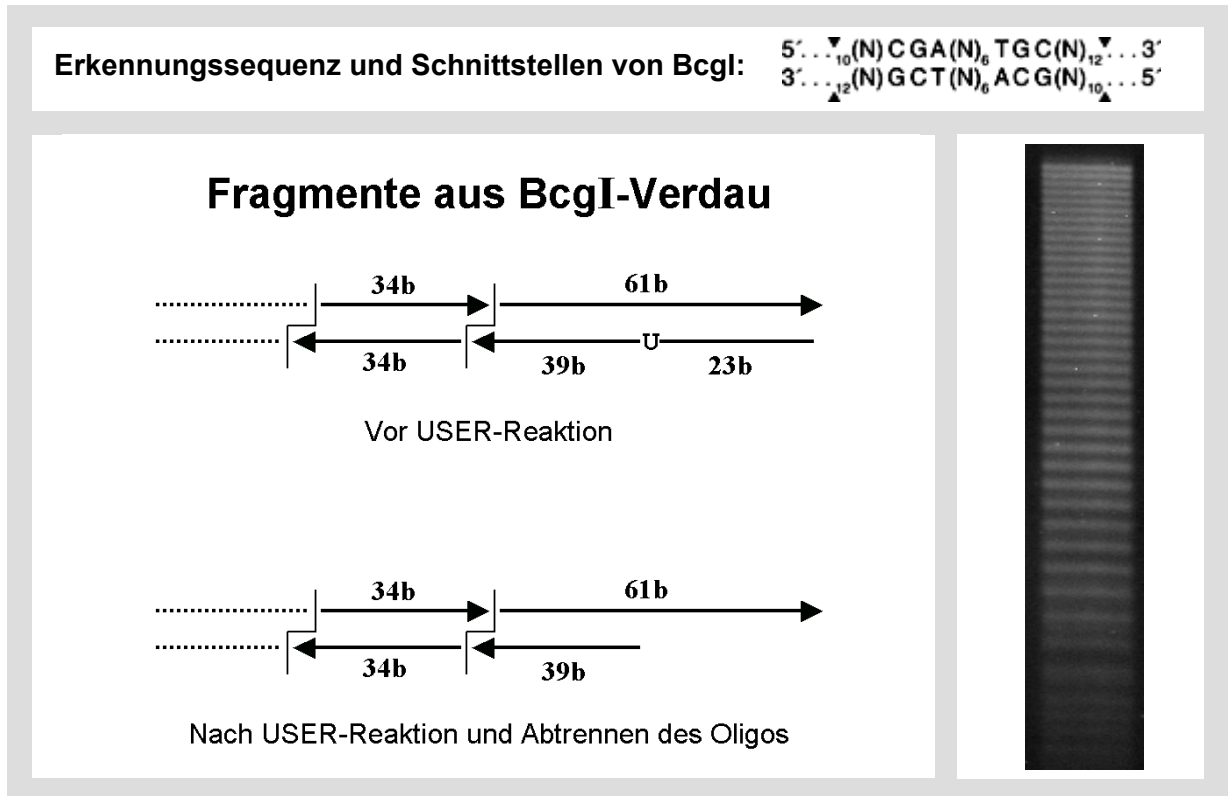


Abb. 85: Oben rechts: Erkennungssequenz und Schnittstellen von BcgI. Die Schnittstellen liegen hier außerhalb der Erkennungssequenz. Unten rechts: Auflösungsvermögen der denaturierenden PAGE. Die Abbildung zeigt die Fehlsequenzen eines Oligonukleotids mit 62 b, das auf einem 20 %igen denaturierenden Polyacrylamid Gel aufgetrennt wurde. Alle Fehlsequenzen, die sich um jeweils nur eine Base in ihren Längen unterscheiden, werden klar voneinander getrennt. Unten links: Längen der theoretisch erwarteten Restriktionsfragmente.

Für die Restriktionsanalyse wurde an einem PCR-Produkt zweimal hintereinander die USER-Reaktion und die denaturierende Ultrafiltration mit Harnstofflösung durchgeführt. Von dieser Lösung wurde 1 µg DNA mit BcgI verdaut. Die Hälfte der Reaktionslösung wurde auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Nachweisgrenze von DNA in Acrylamidgelen liegt im Bereich von 2-5 ng (vgl. Abb. 94). Wenn die Restriktion quantitativ verläuft, kann demnach die Anwesenheit von 7,7-19 % eines Fragments mit 63 b nachgewiesen werden. Das Ergebnis der Gelelektrophorese ist in Abb. 86 wiedergegeben. Ein Vergleich der erhaltenen Fragmente mit dem Marker liefert die erwarteten Größen, d.h. im Rahmen der Nachweisgrenze der Methode zeigt die Probe die erwünschte Struktur mit überstehenden Enden.

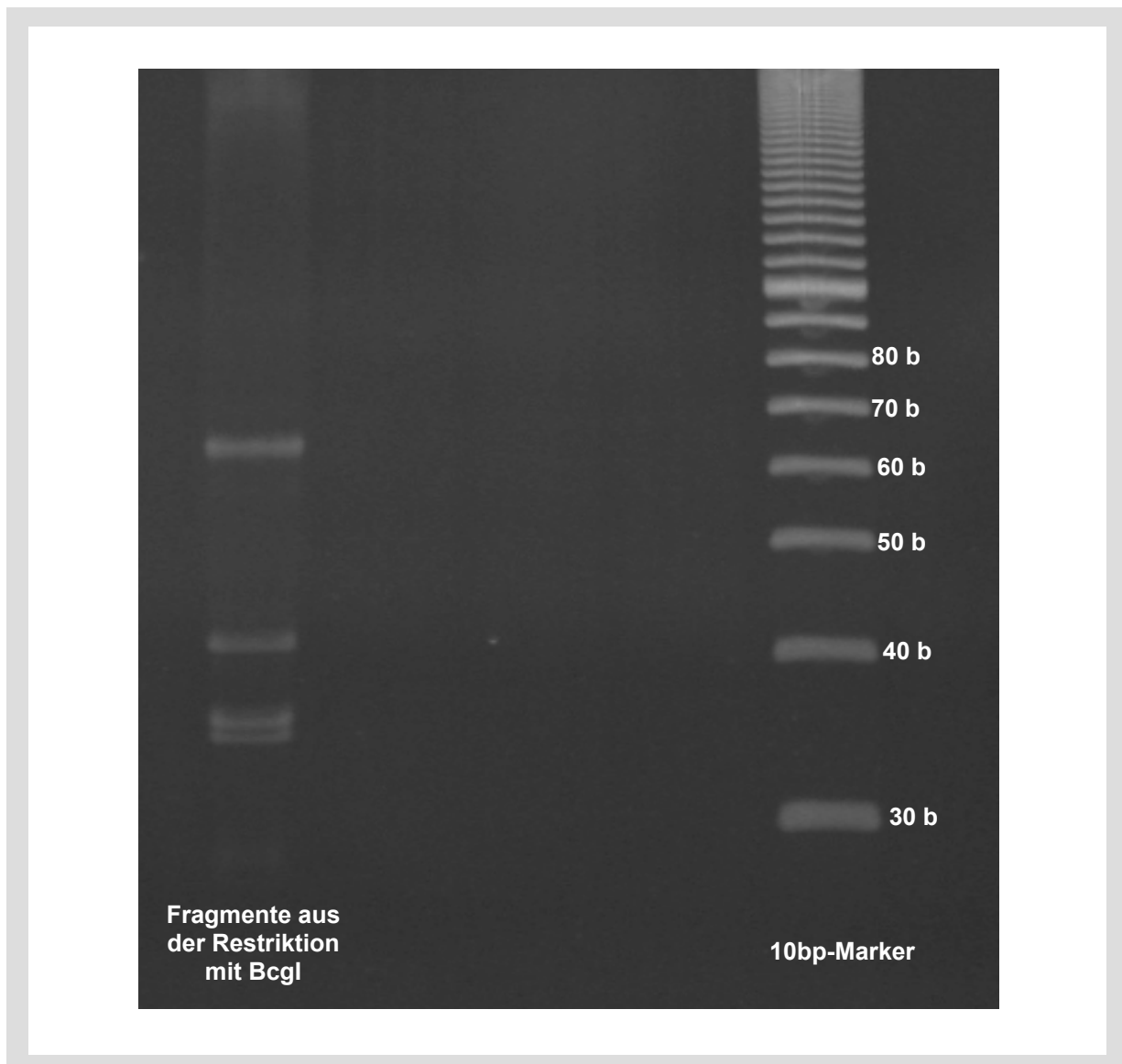


Abb. 86: Restriktionsanalyse (20 % denaturierende PAGE). Ein Vergleich der Produktbanden aus der Restriktion mit Bcgl mit der Markerspür liefert die erwarteten Größen. (Theoretisch: 61, 39 bzw. 34 Basen, Gefunden: 61, 39, 34 bzw. 33 Basen). Die Doppelbande mit 33 und 34 b wird durch ein leicht unterschiedliches Laufverhalten der beiden Fragmente mit 34 b verursacht. (Die elektrophoretische Mobilität in Acrylamid Gelen ist nicht nur von der Größe sondern in gewissem Maße auch von der jeweiligen Sequenz der DNA-Fragmente abhängig. Die Auswertung der Mobilitäten wurde mit E-Capt [Vilber Lourmat, vertrieben durch peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen] durchgeführt. Das PCR-Produkt läuft an der oberen Ausschlussgrenze des Gels.)

Neben den Mobilitäten der Banden können auch die relativen Intensitäten ausgewertet werden. Die berechneten Werte für 100 % freie sticky-ends und die erhaltenen Messwerte sind in Tab. 8 zusammengefasst. Da die Ethidiumbromidfluoreszenz im Gel mit der Masse der DNA skaliert, entsprechen die relativen Intensitäten dem jeweiligen Anteil des DNA-Fragments in Gew%. Die gemessenen Intensitäten zeigen eine gute Übereinstimmung mit den berechneten Werten.

Tab. 8: Relative Intensitäten der Banden nach Restriktion mit Bcgl. Die relativen Intensitäten entsprechen dem Anteil des jeweiligen Fragments in Gew%. Die angegebenen Messwerte sind Mittelwerte aus drei Einzelbestimmungen (Scion Image for Windows, Makro „Gel Plot 2“)*.

Fragmentgröße (theoretisch)	Gew% (theoretisch)	Fragmentgröße (gemessen)	Gew% (gemessen)
61 b	36	61 b	33
39 b	23	39 b	23
34 b	40	33 bzw. 34 b	43

Sowohl die Fragmentgrößen, als auch die relativen Intensitäten sprechen also für eine quantitative Erzeugung des erwünschten Produktes. Die Nachweisgrenze der Methode liegt jedoch im Bereich von 7,7-19 %. Nach den Fluoreszenzmessungen an dieser Probe sind noch 5 % der Fluoreszenzmarkierung im PCR-Produkt enthalten, d.h. die beide Verfahren liefern übereinstimmende Ergebnisse, die Restriktionsanalyse hat aber keine ausreichende Empfindlichkeit, um den exakten Wert der Fluoreszenzmessung zu bestätigen. Damit die Nachweisgrenze der Restriktionsanalyse in den Bereich von wenigen Prozent rückt, müsste die zehnfache Menge an DNA eingesetzt werden. Ob diese große Menge an DNA (5 µg PCR-Produkt) zu einer Störung des Laufverhaltens der kleinen Fragmente in der Gelelektrophorese führt ist unklar.

3.4.3.3 Sequenzierung

An einigen der Verwendeten PCR-Produkte wurden Sequenzierungen durchgeführt (Sanger-Sequenzierung, „dye terminator sequencing“, GENterprise, Mainz). Als Beispiel sind in Abb. 87 die Sequenzierungen eines PCR-Produktes gezeigt, das nur in einem Primer eine Uridinmodifizierung trägt (Verwendete Primer: L1 bzw. PR2). Die Sequenzierungen erfolgten mit dem Primer L1. Dadurch wird der Strang des PCR-Produktes abgelesen, der die Uridinmodifizierung enthält. Vor der USER-Reaktion wird die vollständige Sequenz des 600 bp Fragments wiedergegeben (Abb. 87 A). Nach der USER-Reaktion tritt der charakteristische Peak des terminalen Adenins** exakt an der Stelle auf, an der das Uridin aus der Sequenz herausgeschnitten wurde (Abb. 87 B).

* Für eine Abschätzung des Fehlers der verwendeten Methode wurden sechs Banden des 10 bp-Markers ausgewertet, die laut Hersteller identische Intensitäten zeigen sollen. Die Standardabweichung der Messwerte liegt hier bei 0,85 %. Die Fragmentgrößen wurden aus einem Vergleich mit dem Marker bestimmt (E-Capt, Vilber Lourmat, vertrieben durch peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen).

** Die in der Sequenzierung eingesetzte Sequenase ist eine gentechnisch veränderte T7 DNA Polymerase, die genau wie die Taq Polymerase am 3'-Ende des synthetisierten Strangs ein zusätzliches Adenin anhängt.

3 Ergebnisse und Diskussion

Bei einer unvollständigen USER-Reaktion sollten nach diesem Peak abgeschwächte Signale erkennbar sein, die in keinem der Chromatogramme beobachtet wurden. Die Nachweisgrenze dieser Methode ist jedoch von der Reinheit und der Konzentration der individuellen Probe abhängig. Nicht abgetrennte komplementäre Oligos sind auf diesem Weg nicht nachweisbar.

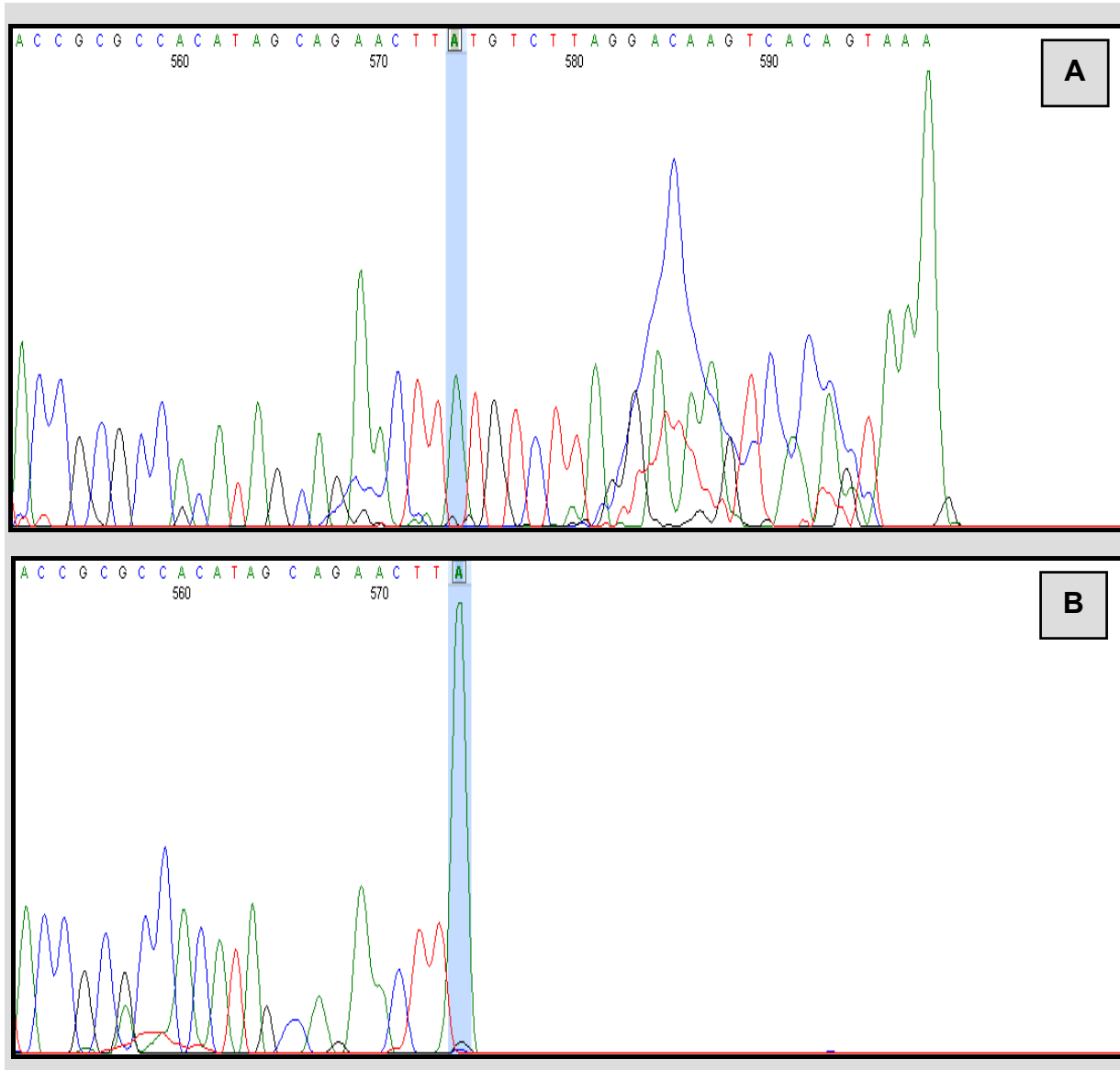


Abb. 87: Sequenzierung vor und nach der USER-Reaktion. A: Bei einer Sequenzierung mit dem Primer L1 wird der uridinmodifizierte Strang des PCR-Produkts abgelesen. Die gesamte Sequenz ist richtig wiedergegeben. Die Stelle, an der die Uridinmodifizierung sitzt, ist durch den blauen Streifen markiert. B: Nach der USER-Reaktion bricht die Sequenzierung exakt an der erwarteten Stelle ab. Nach dem charakteristischen Peak des terminalen Adenins sind keine weiteren Signale detektierbar.

3.4.4 Hybridisierungsversuche

3.4.4.1 Dimerisierung eines PCR-Produktes durch Linker-Oligos

Die erzeugten dsDNA-Fragmente waren eigentlich für die Hybridisierung mit einem DNA-PEO-DNA-Blockcopolymer ausgelegt, bei dem beide DNA-Blöcke über das 5'-Ende mit dem Polymer verknüpft sind. Der Syntheseweg für die Kopplung zwischen DNA und PEO hatte sich aber im Verlauf der Arbeit so verändert, dass die beiden DNA-Blöcke gleichsinnig orientiert sind. Dadurch ist das dsDNA-Fragment nicht mehr mit der Hybridstruktur kompatibel. Zunächst wurde versucht, das PCR-Produkt durch Ligation mit einem passenden Oligo zu modifizieren. Der Nachweis der erfolgreichen Ligation ist aber schwierig, da sich Edukt und Produkt bei einer Länge von rund 600 bp nur um 23 Basen unterscheiden. Es ist sehr ungünstig Hybridisierungsexperimente durchzuführen, wenn bereits die Edukte nicht klar charakterisiert werden können, da in diesem Fall absolut keine Kontrolle über die Stöchiometrie der hybridisierungsfähigen Moleküle gegeben ist. Für die ersten Hybridisierungsversuche wurden daher zwei „Linker-Oligos“ verwendet, die zu einer Dimerisierung des PCR-Produktes geeignet sind (Abb. 88).

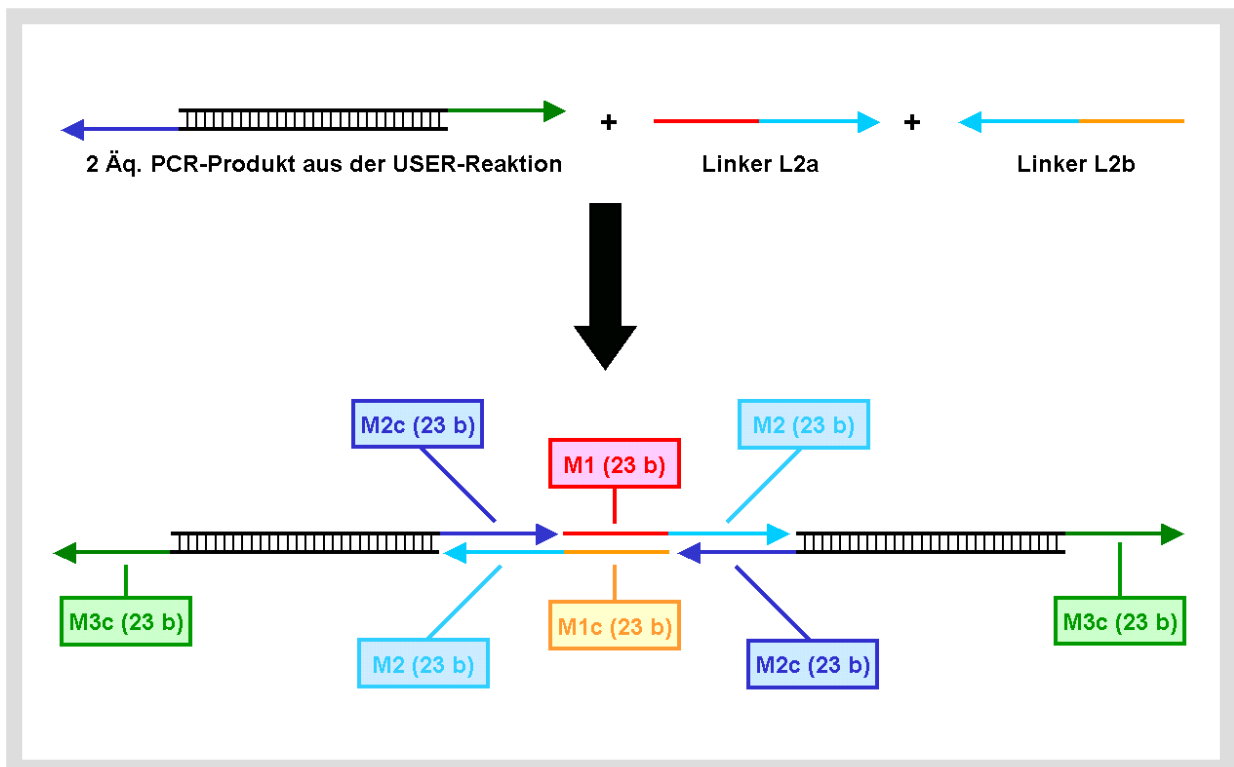


Abb. 88: Dimerisierung eines PCR-Produktes über Linker-Oligonukleotide. Die überhängenden Enden des PCR-Produktes haben beide eine Länge von 23 Basen (Primer: PR2 bzw. PL2 [vgl. Abb. 75], sticky-end-Sequenzen M2c bzw. M3c). Die beiden Linkermoleküle bestehen aus jeweils 46 Basen. Am 3'-Ende der beiden Linker liegt die Sequenz M2, die zur sticky-end-Sequenz M2c des PCR-Produkts komplementär ist. Die Sequenzen am 5'-Ende der Linker (M1 bzw. M1c) führen zur Dimerisierung des PCR-Produktes.

Für die Hybridisierung wurden 0,5 pmol des PCR-Produktes, in TAE- bzw. HEPES-Puffer mit Mg^{2+} -Konzentrationen von 10, 50 und 100 mM, stöchiometrisch mit den beiden „Linker-Oligos“ versetzt. Diese Hybridisierungslösung wurde nicht auf 90°C, sondern nur auf 70°C erwärmt und in 45 min auf RT abgekühlt, um ein vollständiges Aufschmelzen des Doppelstrangabschnitts zu vermeiden (Temperaturprogramm HybF70.CYC, vgl. Anhang F). Unabhängig vom verwendeten Puffersystem wird nur eine schwache Bande bei doppelter Molmasse des PCR-Produktes gebildet (Abb. 89). Die Bande bei 600 bp wird verbreitert bzw. in drei direkt übereinander liegende Banden aufgespalten, d.h. der größte Teil der Linker-Oligos hybridisiert mit dem PCR-Produkt, führt aber nicht zur Dimerisierung. Der Vergleich mit dem Ausgangsmaterial (Abb. 89, Spur 2) zeigt außerdem, dass bereits im reinen PCR-Produkt eine Bande mit doppelter Masse auftritt. Diese ist in ihrer Intensität mit den Dimer-Banden der Hybridisierungsansätze vergleichbar. Dadurch ist es völlig unklar, ob die Linker-Oligos überhaupt an der Bildung der hochmolekularen Bande beteiligt sind.

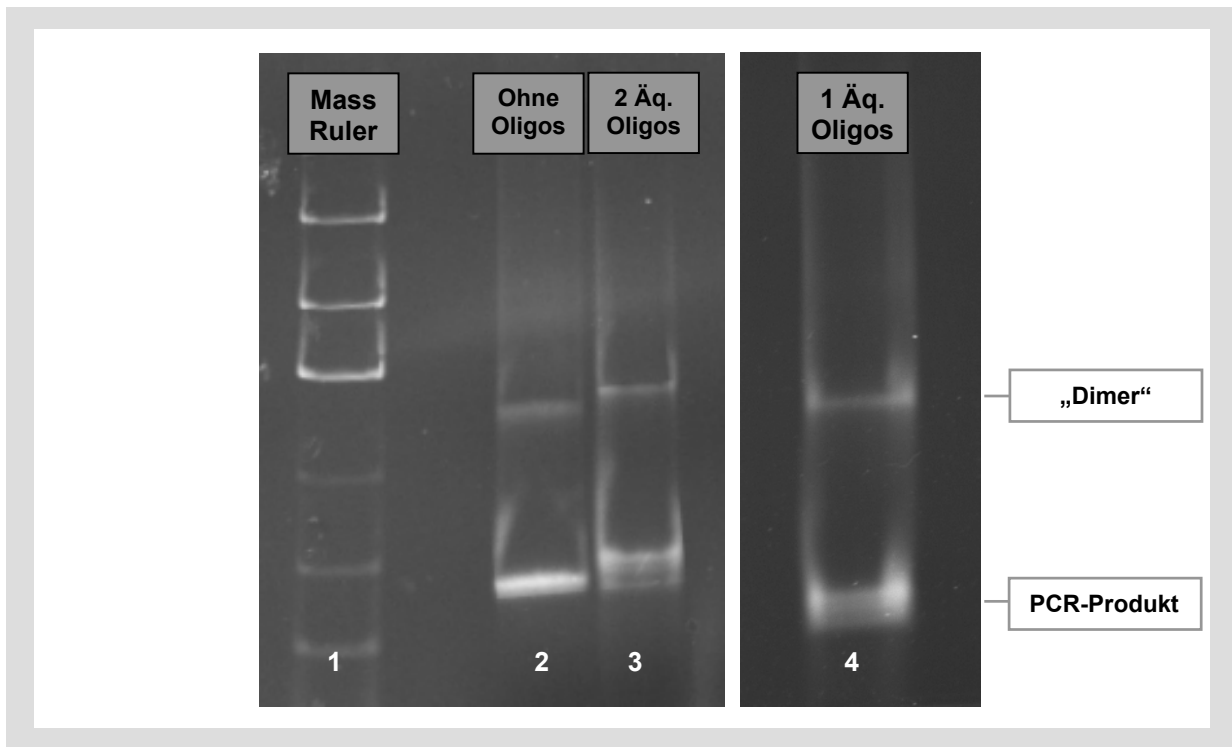


Abb. 89: Dimerisierung eines PCR-Produktes über Linker-Oligos. Spur 1: MassRuler, Spur 2: PCR-Produkt mit überstehenden Enden, Spur 3: Hybridisierungsversuch des PCR-Produktes mit den beiden Linker-Oligos in zweifachem Überschuss, Spur 4: Wiederholung der Hybridisierung bei richtiger Stöchiometrie. Die Bande bei ca. 1200 bp tritt bereits im reinen PCR-Produkt auf und zeigt keine Reaktion auf eine Änderung der Stöchiometrie in den Hybridisierungsexperimenten.

Durch einen Fehler bei der Berechnung der Stöchiometrie wurde in Abb. 89 (links) ein zweifacher Überschuss an Linker-Oligos eingesetzt. Ein Wiederholungsexperiment mit der richtigen Stöchiometrie zeigt aber erstaunlicherweise ein weitgehend identisches Ergebnis (Abb. 89, rechts). Insofern ist es naheliegend, dass die hochmolekulare Bande in der Dimermischung auf die gleiche Ursache wie die hochmolekulare Bande im PCR-Produkt

zurückzuführen ist und nicht mit den Linkermolekülen in Verbindung steht. Um zu klären, ob es sich um eine unerwünschte Wechselwirkung zwischen den sticky-ends oder vergleichbare Wechselwirkungen handelt, wurde das reine PCR-Produkt durch Erhitzen auf 90 °C und schnelles Abkühlen in Eiswasser denaturiert. Nach der Denaturierung ist die hochmolekulare Bande vollständig verschwunden (Abb. 90, links), d.h. es muss sich hier um eine definierte Wechselwirkung des PCR-Produktes mit sich selber handeln. Eigentlich muss diese Wechselwirkung sogar über die Enden der Moleküle erfolgen, da man bei einer globulären oder irgendwie anders gearteten Aggregation keine klar definierte Bande bei doppelter Masse erwarten würde.

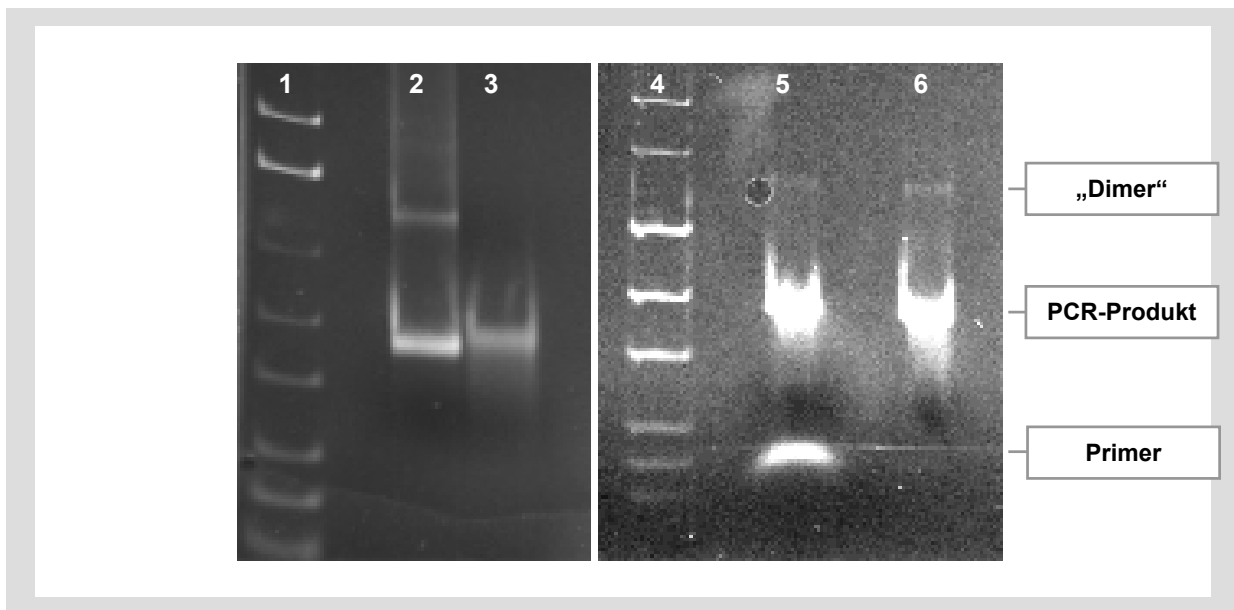


Abb. 90: Denaturierung der hochmolekularen Bande. Spur 1: MassRuler, Spur 2 u. 3: PCR-Produkt vor und nach Denaturierung bei 90 °C und Abschrecken auf Eiswasser, Spur 4: MassRuler, Spur 5 und 6: gleiches PCR-Produkt wie in Spuren 2 u. 3 direkt nach der PCR und nach der Abtrennung der Primer. Im Unterschied zu den Erfahrungen mit Oligonukleotiden kann die Bande bei doppelter Masse denaturiert werden (Vergleich Spuren 2 u. 3). Es muss sich also um irgendeine Form von Wechselwirkung des PCR-Produktes mit sich selbst handeln. Bei extrem hohem Kontrast kann diese „Dimerbande“ auch schon im PCR-Produkt ohne sticky-ends detektiert werden (Spuren 5 u. 6).

Die zusätzliche Bande tritt in deutlich geringerem Ausmaß auch schon im PCR-Produkt ohne sticky-ends auf (Abb. 90, rechts). In diesem Fall kann die Aggregation nur durch eine Wechselwirkung im Sinne einer Basenstapelung, zwischen den glatten Enden der PCR-Produkte erklärt werden. Dieses Phänomen wird in sehr ausgeprägter Form bei DNA-Strukturen beobachtet, in denen mehrere glatte Helixenden direkt nebeneinander liegen. Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit trat dieser Effekt bei der Untersuchung von Bündeln aus sechs parallel miteinander verknüpften Helices auf. (Eine vergleichbare Struktur wird in [30] beschrieben.) In den Arbeiten von Rothmund [37] wird ebenfalls von einer Wechselwirkung der glatten Enden berichtet (Abb. 91).

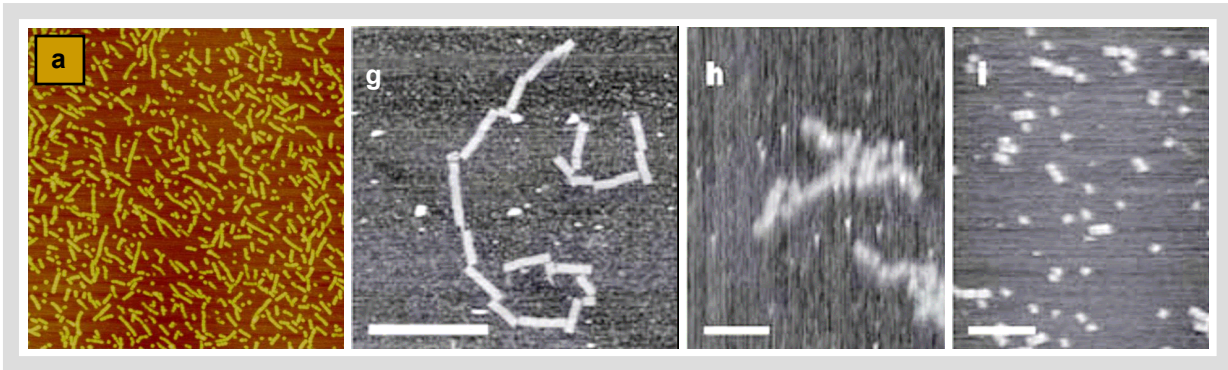


Abb. 91: AFM-Untersuchungen zur Wechselwirkung zwischen glatten Helixenden (Abb. g, h, i aus [37]).
a: Aggregation von Bündeln aus sechs parallelen Helices (Länge: ca. 30 nm, Ø: ca. 6 nm, Bildausschnitt: 2 µm). Zwei der sechs Helices tragen an beiden Enden ein sticky-end von jeweils 6 Basen. Die sticky-ends sind nicht komplementär. Trotzdem erfolgt eine Aggregation über die Enden der Helixbündel.
g: Aggregation von rechteckigen DNA-Strukturen, die nach dem von Rothemund entwickelten Konzept aufgebaut wurden (vgl. Abschnitt 1). In der Abbildung ist schön zu erkennen, dass die Aggregation der Rechtecke (ca. 100 x 75 nm, scale bar: 1 µm) nicht in zwei Dimensionen, sondern nur in einer Dimension, über die glatten Enden der parallelen Helices erfolgt. In *h* und *i* ist eine ganz ähnliche Rechteckstruktur gezeigt (scale bar: 1 µm). In *i* ist die Struktur aus *h* an allen Helixenden mit einem Loop von 4 Thymidin-Einheiten modifiziert. Durch diese Modifizierung kann die Aggregation deutlich zurückgedrängt aber nicht vollständig vermieden werden.

Da die Bande mit doppelter Masse in verstärktem Maße auftritt, wenn das PCR-Produkt auf beiden Seiten überhängende Enden trägt, scheint im oben gezeigten Fall nicht nur die Basenstapelung sondern auch die Wechselwirkung zwischen den sticky-ends eine Rolle zu spielen. Im folgenden Experiment sollte daher geklärt werden, ob die unerwünschte Dimerisierung des reinen PCR-Produkts und die schlechte Effektivität bei der Verknüpfung durch Linker-Oligos auf die Struktur der verwendeten sticky-end-Sequenzen zurückzuführen ist. Zu diesem Zweck wurde die Hybridisierung des oben gezeigten Systems mit oligomeren DNA-Sequenzen nachgestellt. Die sticky-ends des PCR-Produktes wurden hierbei durch Primer mit derselben Sequenz „simuliert“, die aus anderen Experimenten zur Verfügung standen. Bei den verwendeten Primern sind die eigentliche Primersequenzen (PL1 bzw. PR1) über einen PEG-Spacer mit sechs Wiederholungseinheiten an die Sequenz M2c bzw. M3c gebunden, die mit den sticky-ends des PCR-Produkts identisch sind. Aufgrund der Orientierungen der verschiedenen Sequenzen in den verwendeten Primern kommt es durch die Hybridisierung zu etwas ungewöhnlichen Strukturen.

Sowohl die Hybridisierung der beiden Linker-Oligos als auch die Hybridisierung des Linker-Oligos L2b mit der sticky-end-Sequenz des PCR-Produkts (P2) erfolgt weitgehend quantitativ (Abb. 93, Spuren 3 und 7). Die schlechte Effektivität bei den Dimerisierungsversuchen in Abb. 89 kann also nicht durch die Basenabfolge der verwendeten Sequenzen erklärt werden.

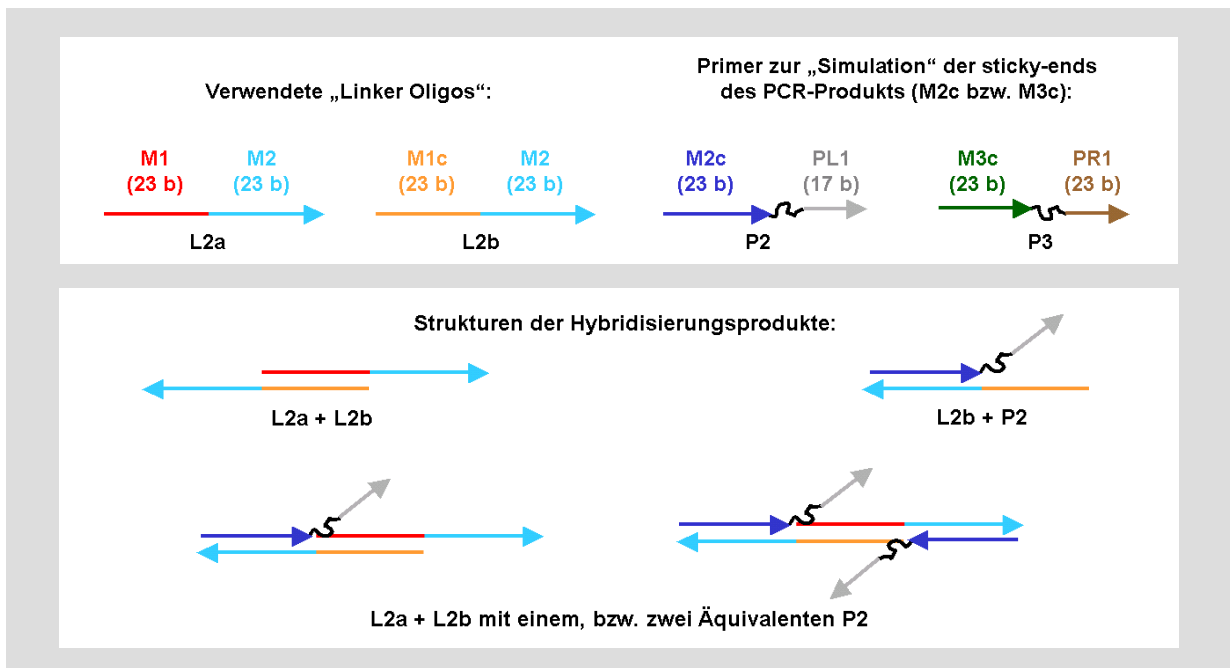


Abb. 92: Verwendete Oligonukleotide und Strukturen der gebildeten Hybridisierungsprodukte. Die Sequenzen M1 und M1c bzw. M2 und M2c sind zueinander komplementär. Die sticky-ends des PCR-Produkts haben die Sequenzen M2c und M3c. M2c soll zur Dimerisierung des PCR-Produktes über Linker-Oligos genutzt werden. M3c soll nicht an der Hybridisierung beteiligt sein.

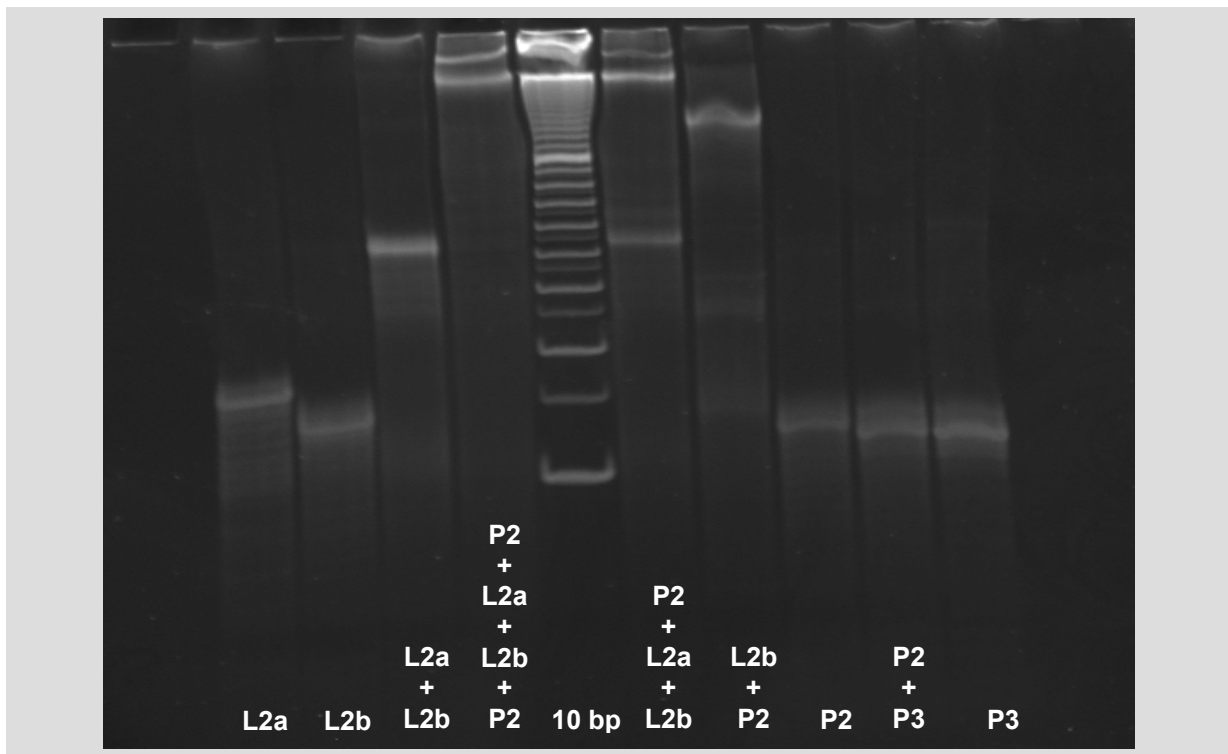


Abb. 93: Überprüfung der verwendeten sticky-ends auf Fehlpaarungen und Hybridisierungseffektivität (20 % native PAGE, 20°C). Spur 1 u. 2: Linker-Oligos L2a und L2b, Spur 3: Hybridisierung der Linker Oligos (L2a+L2b), Spur 4: Hybridisierung der beiden Linker mit 2 Äquivalenten des komplementären Primers P2, Spur 5: 10bp-Marker, Spur 6: Hybridisierung der beiden Linker mit 1 Äquivalent des komplementären Primers P2, Spur 7: Hybridisierung von einem Linker (L2b) mit dem komplementären Primer (P2), Spur 8: Primer P2, Spur 9: Mischung der beiden sticky-end-Sequenzen des PCR-Produktes (P2+P3), Spur 10: Primer P3. Die sticky-end-Sequenzen des PCR-Produktes zeigen weder mit sich selbst noch untereinander eine Fehlpaarung. Die Hybridisierung der Linker-Oligos und die Hybridisierung von einem Linker mit dem komplementären Primer sind quantitativ. Bei Hybridisierungsprodukten mit überstehenden Enden (L2b+P2, P2+L2a+L2b, P2+L2a+L2b+P2) treten teilweise unerwartet niedrige Mobilitäten auf.

Die zusätzliche Bande bei doppelter Masse, die bereits im PCR-Produkt ohne Linker-Oligos aufgetreten ist, kann ebenso wenig durch die verwendeten Basenabfolgen erklärt werden, da die sticky-end-Sequenzen des PCR-Produktes weder mit sich selbst noch untereinander eine Dimerisierung zeigen (Abb. 93, Spuren 8, 9 und 10).

In der Mischung von allen vier Oligos im stöchiometrischen Verhältnis werden lediglich 30 % der Zielstruktur gebildet. Die restlichen 70 % der Intensität sind in der Bande enthalten, die dem Hybridisierungsprodukt der beiden Linker-Oligos mit einem Äquivalent des Primers P2 entspricht. Auf dieser Spur (Abb. 93, Spur 4) können keine freien Oligos detektiert werden, d.h. die geringe Ausbeute an Zielstruktur scheint durch eine falsche Stöchiometrie verursacht zu werden. Für einen Pipettierfehler ist die Abweichung bei weitem zu groß. Der Fehler in der Konzentrationsbestimmung mittels UV-Absorption sollte bei „statistischen“ Sequenzen ebenfalls deutlich kleiner sein (vgl. Abschnitt 2.9). Außerdem beruhen die Zusammensetzungen der Hybridisierungsansätze mit jeweils zwei Oligonukleotiden auf den gleichen Mengenverhältnissen. Bei diesen Proben treten jedoch keine Anzeichen für eine falsche Stöchiometrie auf. Hier zeigt sich also das gleiche Phänomen, wie es auch schon bei der Verknüpfung von kleinen dsDNA-Segmenten über Polyethylenoxid-Linker aufgetreten ist (vgl. Abschnitt 3.2.1), d.h. es scheint wahrscheinlicher zu sein, dass die Nebenprodukte nicht durch eine falsche Stöchiometrie sondern durch eine unvollständige Hybridisierung gebildet werden. Wenn sich die restlichen Oligonukleotide auf ausreichend viele Alternativstrukturen verteilen, sind diese nicht mehr in der Gelelektrophorese nachweisbar.

Die Fähigkeit des PCR-Produktes zur Hybridisierung wurde ebenfalls mit einem Oligonukleotid getestet. Zu diesem Zweck wurde das PCR-Produkt mit verschiedenen Mengen eines komplementären Texas Red markierten Primers versetzt. Nach der Hybridisierung kann in der nativen PAGE gezeigt werden, bei welcher Zusammensetzung das erste Mal freie Primer auftreten. Für dieses Experiment muss zunächst die Nachweisgrenze der Texas Red Markierung und der Ethidiumbromid-Fluoreszenz des Primers im verwendeten Gel bestimmt werden: Es wurden 0,1 / 0,2 / 0,5 / 1 / 2 / 5 / 10 / 50 und 100 ng des Texas Red markierten Primers und 0,9 pmol des PCR-Produktes aufgetragen. Vor dem Anfärben der DNA mit Ethidiumbromid liegt die Nachweisgrenze bei 2-5 ng Primer (0,15-0,38 pmol, Abb. 94 A). Im PCR-Produkt ist keine Fluoreszenz erkennbar, d.h. weniger als 16 % (0,15 pmol) des PCR-Produktes tragen eine Farbstoffmarkierung. Die Nachweisgrenze der Primer liegt nach dem Anfärben der DNA im gleichen Massenbereich wie zuvor (Abb. 94 B).

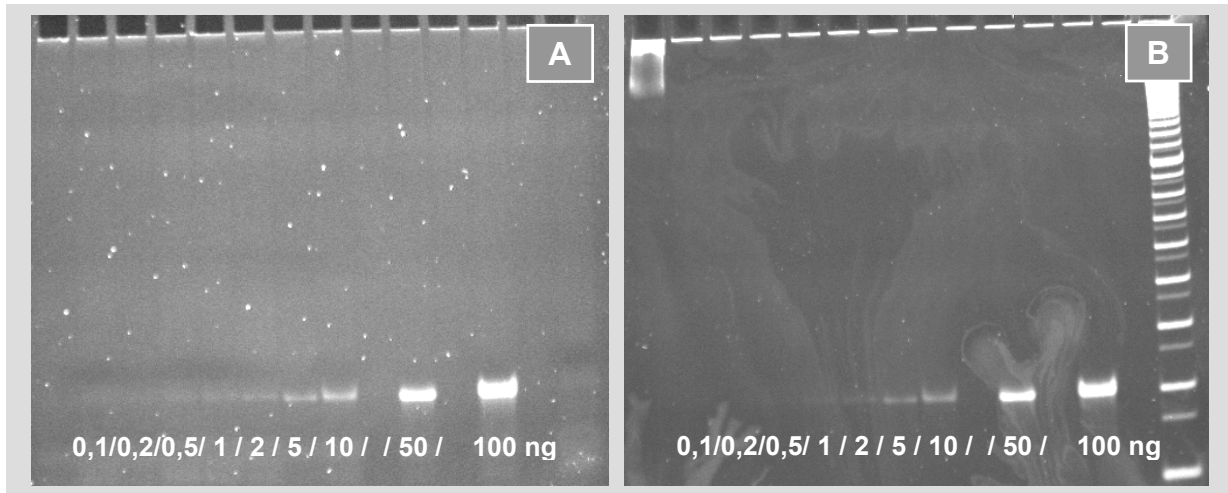


Abb. 94: Nachweisgrenzen von Texas Red und DNA in Acrylamidgelen, 10 % native PAGE. **A:** Fluoreszenz vor dem Anfärben mit Ethidiumbromid. Spur 1: 0,9 pmol PCR-Produkt nach der USER-Reaktion und dem Abtrennen der komplementären Oligos. Spuren 2-10: 0,1 / 0,2 / 0,5 / 1 / 2 / 5 / 10 / 50 und 100 ng des Texas Red markierten Primers. Die Nachweisgrenze des Primers liegt bei 2-5 ng (0,15-0,38 pmol). Im PCR-Produkt wird keine Fluoreszenz detektiert. **B:** Gleiches Gel nach dem Anfärben mit Ethidiumbromid. Die Nachweisgrenze des Primers liegt im gleichen Bereich wie vor dem Färben.

Zum Testen der Hybridisierungsfähigkeit des PCR-Produktes wurden Mischungen von jeweils 2,7 pmol des PCR-Produktes mit 0,4-1 Äq. des komplementären Primers angesetzt. Die Inkubation erfolgte wie zuvor mit dem Temperaturprogramm HybF70.CYC. Bei dem Ansatz mit 0,8 Äquivalenten (Abb. 95) tritt zum ersten mal eine Bande auf Höhe des Primers auf, d.h. gut 70 % des PCR-Produktes sind in der Lage den verwendeten Primer zu binden.

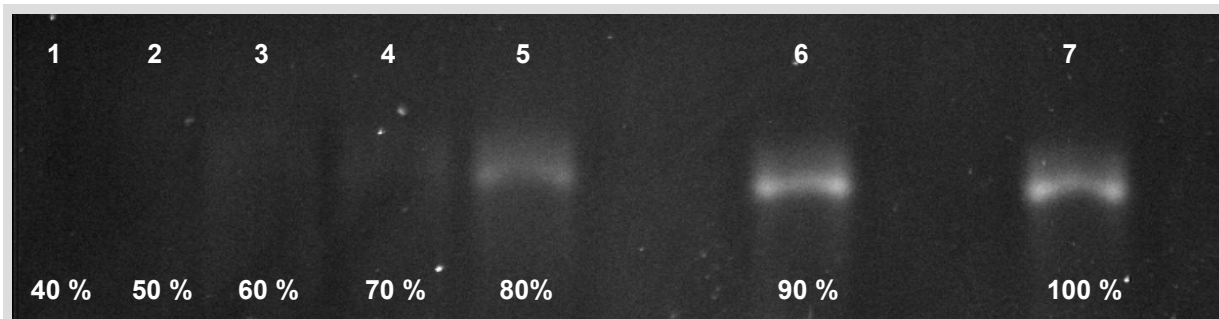


Abb. 95: Hybridisierungsfähigkeit des PCR-Produktes, 10 % native PAGE. Der Ausschnitt zeigt das Gel auf Höhe der Primerbanden. Auf den Spuren 1-6 wurden jeweils 2,7 pmol PCR-Produkt mit 40, 50, 60, 70, 80, 90 und 100% des komplementären Primers (L2b) hybridisiert.

Nach diesen Experimenten ist das Ergebnis der Dimerisierung des PCR-Produktes mit den beiden Linker-Oligos (Abb. 89) schwer zu verstehen. Auf der Grundlage von Oligonukleotiden zeigen die Linker sowohl untereinander, als auch mit der sticky-end-Sequenz des PCR-Produktes eine quantitative Doppelstrangbildung. Fehlpaarungen zwischen den verschiedenen Sequenzen können nicht nachgewiesen werden. Das Design der Sequenzen ist also nicht die Ursache für die schlechte Dimerisierungseffektivität. In den Fluoreszenzmessungen des verwendeten PCR-Produktes werden nur 5 % der ursprünglichen Fluoreszenzintensität detektiert und die Restriktionsanalyse liefert die erwarteten Fragmente, d.h. 95 % der PCR-

Produkte liegen in der erwünschten Form, mit überstehenden Enden vor. Das verwendete PCR-Produkt ist außerdem in der Lage gut 0,7 Äq. eines komplementären Primers zu binden. Die einzelnen Komponenten scheinen demnach alle gut zu funktionieren, trotzdem kann in der Mischung des PCR-Produktes mit den Linker-Oligos keine Dimerisierung nachgewiesen werden. Es besteht also offenbar ein prinzipieller Unterschied zwischen den oligomeren Modellsystemen und der Dimerisierung von PCR-Produkten. Dieser Unterschied könnte darauf zurückgeführt werden, dass im Falle der PCR-Produkte deutlich größere Massen miteinander verknüpft werden sollen, als bei der Hybridisierung von Oligonukleotiden. Die Übertragung der thermischen Energie des Lösungsmittels auf die PCR-Produkte führt zu einer stärkeren Belastung der hybridisierten sticky-ends, d.h. genauso wie man ein kleines Boot mit einer einfachen Schnur vertäuen kann, die von einem Ozeanriesen sofort zerrissen würde, erfordert die Dimerisierung von PCR-Produkten evtl. eine deutlich stabilere Verknüpfungsstelle.

3.4.4.2 Dimerisierung von PCR-Produkten mit komplementären sticky-ends

Zur weiteren Vereinfachung des Systems wurden zwei neue PCR-Produkte hergestellt, die jeweils nur ein sticky-end tragen. Die Sequenzen der sticky-ends (M2, bzw. M2c) sind zueinander komplementär, so dass für die Dimerisierung keine Linker mehr notwendig sind. Damit Störungen durch Fehlsequenzen der Primer ausgeschlossen werden können, wurden die uridinmodifizierten Primer über denaturierende PAGE gereinigt. Auch wenn die Taq Polymerase keine proofreading Eigenschaften zeigt, führt dieses Vorgehen zu fehlerfreien sticky-end-Sequenzen. (Die Fehlerrate der Taq Polymerase nach dem „opal codon reversion assay“ [160] liegt bei 285×10^{-6} [161].)

Verwendete Primer:

L1: Primer ohne sticky-end-Sequenz

5'-G TCT ATT TCG TTC ATC C-3'

PR2-TXR: Primersequenz R1 (braun), sticky-end-Sequenz M2 (hell-blau)

5'-TXR-TTA CTG TGA CTT GTC CTA AGA CAU AAG TTC TGC TAT GTG GC-3'

PR2c-TXR: Primersequenz R1 (braun), sticky-end-Sequenz M2c (dunkel-blau)

5'-TXR-TGT CTT AGG ACA AGT CAC AGT AAU AAG TTC TGC TAT GTG GC-3'

Abb. 96: Verwendete Primer zur Erzeugung von PCR-Produkten mit komplementären sticky-ends. Die Primer PR2-TXR und PR2c-TXR wurden über denaturierende PAGE gereinigt. Durch das Abtrennen der Fehlsequenzen wird die Bildung von fehlerfreien überstehenden Enden gewährleistet.

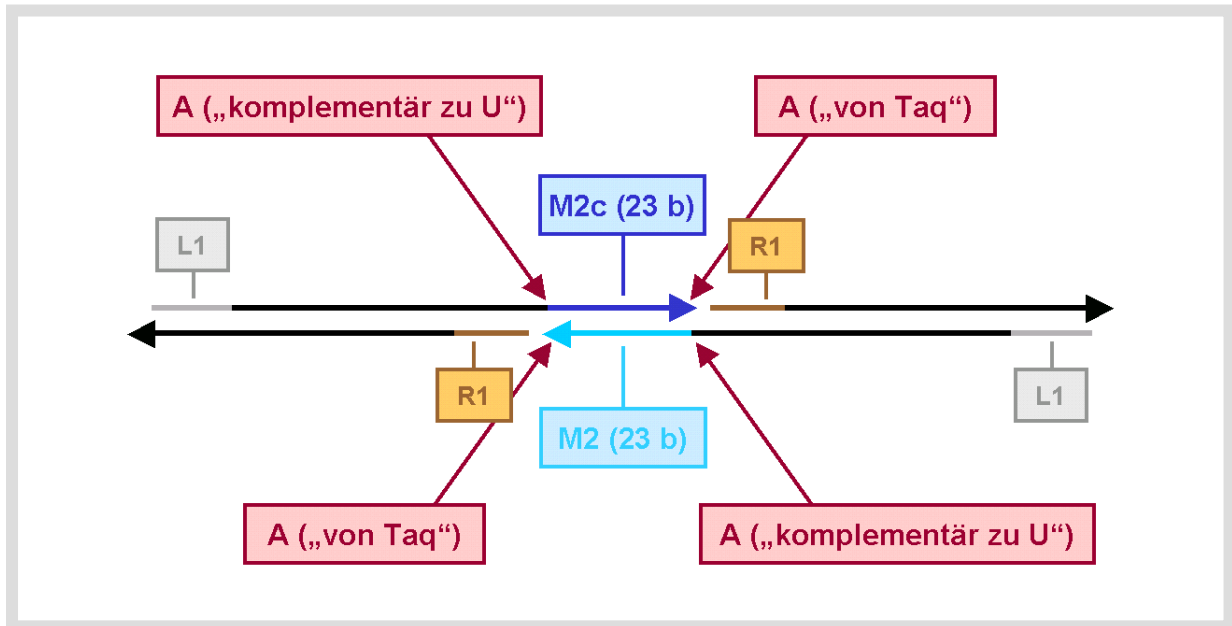


Abb. 97: Zielstruktur der Dimerisierung von PCR-Produkten aus der USER-Reaktion. Die gebildeten sticky-end-Sequenzen M2 und M2c sind zueinander komplementär. Die überstehenden Enden enthalten aber jeweils zwei weitere Adenin-Einheiten. Eine wird als Komplement zur Uridinmodifizierung des Primers eingebaut, die andere wird aufgrund der Nukleotidyltransferaseaktivität der Taq Polymerase an das 3'-Ende des synthetisierten Stranges angehängt.

Die PCR-Produkte wurden nach der USER-Reaktion wie zuvor durch eine Ultrafiltration mit Harnstoff von den komplementären Oligos getrennt. In beiden Fällen enthalten die PCR-Produkte nach der Aufarbeitung knapp 10 % der anfänglichen Fluoreszenzintensität. In diesem System werden 62 % der dimeren Zielstruktur gebildet^{*}. Die Bildung des Dimers ist also viel effektiver als bei der Verknüpfung über Linker-Oligos, im Vergleich zu den Fluoreszenzmessungen liegt der Wert aber immer noch deutlich zu niedrig.

Da jetzt nur noch zwei verschiedene Moleküle an der Dimerbildung beteiligt sind, kann der Einfluß der Stöchiometrie sehr viel einfacher untersucht werden als in dem oben beschriebenen System. Zu diesem Zweck wurden 0,25 µg des einen PCR-Produktes (R2) mit 0,5 bis 1,5 Äq. des anderen PCR-Produktes (R2c) versetzt und in TAE/Mg-Puffer mit Hyb90.CYC hybridisiert. Da die Konzentrationen der Stammlösungen der beiden PCR-Produkte vergleichbar sind ($c(R2) = 24,2 \mu\text{g/ml}$; $c(R2c) = 25,95 \mu\text{g/ml}$) bleibt die Gesamtkonzentration in allen Mischungen annähernd konstant. Als Vergleichsproben wurden die reinen PCR-Produkte mit Puffer versetzt und mit dem gleichen Temperaturprogramm inkubiert. Bei diesen Vergleichsproben tritt keine Bande mit doppelter Masse auf. Die verschiedenen Mischungen zeigen in der Gelelektrophorese deutlich weniger Unterschiede als erwartet (Abb. 98).

^{*} Der angegebene Wert ist ein Mittelwert aus 12 unabhängigen Messungen aus verschiedenen Gelen ($\sigma = 2,1 \%$).

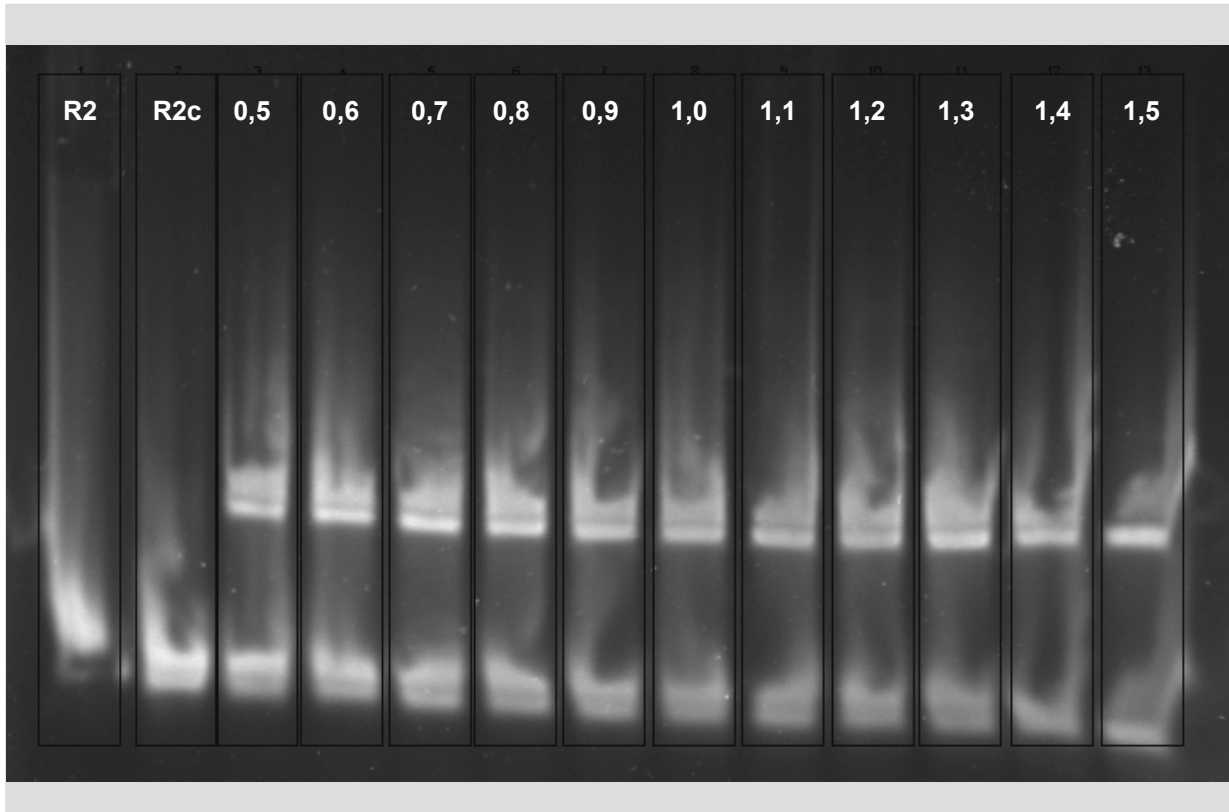


Abb. 98: „Titration“ von zwei PCR-Produkten mit komplementären sticky-ends. Spuren 1 u. 2: Einzelne PCR-Produkte (R2 bzw. R2c), Spuren 3-13: Mischungen von 0,25 μ g R2 mit 0,5-1,5 Äq. R2c in Schritten von 0,1 Äq. (Der Anteil an R2c ist am oberen Ende der Spur angegeben.) In den einzelnen PCR-Produkten tritt keine Dimerbande auf. Die Stöchiometrie der Mischungen hat erstaunlich wenig Einfluss auf die relativen Intensitäten der Dimerbanden.

Aufgrund der schlechten Qualität der Banden wurden bei der Auswertung des Gels auf jeder Spur die Gesamtintensitäten oberhalb und unterhalb der Dimerbande ins Verhältnis gesetzt. Das gemessene Verhältnis von Monomer zu Dimer bleibt erstaunlicherweise, unabhängig von der Zusammensetzung, annähernd konstant. Die relativen Intensitäten der Dimerbande ändern sich um lediglich 9 %, obwohl die Hybridisierungsmischungen extrem unterschiedliche Zusammensetzungen haben. Die Abweichung zwischen gemessenen und berechneten Werten nimmt dadurch bei den ersten fünf Mischungen stark zu, d.h. die Effektivität der Hybridisierung wird von der Zusammensetzung beeinflusst. Geht man aufgrund der Fluoreszenzmessungen davon aus, dass jeweils 10 % der sticky-ends blockiert sind, können in der 2:1-Mischung (0,5 Äq. R2c) maximal 60 % der PCR-Produkte als Dimer vorliegen. Dieser Wert ist mit dem Messwert von 55 % durchaus vergleichbar, d.h. 92 % der PCR-Produkte mit verfügbaren sticky-ends sind in Dimeren gebunden. In der 1:1-Mischung sind nur noch 69 % der sticky-ends an der Hybridisierung beteiligt.

Tab. 9: Auswertung der Gelelektrophorese aus Abb. 98. Bei einer drastischen Änderung der Stöchiometrie variieren die relativen Intensitäten der Dimerbanden um lediglich 9 %. Da die verwendeten PCR-Produkte noch knapp 10 % der anfänglichen Fluoreszenzintensität enthalten, wurde den berechneten Werten $[I_{\text{rel.}}(\text{berechnet})]$ eine quantitative Hybridisierung von PCR-Produkten mit 90 % hybridisierungsfähigen sticky-ends zugrunde gelegt. Aus dem Vergleich von berechneten und gemessenen Werten ergibt sich der Anteil von freien sticky-ends, denen ein komplementärer Partner zur Verfügung steht, die aber nicht an der Hybridisierung teilnehmen.

Anteil R2c / Äq.	Dimerbande $I_{\text{rel.}}(\text{gemessen}) / \%$	Dimerbande $I_{\text{rel.}}(\text{berechnet}) / \%$	Anteil der nicht beteiligten sticky-ends / %
0,5	55	60	8
0,6	58	68	14
0,7	59	74	20
0,8	60	80	25
0,9	59	85	31
1,0	62	90	31
1,1	61	86	29
1,2	64	82	22
1,3	64	78	18
1,4	63	75	16
1,5	56	72	22

Auch bei „Titrationsexperimenten“ mit anderen Oligonukleotiden wurde eine derartige Abhängigkeit der Hybridisierungseffektivität von der Zusammensetzung beobachtet. Es gibt nur eine Arbeit, in der die Hybridisierungseffektivität in nicht stöchiometrischen Mischungen von komplementären Oligonukleotiden untersucht wurde [162]. In dieser Arbeit hat sich gezeigt, dass die Ergebnisse sogar davon abhängen, welcher der beiden Stränge vorgelegt wird. Es konnte aber kein Modell entwickelt werden, dass die Ursachen für den Einfluss der Einzelstränge auf die Doppelstrangbildung erklärt.

Neben der Zusammensetzung wurde auch der Einfluss der Gesamtkonzentration der DNA überprüft. Diese hat zwar nur eine geringe Auswirkung auf die Thermodynamik der Doppelstrangbildung*, die Kinetik der Hybridisierung kann aber durch die Konzentration beeinflusst werden. Zu diesem Zweck wurde ein Ansatz bei fünffacher Konzentration (1,5 μM von jedem PCR-Produkt) mit dem gleichen Temperaturprogramm hybridisiert. In diesem Ansatz werden ebenfalls rund 60 % der PCR-Produkte im Dimer gebunden (Abb. 99, Spur 2).

* Bei den verwendeten sticky-end-Sequenzen (M2 bzw. M2c) beträgt die theoretische Änderung der Schmelztemperaturen durch die Erhöhung der Konzentration, in Anwesenheit von 40 mM Na^+ und 10 mM Mg^{2+} lediglich 2 °C. $\{T_m(0,3 \mu\text{M}) = 63,4 \text{ °C}, T_m(1,5 \mu\text{M}) = 65,4 \text{ °C} [14]\}$

3.4.4.2.1 Hybridisierung bei perfekter Stöchiometrie und 100 % verfügbaren sticky-ends

Es sollte möglich sein, alle störenden Einflüsse aufgrund von ungenauer Stöchiometrie bzw. durch die Anwesenheit von nicht hybridisierungsfähigen sticky-ends auszuschließen, wenn das gebildete Dimer mit Hilfe der Gelelektrophorese isoliert wird. Zu diesem Zweck wurde eine hybridisierte Dimermischung über ein Agarosegel aufgetrennt, die Monomer- und Dimerbanden ausgeschnitten und durch vollständige Solubilisierung der Agarosematrix und Reinigung über NucleoSpin Extrakt II aus dem Gel zurückgewonnen. Die erhaltenen Lösungen wurden zum Denaturieren der DNA-Strukturen für 10 min auf 90°C erhitzt und auf Eiswasser abgeschreckt. Anschließend wurde jeweils die Hälfte der Lösungen bei 10°C gelagert und die andere Hälfte erneut hybridisiert.

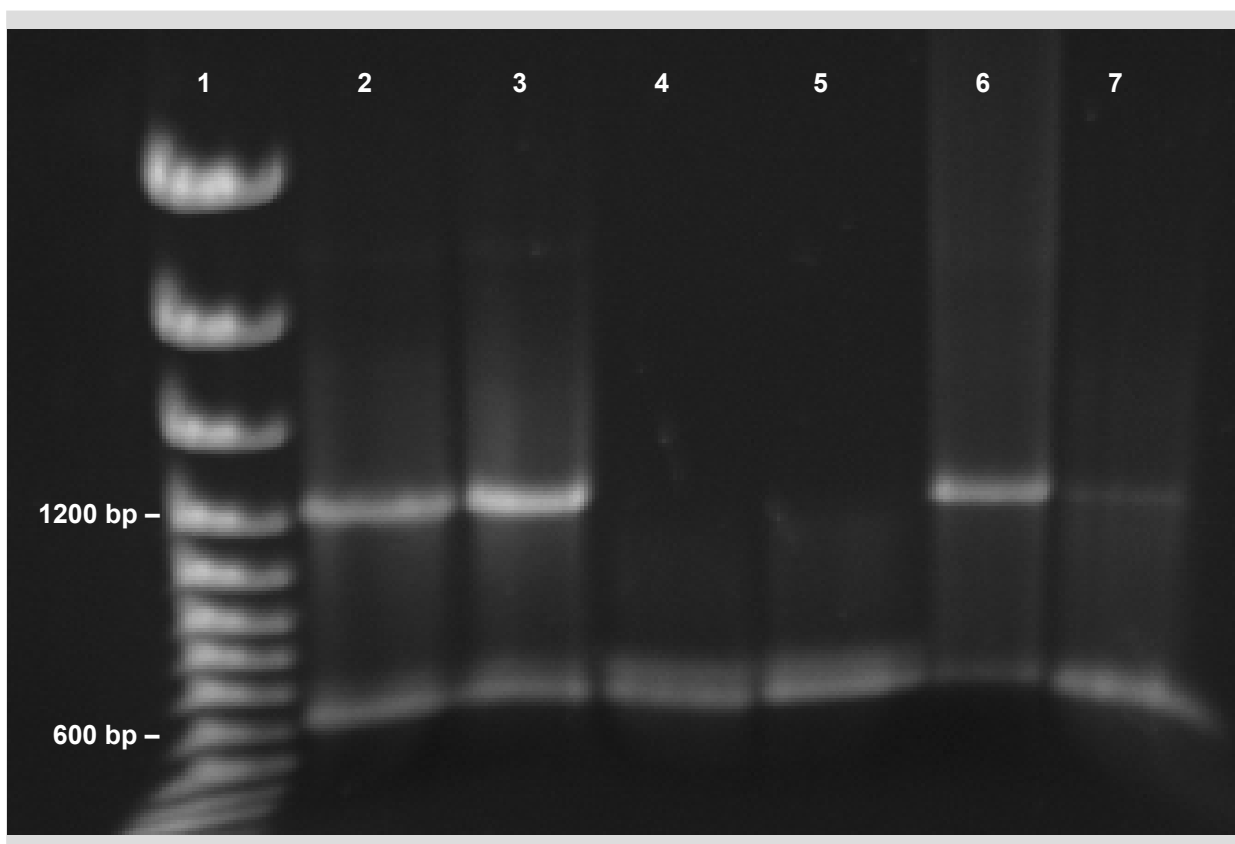


Abb. 99: Dimerisierung von PCR-Produkten vor und nach der Isolierung von Monomer- (600 bp) und Dimerbanden (12000 bp) aus dem Agarosegel. Spur 1: GeneRuler, Spur 2: Hybridisierung bei fünffacher Konzentration, Spur 3: Hybridisierungslösung vor der Isolierung von Monomer- und Dimerbanden, Spur 4 u. 5: Isolierte Monomer- bzw. Dimerbanden nach Denaturierung bei 90°C, Spuren 6 u. 7: Isolierte Dimer- bzw. Monomerbande nach Rehybridisierung mit Hyb90.CYC. Nach der Denaturierung zeigen beide Proben den gleichen Ausgangszustand. Durch die Rehybridisierung des isolierten Dimers werden 73 % der Zielstruktur erhalten. Im isolierten Monomer werden nach der Rehybridisierung ebenfalls 10 % der Intensität auf Höhe der 1200 bp Bande des Markers detektiert.

Nach der Isolierung und Rehybridisierung der Dimerbande (Abb. 99, Spur 6) werden 73 % der Zielstruktur gebildet. Obwohl alle blockierten sticky-ends abgetrennt wurden und die Mischung in perfekter Stöchiometrie vorliegen sollte, ist die Hybridisierung nicht quantitativ.

Die Effektivität steigt um lediglich 10 % im Vergleich zu den oben beschriebenen Hybridisierungsexperimenten. Dieses Ergebnis ist gut zu verstehen, wenn man davon ausgeht, dass das verwendete Temperaturprogramm immer zum selben Gleichgewichtszustand führt:

Die Fluoreszenzmessungen an den eingesetzten Proben sprechen für einen Anteil von 10 % blockierten sticky-ends. Die Hybridisierung dieser Proben liefert 62 % Dimer. Neben den 10 % von PCR-Produkten mit blockierten sticky-ends liegen demnach 28 % der PCR-Produkte als Monomer vor, obwohl sie die strukturellen Voraussetzungen für eine Hybridisierung erfüllen. Von den PCR-Produkten mit hybridisierungsfähigen überstehenden Enden nehmen demnach 69 % an der Dimerbildung teil. Durch die Auftrennung im Gel werden die PCR-Produkte mit blockierten sticky-ends abgetrennt. Wenn das verwendete Temperaturprogramm immer den gleichen Anteil von PCR-Produkten in den dimeren Zustand überführt, sollten nach der Isolierung und Rehybridisierung 69 % der Intensität in der Dimerbande zu finden sein. Der Messwert von 73 % stimmt mit dieser Erwartungen relativ gut überein. Nach diesem Gedankenexperiment sollten jedoch bei der Rehybridisierung des isolierten Monomers rund 50 % der dimeren Verbindung entstehen. Der aus Abb. 99 bestimmte Wert von 10 % liegt hier viel zu niedrig.

Aufgrund des Schmelzpunktes der verwendeten sticky-ends würde man erwarten, dass das Gleichgewicht vollständig auf der Seite der Doppelstränge liegt ($T_m[M2, \text{ bzw. } M2c] \approx 61,4 \text{ }^\circ\text{C}$)*. Typische Schmelzkurven von Oligonukleotiden haben ca. 20 °C unterhalb von T_m die untere Basislinie erreicht und sollten daher in doppelsträngiger Form vorliegen. Ein Gleichgewicht, bei dem 70 % der sticky-ends bei RT in einzelsträngiger Form vorliegen, kann nur erklärt werden, wenn der Schmelzpunkt zu tieferen Temperaturen verschoben ist oder wenn der Übergang über einen deutlich breiteren Temperaturbereich erfolgt. Eine spektroskopische Bestimmung des Schmelzverhaltens der Verknüpfungsstelle zwischen den beiden PCR-Produkten ist problematisch, da das Signal der sticky-ends, durch den deutlich größeren Anteil an Doppelstrang überdeckt wird. Aus diesem Grund wurde die thermische Stabilität des isolierten Dimers mit Hilfe der Gelelektrophorese untersucht. Alternativ wäre eventuell eine calorimetrische Bestimmung des Schmelzverhaltens möglich. Diese Messungen würden jedoch deutlich größere Probenmengen erfordern.

* Der Schmelzpunkt wurde mit dem Online Tool „OligoAnalyzer 3.1“, für Salzkonzentrationen von 40 mM Na⁺ und 10 mM Mg²⁺ bei einer DNA-Konzentration von 0,12 μM berechnet. Die DNA-Konzentration wurde aus Messwerten abgeschätzt, die vor der Isolierung der Banden bestimmt wurden.

3.4.4.2 Stabilität der isolierten Dimerstruktur

Für die Beurteilung der folgenden Experimente ist es entscheidend, dass man sich über den Ausgangszustand der isolierten Strukturen im Klaren ist. Zunächst könnte man annehmen, dass die Isolierung der Dimerbande zu einer Probe führt, die keine Monomere enthält. Die Solubilisierung der Agarosematrix wird jedoch mit Hilfe eines chaotropen Salzes (Pyridiniumthiocyanat) erreicht, das die Wasserstoffbrücken zwischen den Agarosemolekülen aufbricht. Aus diesem Grund muss man davon ausgehen, dass auch die Basenpaarungen zwischen komplementären DNA-Sequenzen denaturiert werden. Jeweils ein Aliquot des isolierten Dimers und des isolierten Monomers wurden direkt nach der Rückgewinnung auf einem Agarosegel überprüft (Abb. 100). Erstaunlicherweise sind in beiden Proben Dimeranteile zu finden, die mit den Ergebnissen der oben beschriebenen Rehybridisierung vergleichbar sind. (Bei der Wiedergewinnung von anderen Dimerproben nach der gleichen Methode wurde die Struktur, wie erwartet, vollständig zu den entsprechenden Monomeren denaturiert.) Bei der Isolierung wurde die DNA, nach der Adsorption an die Silikamembran, mit Milli-Q-Wasser eluiert und anschließend für etwa 2 Wochen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Zwischen der Isolierung und der gezeigten Elektrophorese liegen nur wenige Stunden bei RT, in denen die Proben äquilibrieren konnten. Die scheinbar höheren Dimeranteile der in Abb. 100 gezeigten Proben sind durch eine abgeschwächte Intensität der Monomerbanden durch die Überlagerung mit dem Farbstoff des Ladepuffers zu erklären. Die Farbstoffbande ist aufgrund der geringen Hintergrundintensität in diesem Gel nicht so gut zu erkennen wie in Abb. 101, der Effekt ist aber derselbe.

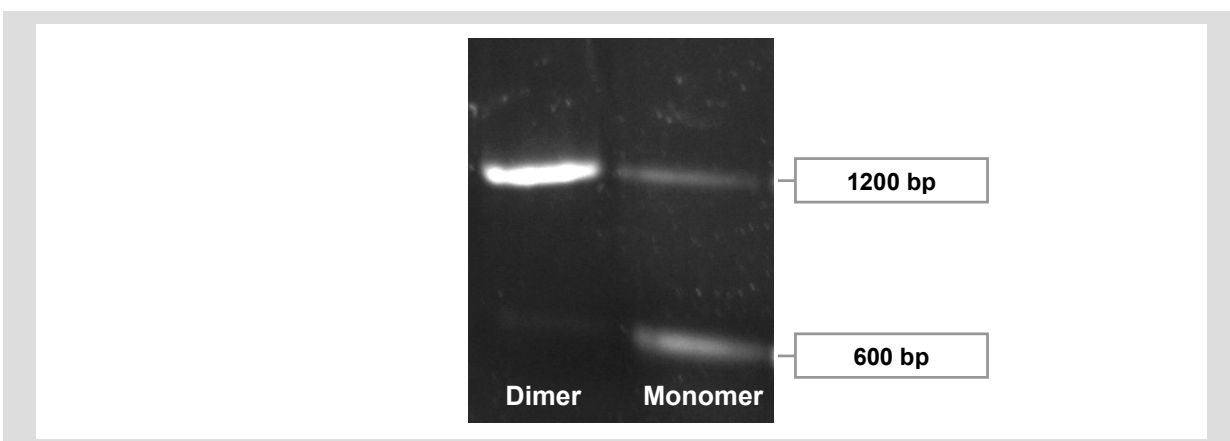


Abb. 100: Proben der isolierten Dimer- und Monomerbanden „direkt“ nach der Rückgewinnung aus dem Gel. Beide Proben wurden nach der Rückgewinnung über NucleoSpin mit Wasser eluiert. Zwischen der Isolierung und dem gezeigten Gel liegen 15 d bei -20°C und wenige Stunden bei RT. Eine quantitative Auswertung der Intensitäten ist nicht möglich, da die Monomerbanden durch den Farbstoff des Ladepuffers überdeckt werden (vgl. Abb. 101).

Zur Untersuchung der thermischen Stabilität der Dimerstruktur, wurden die in Abb. 100 gezeigten Proben bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Damit die Proben nach der

Inkubation ihren jeweiligen Hybridisierungszustand behalten und möglichst nicht rehybridisieren, wurden die Lösungen nach der Inkubation in flüssigem Stickstoff eingefroren, auf Eis aufgetaut und die anschließende Elektrophorese unter Eiskühlung durchgeführt. (Die Temperaturen in der Pufferkammer liegen bei diesem Vorgehen zwischen 5 und 10 °C.) Nach einer Inkubationszeit von 14 h bei 10, 20 bzw. 30 °C treten weder in reinem Wasser, noch in TAE/Mg-Puffer deutliche Änderung auf (Abb. 101 A). Eine Inkubation von 3 h bei 45, 60 bzw. 75 °C in TAE/Mg-Puffer (Abb. 101 B) zeigt, dass die thermische Stabilität etwas niedriger liegt, als man es aufgrund des Schmelzpunktes der sticky-end-Sequenzen erwarten würde: Bis 45 °C bleiben die relativen Intensitäten der Monomer- und Dimerbanden weitgehend unverändert, bei 60 °C wird die Dimerbande vollständig denaturiert, obwohl man bei einer Schmelztemperatur von 61,4 °C etwa 50 % der Einzelstränge im Doppelstrangzustand erwarten würde.

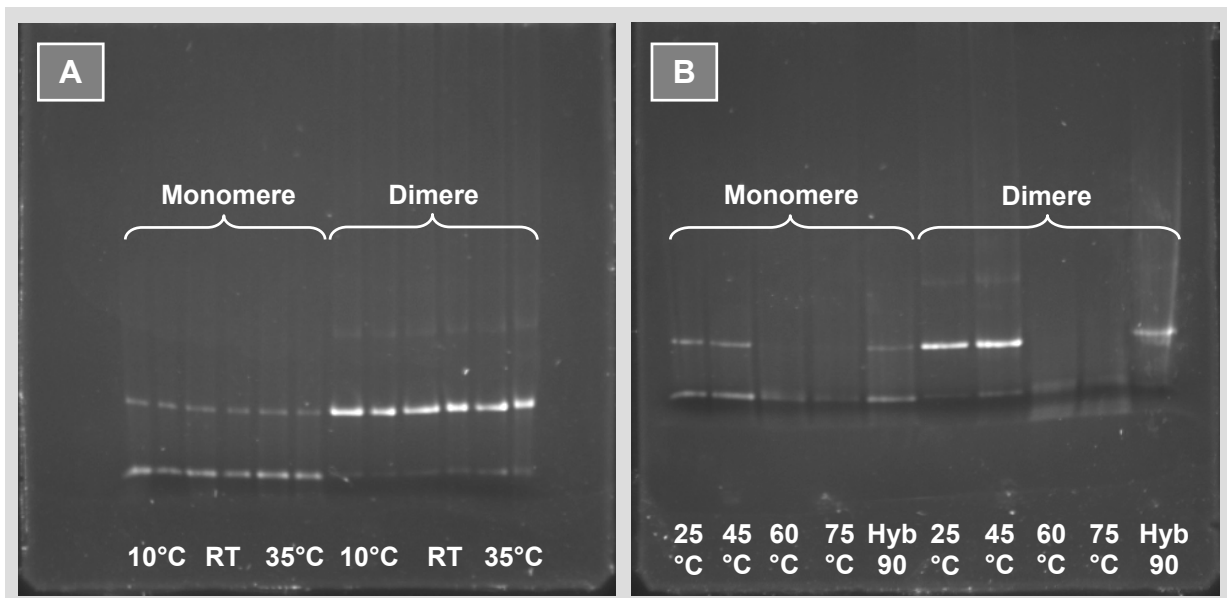


Abb. 101: Thermische Stabilität der dimeren Struktur. A: Proben der isolierten Monomer- und Dimerbanden nach 14 h Inkubation bei verschiedenen Temperaturen. Die verschiedenen Temperaturen sind am unteren Rand des Gels angegeben. Die Inkubation erfolgte jeweils einmal in Wasser (Spuren 1, 3, 5, 7, 9, 11) und einmal in TAE/Mg-Puffer (Spuren 2, 4, 6, 8, 10, 12). B: Spuren 1-5: Isolierte Monomerbande nach 3 h Inkubation bei RT, 45°C, 60°C, 75°C bzw. nach Hyb90.CYC. Spuren 6-10: Isolierte Dimerbande nach 3 h Inkubation bei RT, 45°C, 60°C, 75°C bzw. nach Hyb90.CYC. Bei diesen Proben erfolgte die Inkubation in TAE/Mg-Puffer. Eine quantitative Auswertung der Intensitäten ist nicht möglich, da die Monomerbanden durch den Farbstoff des Ladepuffers überdeckt werden (Das Bromphenolblau aus dem Ladepuffer ist im Gel als dunkler Streifen auf Höhe der 600 bp-Bande zu erkennen.)

Für eine exakte Bestimmung des Schmelzpunktes ist die Methode zu ungenau, es ist aber klar erkennbar, dass der Schmelzpunkt im Bereich zwischen 45 und 60 °C liegt. Der bei der Rehybridisierung von denaturierten Proben erreichte Zustand, mit einem Dimeranteil von 70 % bei RT, kann daher nicht durch einen erniedrigten Schmelzpunkt der sticky-end-Sequenzen erklärt werden. Wenn der Übergang zwischen Einzel- und Doppelsträngen über einen ungewöhnlich breiten Temperaturbereich erfolgen würde, müssten die Inkubationen bei 10 °C, RT bzw. 35 °C unterschiedliche Dimeranteile zeigen.

3.4.4.2.3 Rückbildung der dimeren Struktur nach Denaturierung

Die Untersuchung der thermischen Stabilität hat gezeigt, dass der Schmelzpunkt der Dimerstruktur deutlich oberhalb von RT liegt, d.h. bei Raumtemperatur sollte das Gleichgewicht vollständig auf der Seite der Doppelstränge liegen. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass bei der Rehybridisierung der isolierten Proben kein Gleichgewichtszustand erreicht wurde. Aus diesem Grund wurde die Kinetik der Dimerisierung von PCR-Produkten untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine Probe des isolierten Dimers in zwei Fraktionen aufgeteilt. Eine Fraktion wurde 10-15 min bei 90 °C denaturiert und auf Eiswasser abgeschreckt, die andere nicht. Anschließend wurden beide Proben bei RT (20-25 °C) äquilibriert und nach 3 h, bzw. 3 d auf einem Agarosegel miteinander verglichen (Abb. 102). Durch die schlechte Qualität der Gele ist die Quantifizierung der relativen Intensitäten sicherlich nicht sehr präzise, die entscheidenden Zusammenhänge sind aber klar erkennbar: Nach 3 h ist die Dimerbande in der denaturierten Probe noch deutlich schwächer (ca. 30 %) als in der Vergleichsprobe (ca. 90 %). Nach drei Tagen zeigen beide Proben ein vergleichbares Bandenmuster (Denaturierte Probe: ca. 70 % Dimer, nicht denaturierte Probe: ca. 85 % Dimer.) Der Anteil der dimeren Zielstruktur ist außerdem mit den Ergebnissen bei der Rehybridisierung mit Hyb90.CYC vergleichbar (70 % Dimer).

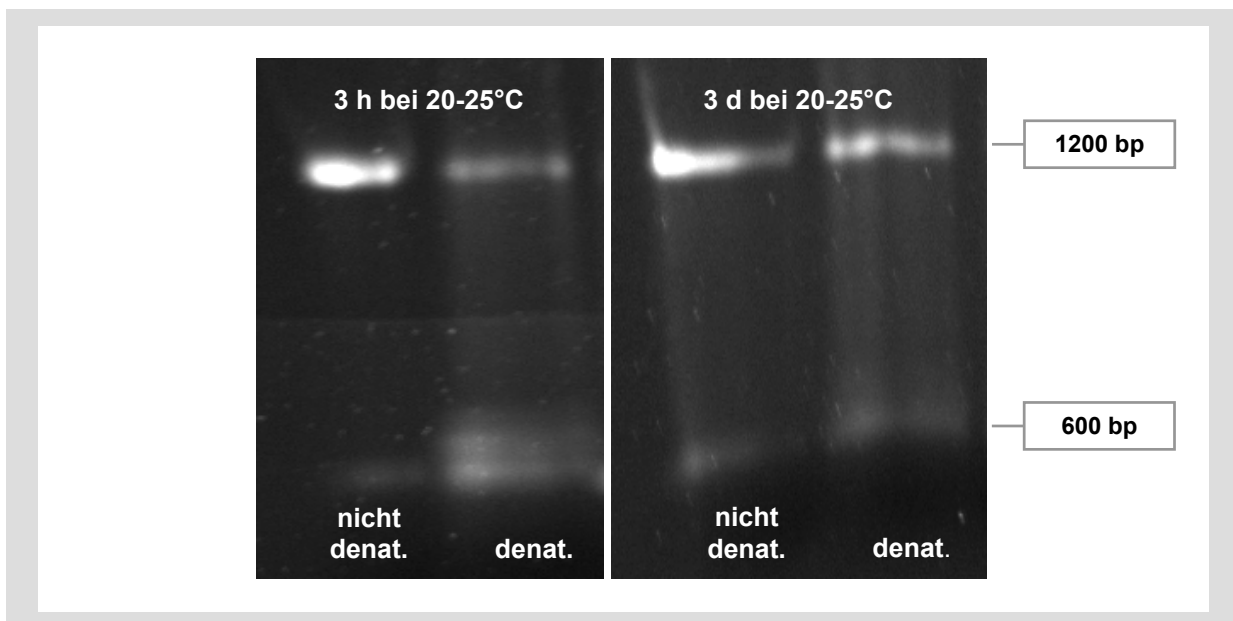


Abb. 102: Rückbildung der dimeren Struktur aus den denaturierten Komponenten. Eine Fraktion des isolierten Dimers wurde 10-15 min bei 90 °C denaturiert und auf Eiswasser abgeschreckt. Nach verschiedenen Inkubationszeiten bei RT wurde die denaturierte Probe mit einer nicht denaturierten Probe verglichen. Nach 3 h bei RT ist die Dimerbande noch nicht vollständig zurückgebildet (Denaturierte Probe: ca. 30 % Dimer, nicht denaturierte Probe: ca. 90 % Dimer). Nach 3 d bei RT zeigen beide Proben vergleichbare Bandenmuster (Denaturierte Probe: ca. 70 % Dimer, nicht denaturierte Probe: ca. 85 %).

Die Tatsache, dass die denaturierten Proben durch eine Inkubation von 3 d bei RT oder durch Hybridisierung mit Hyb90.CYC, in den gleichen Zustand wie eine nicht denaturierte Probe zurückgebracht werden können, ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass es sich um einen Gleichgewichtszustand handelt, in dem etwa 70 % der PCR-Produkte in Dimeren gebunden sind. Der Unterschied zwischen der Dimerisierung von PCR-Produkten und der quantitativen Hybridisierung von Oligonukleotiden, mit der gleichen Sequenzen wie die verwendeten sticky-ends, kann also ebenso wenig durch kinetische Effekte erklärt werden.

Die Proben, die durch Isolierung der Dimerbande erhalten werden sollten eine perfekte Stöchiometrie und 100 % hybridisierungsfähige sticky-ends aufweisen. Es wäre aber prinzipiell denkbar, dass ein Teil der überstehenden Enden bei der Aufarbeitung oder der Hybridisierung zerstört wird. Bei der Untersuchung von PCR-Produkten mit längeren überhängenden Enden (46 Basen) wurde ein Nebenprodukt beobachtet, das dem PCR-Produkt ohne überstehende Enden zugeordnet werden kann (vgl. Abschnitt 3.6.3.2.). Wenn die unvollständige Dimerisierung auf eine Zerstörung von sticky-ends zurückzuführen wäre, würde man jedoch nicht erwarten, dass voneinander unabhängig erzeugte Proben vergleichbare Ergebnisse liefern: Ein enzymatischer Abbau würde nur zufällig erfolgen, wenn die Probe, beispielsweise durch körpereigene Enzyme des Experimentators, verunreinigt wurde. Bei einem thermischen Abbau würde man bei der Hybridisierung mit Hyb90.CYC andere Ergebnisse erwarten als nach 3 d Inkubation bei RT.

Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre eine intramolekulare Wechselwirkung der sticky-ends mit dem Doppelstrangfragment. Wenn sich die überhängenden Enden auf den Doppelstrangabschnitt zurückfalten, stehen sie nicht für die Dimerisierung zur Verfügung. In diesem Fall wäre es gut denkbar, dass die Konkurrenz zwischen intra- und intermolekularen Wechselwirkungen systematisch zu einem Dimeranteil von 70 % führt. Tripelhelices werden zwar nur von speziellen Sequenzen ausgebildet (vgl. Abschnitt 2.2), die intramolekulare Wechselwirkung könnte aber auch auf hydrophoben Effekten beruhen. Diese Idee würde auch eine Erklärung für das Verhalten der isolierten Probe in Abb. 100 liefern, bei der das Einfrieren und Auftauen zu einer erstaunlich effektiven Rückbildung der dimeren Struktur führte.

Durch die Temperaturniedrigung wurden evtl. hydrophobe Wechselwirkungen aufgebrochen, die bei höheren Temperaturen in Konkurrenz mit der Doppelstrangbildung stehen. Zur Untersuchung dieses Zusammenhangs wurden Dimermischungen angesetzt und verschiedenen Temperaturzyklen unterzogen:

1. **5 Zyklen:** 4 °C für 5 min / 37 °C für 5 min
2. **69 Zyklen:** 4 °C für 5 min / mit 0,1 °C/sec auf 37 °C erwärmen
37 °C für 5 min / mit 0,1 °C/sec auf 4 °C abkühlen
3. **3 Zyklen:** -25 °C für 20 min / 20 °C für 20 min

Der Anteil des gebildeten Dimers liegt bei diesen Proben im Bereich von 44-65 %, d.h. hydrophobe Wechselwirkungen spielen entweder keine Rolle oder die getesteten Temperaturzyklen konnten lediglich nicht den erwünschten Effekt erzielen.

3.4.5 Zusammenfassung und Ausblick

Der entscheidende Ansatzpunkt des vorgestellten Synthesewegs ist die Einführung von neuen Sequenzabschnitten an den Enden eines DNA Amplifikats durch die Verwendung von teilkomplementären Primern. Durch diese Herangehensweise ist es möglich die Erkennungssequenz eines beliebigen Enzyms einzuführen, das anschließend zur Manipulation des erzeugten PCR-Produkts genutzt werden kann. Bei den vorgestellten Experimenten wurde das „Uracyl Specific Excision Reagent“ verwendet, das in der Lage ist gezielte Einzelstrangbrüche in uridinmodifizierten Sequenzen zu erzeugen. Durch die Modifizierung der Primer mit 2'-Desoxyuridin ist man jedoch bei der Wahl der Polymerase auf Enzyme beschränkt, die keine proofreading Funktion zeigen. Außerdem können nur 3'-überhängende Enden erzeugt werden. Beide Beschränkungen lassen sich durch die Verwendung anderer Restriktionsenzyme umgehen. In diesem Fall würden sich „Nicking Enzymes“ wie Nb.BsrDI oder Nt.AlwI anbieten, deren Schnittstellen außerhalb der Erkennungssequenz liegen:



Im Unterschied zu den Erfahrungen mit der im Abschnitt 2.3.1 beschriebenen PCR, zeigt das hier beschriebene PCR-System eine sehr gute Reproduzierbarkeit. Außerdem konnte die Ausbeute der PCR deutlich verbessert werden. Anstelle von 4 µg in einem 500 µl Ansatz, lassen sich typischerweise 5 µg in einem Reaktionsvolumen von 100 µl erzeugt, d.h. die Ausbeute konnte um mehr als das Sechsfache gesteigert werden.

Mit den erhaltenen Proben wurden verschiedene Aufarbeitungsmethoden getestet. Die selektive Fällung (Roti[®]-PCR-Clean, Roth) und die Ultrafiltration (Amicon Ultra, MWCO = 50 kDa) sind zwei Methoden, die zu einer sauberen Abtrennung der Primer führen und problemlos für große Probenmengen einsetzbar sind.

Die Bildung der sticky-ends wurde mit verschiedenen Methoden nachgewiesen:

1. Die Sequenzierung des uridinmodifizierten Stranges zeigt nach der USER-Reaktion das typische Signal des terminalen Adenins, exakt an der erwarteten Stelle.
2. Die Restriktion mit BcgI liefert die erwarteten Fragmente. Neben den Fragmentgrößen stimmen auch die relativen Intensitäten der verschiedenen Banden in der denaturierenden PAGE mit den theoretischen Erwartungen überein.
3. Die uridinmodifizierten Primer wurden am 5'-Ende mit Texas Red markiert. Durch die Abnahme der Fluoreszenz kann sowohl die Vollständigkeit der USER-Reaktion als auch die Effektivität der Trennung des PCR-Produktes von den gebildeten komplementären Oligonukleotiden überprüft werden.

Die Quantifizierung der Fluoreszenz erfolgte auf zwei verschiedenen Wegen: Die eine Möglichkeit ist der Nachweis im Agarosegel. Die Quantifizierung ist hier durch den Vergleich mit Proben bekannter Intensität möglich. Bei diesen Experimenten wurde gezeigt, dass das PCR-Produkt nach der USER-Reaktion und der Aufarbeitung der heißen Lösung über NucleoSpin weniger als 15 % der ursprünglichen Fluoreszenzintensität liefert, d. h. mindestens 85 % der überstehenden Enden liegen in der erwünschten Form vor. Die DNA-Ausbeute ist bei dieser Aufarbeitungsmethode relativ schlecht.

Die andere Möglichkeit ist der spektroskopische Nachweis der Fluoreszenzintensität in Lösung. Bei verschiedenen Proben wurden nach einmaliger Durchführung der USER-Reaktion und der denaturierenden Aufarbeitung über Ultrafiltration in Harnstofflösung, Fluoreszenzintensitäten von 12, 8 bzw. 7 % der ursprünglichen Probenlösung nachgewiesen. Die Rückgewinnungsrate der Aufarbeitungsmethode liegt zwischen 75 und 85 %. Nach einer Wiederholung der USER-Reaktion und erneuter Aufarbeitung der Proben werden nur noch 2-5 % der Fluoreszenzintensität detektiert.

Die verschiedenen analytischen Methoden sprechen demnach alle dafür, dass rund 90 % der PCR-Produkte nach einmaliger Durchführung der USER-Reaktion und 95-98 % nach zweimaliger Durchführung der USER-Reaktion, in der erwünschten Form, mit überstehenden Ende vorliegen. Die Tatsache, dass die Dimerisierung der PCR-Produkte nicht quantitativ erfolgt kann also nicht durch Unzulänglichkeiten in der Synthese der verwendeten Komponenten erklärt werden.

Obwohl der Syntheseweg zur Erzeugung von PCR-Produkten mit langen überstehenden Enden gute Ergebnisse liefert, konnte die Dimerisierung eines PCR-Produktes über zwei „Linker-Oligos“ nicht realisiert werden. In den Fluoreszenzmessungen an dem verwendeten PCR-Produkt wurden 5 % der ursprünglichen Fluoreszenzintensität detektiert. Oligonukleotide mit der gleichen Sequenz wie die überstehenden Enden des PCR-Produktes und die beiden Linker-Oligos zeigen eine quantitative Doppelstrangbildung und keinerlei Anzeichen für Fehlpaarungen. Das verwendete PCR-Produkt ist in der Lage, gut 0,7 Äq. eines komplementären Primers zu binden. Trotzdem tritt in der Mischung des PCR-Produktes mit den Linker-Oligos nur eine schwache Bande bei 1200 bp auf. Ob es sich hierbei um eine Verknüpfung über die Linker-Oligos handelt kann nicht eindeutig nachgewiesen werden, da eine vergleichbare Bande bereits im PCR-Produkt ohne Linker auftritt. Dieser Effekt ist sehr wahrscheinlich durch eine Wechselwirkung zwischen den Helixenden zu erklären. Ein möglicher Erklärungsansatz für die schlechte Dimerisierungseffektivität wäre hier die Idee, dass die Verknüpfungsstelle durch die großen Massen der PCR-Produkte so stark belastet wird, dass sich der Schmelzpunkt der sticky-ends im Vergleich zu den reinen Oligonukleotiden erniedrigt. Die Untersuchung der thermischen Stabilität von Dimeren aus PCR-Produkten mit komplementären sticky-ends hat jedoch gezeigt, dass dieser Effekt nicht stark genug ist, um die extrem schlechte Dimerisierungseffektivität über Linker-Oligos zu erklären.

Die Dimerisierung von zwei verschiedenen PCR-Produkten mit komplementären sticky-ends ist deutlich effektiver als die Verknüpfung über Linker-Oligos. Hier liefert die Hybridisierung einer stöchiometrischen Mischung ca. 60 % der erwünschten Struktur. Die thermodynamische Stabilität liegt etwas niedriger, als es aufgrund des Schmelzpunktes der sticky-ends ($T_m = 61,4 \text{ }^\circ\text{C}$) zu erwarten wäre. Bis $45 \text{ }^\circ\text{C}$ bleibt die dimere Struktur stabil, ab $60 \text{ }^\circ\text{C}$ erfolgt eine vollständige Denaturierung. Erstaunlicherweise ist die Dimerisierung relativ unabhängig von der Zusammensetzung der Hybridisierungslösung. Verschiedene Mischungen mit 0,5-1,5 Äq. des einen PCR-Produkts führen zu Dimeranteilen zwischen 55 und 65 %. Wenn eine der beiden Komponenten im Überschuss vorliegt ist die Hybridisierung deutlich effektiver als in der stöchiometrischen Mischung.

Durch die Isolierung der Dimerbande aus einem Agarosegel wurden Proben erzeugt, die eine perfekte Stöchiometrie und 100 % hybridisierungsfähige sticky-ends aufweisen sollten. Die Denaturierung und Rehybridisierung dieser Proben liefert einen vergleichbaren Wert. Durch verschiedene Hybridisierungsbedingungen (Hyb90.CYC bzw. 3 d Inkubation bei 20-25 °C) werden 70 % der PCR-Produkte in der dimeren Struktur gebunden. Die Untersuchungen an diesen Proben haben gezeigt, dass der Unterschied zwischen der Dimerisierung von PCR-Produkten und der quantitativen Hybridisierung von Oligonukleotiden, weder durch einen erniedrigten Schmelzpunkt der Verknüpfungsstelle noch durch kinetische Effekte erklärt werden kann.

Die verschiedenen Hybridisierungsexperimente liefern übereinstimmende Ergebnisse: Das PCR-Produkt ist in der Lage rund 0,7 Äq. eines komplementären Primers zu binden. Bei perfekter Stöchiometrie und 100 % hybridisierungsfähigen sticky-ends ist offenbar ein Gleichgewicht erreicht, bei dem 70 % der PCR-Produkte im Dimer gebunden sind. PCR-Produkte mit komplementären sticky-ends, bei denen nur 90 % der überstehenden Enden in erwünschter Form vorliegen, liefern einen Dimeranteil von 60 % ($0,9 \times 0,7 = 0,63$). Geht man davon aus, dass bei der Dimerisierung über Linker-Oligos jede der drei Verknüpfungen zu 67 % erfolgreich ist (das PCR-Produkt enthält 95 % freie sticky-ends), würde man 29 % der PCR-Produkte im Dimer erwarten. Die Bande bei 1200 bp in Abb. 89, Spur 4 zeigt eine relative Intensität von 24 %. Bei der unvollständigen Dimerisierung handelt es sich also offenbar um eine ganz systematisch auftretende Eigenschaft des untersuchten Systems.

3.5 Direkte Einführung von überhängenden Enden

Im letzten Abschnitt wurde beschrieben, wie die Bildung von PCR-Produkten mit langen überhängenden Ende durch die Verwendung von uridinmodifizierten Primern realisiert werden kann. Diese Methode ist bereits deutlich effektiver als die in Abschnitt 2.3 erläuterte Herangehensweise, da man nicht mehr auf die passende Lage von geeigneten Restriktionsstellen angewiesen ist und sowohl die Phosphorylierung als auch die Ligation von Oligonukleotiden wegfällt. Es wäre jedoch möglich, den Syntheseweg noch weiter zu vereinfachen, wenn eine Methode gefunden würde, die Polymerase kurz vor dem 5'-Ende des Templatstrangs zu stoppen. In diesem Fall könnten die überstehenden Enden in einem einzigen Syntheseschritt erzeugt werden. Sowohl die enzymatische Modifizierung des PCR-Produkts, als auch die Abtrennung von komplementären Oligos wäre nicht mehr erforderlich. Auf diese Weise könnte der Arbeitsaufwand auf ein Mindestmaß reduziert werden und der Syntheseweg wäre deutlich besser für die Erzeugung von DNA-Fragmenten im Milligramm-Maßstab geeignet. (Im Falle des USER-Enzyms würden durch die Umsetzung von 1 mg DNA Kosten von rund 2000 \$ entstehen.)

In der Literatur sind wenige Syntheseansätze dieser Art beschrieben. Außerdem führen diese entweder nur zu einem unvollständigen Abbruch der Polymerisation (Verwendung von Cytosin Arabinose [163]) oder zum Einbau von Sequenzabschnitten, die eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber der hydrolytischen Spaltung des DNA-Rückgrades zeigen. (Verwendung von Ribonukleotiden [164], 2'-desoxyribose [165] bzw. 1',2'-didesoxyribose [166].) In der hier vorgestellten Arbeit wurde versucht die Polymerase durch einen kurzen PEG-Spacer im Templatstrang zu stoppen. Zu diesem Zweck wurde die Sequenz der überhängenden Enden über einen PEG-Spacer mit sechs Wiederholungseinheiten an das 5'-Ende der Primersequenz gebunden. Der so modifizierte Primer wird im ersten Zyklus der PCR verlängert. Bei der Synthese des Gegenstrangs trifft die Polymerase auf den PEG-Spacer. Da an dieser Stelle keine Templatinformationen zur Verfügung stehen, sollte die Polymerisation abbrechen (Abb. 103).

Die Tatsache, dass gewisse Polymerasen bereits durch die Anwesenheit einer zusätzlichen Hydroxygruppe am 2'-C-Atom der Riboseeinheit gestoppt werden und dass die Effektivität dieses Abbruches allein durch die Stellung dieser OH-Gruppe verändert werden kann, zeigt sehr eindrucksvoll, welche enorme Selektivität die verwendeten Enzyme aufweisen. Vor diesem Hintergrund kann man erwarten, dass der Abbruch durch einen PEG-Spacer extrem effektiv erfolgen wird.

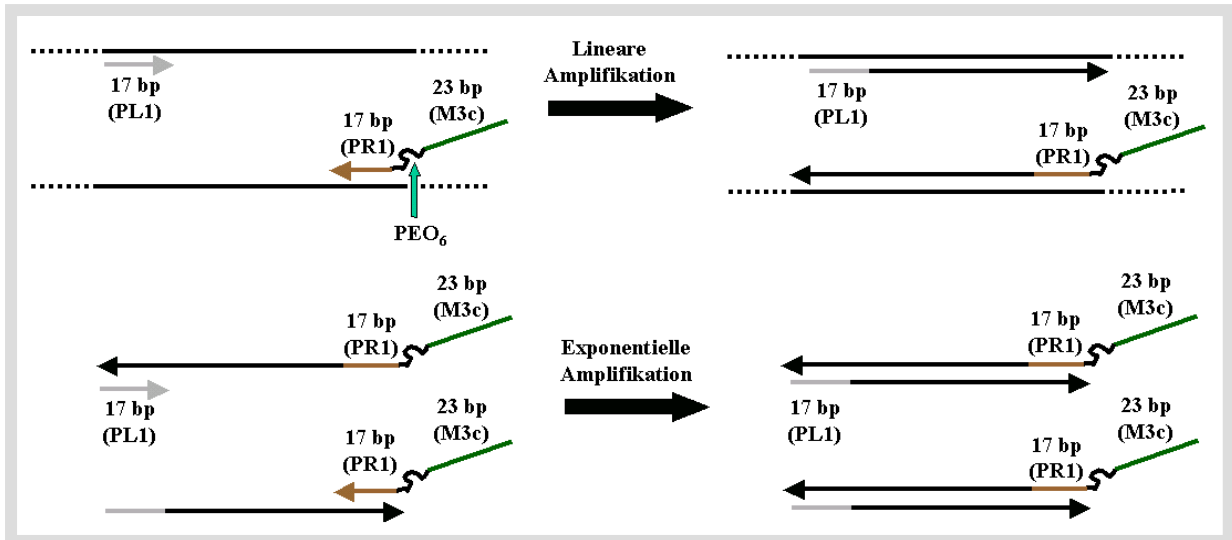


Abb. 103: Syntheschema zur Verwendung von PEG-modifizierten Primern: Der modifizierte Primer wird im ersten Zyklus normal verlängert. Im zweiten Zyklus wird die Polymerase durch den PEG-Spacer im Templatstrang gestoppt.

3.5.1 PCR mit PEG-modifizierten Primern

Die eigentlichen Primersequenzen wurden aus dem, im letzten Abschnitt beschriebenen, System übernommen. Für die überhängenden Enden kamen zwei andere, zu einander komplementär Sequenzen zum Einsatz. Die Reaktionsbedingungen für die PCR konnten problemlos auf die PEG-modifizierten Primer übertragen werden.

Verwendete Primer:

L1: Primer ohne sticky-end-Sequenz
 5'-GTC TAT TTC GTT CAT CC-3'

PR3Sp18c: Primersequenz R1 (braun), sticky-end-Sequenz M3c (dunkel grün)
 5'-TAG CGT CGT GCG AGA ACT ATC TAsp18 AAG TTC TGC TAT GTG GC-3'

PL3Sp18: Primersequenz L1 (grau), sticky-end-Sequenz M3 (hell grün)
 5'-TAG ATA GTT CTC GCA CGA CGC TAsp18 GTC TAT TTC GTT CAT CC-3'

R1: Primer ohne sticky-end-Sequenz
 5'-AAG TTC TGC TAT GTG GC-3'

sp18 = PEG-Spacer mit 6 Wiederholungseinheiten, Konturlänge ca. 2,25 nm

Abb. 104: PEG-modifizierte Primer zur Einführung von langen überstehenden Enden in der PCR. Die Primersequenzen (L1 bzw. R1) wurden beibehalten. Die sticky-end-Sequenzen (M3 bzw. M3c) wurden aus der Pentamersequenz (Anhang E) übernommen. Die beiden anderen eingesetzten Primer (PR3bSp18c und PL3bSp18) enthalten anstelle von einem Spacer18 drei Spacer-Einheiten hintereinander.

Der Nachweis der sticky-ends ist in diesem System deutlich schwieriger, als im Falle der USER-Reaktion. Der im letzten Abschnitt beschriebene, indirekte Nachweis durch die Farbstoffmarkierung der Primer, ist hier nicht möglich, da jetzt die sticky-ends direkt durch die Primer eingeführt werden und nicht durch die Synthese des Gegenstrangs entstehen.

Der Nachweis mittels Restriktionsanalyse ist in diesem System aber genauso möglich, wie im Falle der PCR mit uridinmodifizierten Primern. Die vier verwendeten Endonukleasen wurden so gewählt, dass zwei Enzyme das PCR-Produkt in der Nähe des „linken“ Endes schneiden und die beiden Anderen in der Nähe des „rechten“. Die Restriktionsversuche mit diesen Enzymen wurden an vier verschiedenen PCR-Produkten durchgeführt, die nur an einem Ende ein sticky-end tragen. Bei jeweils zwei der verwendeten Doppelstränge ist die sticky-end-Sequenz über einen PEG-Spacer an die Primersequenz gebunden. In den anderen beiden wurden drei Spacer-Einheiten hintereinander eingebaut. In beiden Varianten ist das überhängende Ende jeweils einmal mit dem „rechten“ und einmal mit dem „linken“ Primer verknüpft. Bei der Restriktion dieser vier Produkte liegen daher die Schnittstellen der verwendeten Enzyme in zwei Fällen in der Nähe des glatten Endes und in den beiden anderen Fällen in der Nähe des sticky-ends.

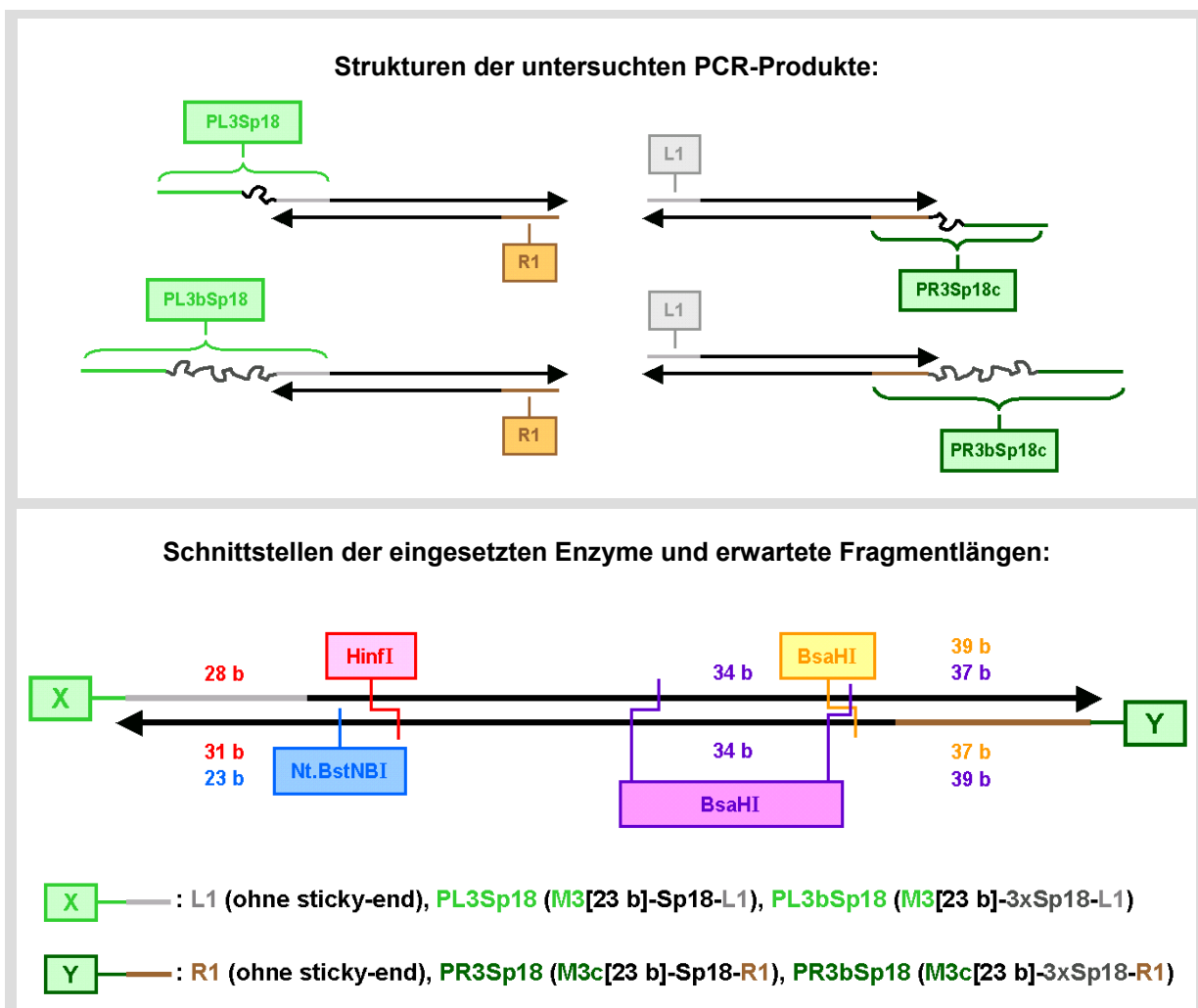


Abb. 105: Übersicht zur Restriktionsanalyse: Im oberen Teil sind die Strukturen der untersuchten PCR-Produkte und die Bezeichnungen der verwendeten Primer dargestellt. Die Doppelstrangfragmente sind in allen vier Fällen identisch. Die verschiedenen Proben unterscheiden sich nur durch die Sequenzen der sticky-ends und die Länge der PEG-Spacer. Bei zwei Proben ist das überstehende Ende mit dem linken Primer verknüpft, bei den beiden anderen mit dem rechten. Im unteren Teil sind die Schnittstellen der verwendeten Enzyme und die erwarteten Fragmentlängen gezeigt. Nt.BstNBI erzeugt nur einen Einzelstrangbruch. HinfI und BsaHI schneiden beiden Stränge zueinander versetzt, so dass sticky-ends mit einer Länge von 3 bzw. 2 Basen gebildet werden. BsaHI erzeugt Doppelstrangbrüche an zwei verschiedenen Stellen mit einem Überhang von jeweils 2 Basen.

Eine erfolgreiche Restriktion mit ein und demselben Enzym führt also bei zwei der vier Proben zu identische Ergebnisse (Restriktion in der Nähe des glatten Endes). Bei den beiden anderen Proben sollte in Abhängigkeit von der Spacerlänge eine Verschiebung des PEG-modifizierten Fragments auftreten (Restriktion in der Nähe des sticky-ends). Diese Verschiebung liefert eine zusätzliche Möglichkeit zur Identifizierung der Bande, die eine PEG-Modifizierung trägt. Aufgrund der so gebildeten „internen Standards“ ist die Interpretation der Bandenmuster im Gel weitgehend unabhängig von einem Größenvergleich mit dem DNA-Marker*. Dadurch wird die Beurteilung der Restriktionsanalyse deutlich sicherer. (Auch eine eventuelle Störung der Restriktion durch die direkte Nähe der PEG-Modifizierung sollte durch einen Vergleich der verschiedenen Proben erkennbar sein.)

Die Ergebnisse der Restriktion sind in Abb. 106 zu sehen. Die erhaltenen Fragmente entsprechen weitgehend den theoretischen Erwartungen. Die Fragmentbanden werden jedoch zum Teil durch Verunreinigungen überlagert, die offenbar aus den PCR-Produkten stammen, da diese unabhängig vom verwendeten Enzym immer auf der gleichen Höhe auftreten.

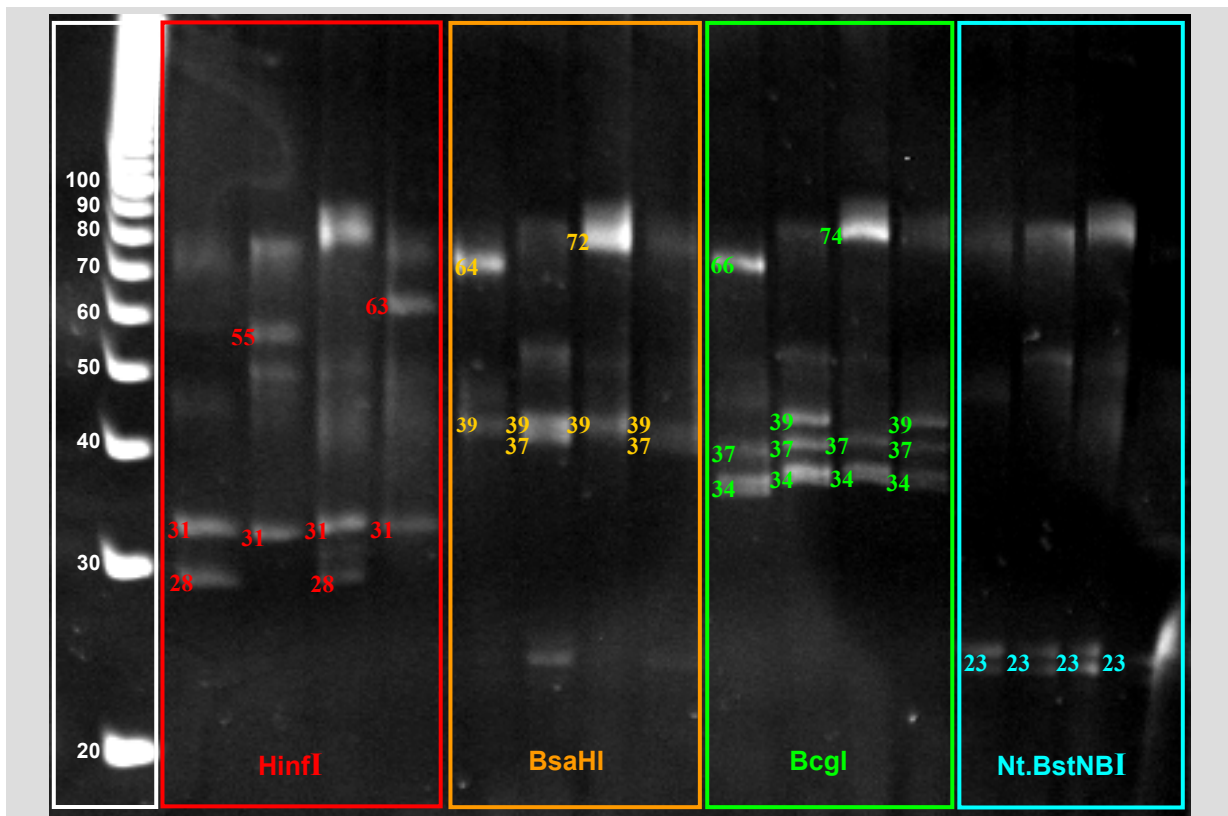


Abb. 106: Restriktionsanalysen an PCR-Produkten mit PEG-modifizierten Primern (20 % denaturierende PAGE): Die Restriktionsansätze der vier verschiedenen PCR-Produkte sind immer in der gleichen Reihenfolge aufgetragen. Von links nach rechts: PR3Sp18c (1 x PEG rechts), PL3Sp18 (1 x PEG links), PR3bSp18c (3 x PEG rechts), PL3bSp18 (3 x PEG links). Die Größen der theoretisch erwarteten Fragmente sind am Rand der zugeordneten Banden im Gel angegeben. Für jeden PEG-Spacer wurden vier zusätzliche Basen addiert. Die Erkennungssequenzen und Schnittstellen der Enzyme sind im Anhang E zu finden.

* Ein Größenvergleich mit dem DNA-Marker ist im Falle der PEG-modifizierten Fragmente relativ ungenau, da der Einfluss des flexiblen Spacers auf die Mobilität der Fragmente nur abgeschätzt werden kann.

Wenn die Polymerase durch den PEG-Spacer nicht gestoppt wird, führt die Restriktion zu einem Doppelstrangfragment, das am Ende die sticky-end-Sequenz und den entsprechenden komplementären Abschnitt trägt. Die Mobilität dieses Fragments wäre weitgehend unabhängig von der Länge des verwendeten Spacers. Eine solche Bande kann in keiner der vier Proben beobachtet werden. Das Syntheseprinzip scheint also im Rahmen der Nachweisgrenze des Gels die erwünschten Produkte zu liefern. Aufgrund der oben erwähnten Verunreinigung ist eine Quantifizierung der relativen Intensitäten der Fragmentbanden nicht möglich.

Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis der sticky-ends wäre ein direkter Vergleich der elektrophoretischen Mobilitäten von PCR-Produkten mit und ohne sticky-ends. Dieses Trennproblem ist aber nicht trivial, da sich die beiden Moleküle bei einer Größe von 600 bp um lediglich 23 Basen unterscheiden, d.h. der Unterschied in den Molmassen liegt bei knapp 2 %. Verschiedene Trennversuche mittels denaturierender PAGE führten nicht zum Erfolg. Da aber die Reaktion der Polymerase auf den PEG-Spacer unabhängig von der Länge des PCR-Produktes ist, kann die Bildung der sticky-ends auch an einem kleineren Modellsystem überprüft werden. Hier ist das Verhältnis zwischen der Gesamtlänge des PCR-Produktes und der Länge der sticky-ends für einen direkten Nachweis sehr viel günstiger. Zu diesem Zweck wurden acht verschiedene PCR Produkte erzeugt (Abb. 107, die verwendeten Primersequenzen sind im Anhang E zu finden). Bei den Proben C1 bis C4 haben die Primersequenzen am 3'-Ende eine Überlappung von 6 Basen. Diese Proben wurde jeweils einmal mit und einmal ohne Templat-DNA in der PCR hergestellt. Die erhaltenen Produkte sind in allen Fällen identisch. Aufgrund der geringen Größen der PCR-Produkte wurde auf eine Abtrennung der Primer verzichtet.

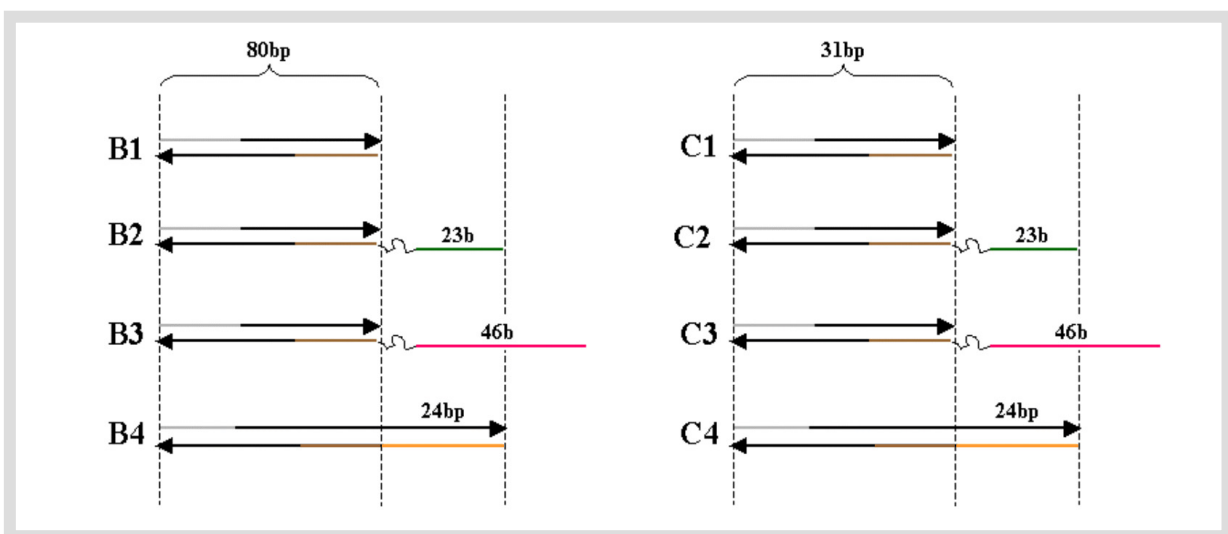


Abb. 107: Modellsysteme zum direkten Nachweis der sticky-ends in der Gelelektrophorese: Es wurden vier verschiedene PCR-Produkte mit überhängenden Enden von 23 bzw. 46 Basen und Doppelstrangsegmenten von 30 bzw. 80 bp erzeugt. Für die PCR-Produkte mit einem sticky-end von 23 b wurden Vergleichsproben ohne überhängende Enden hergestellt. Die Doppelstranglängen der Vergleichsproben entsprechen einmal dem kurzen und einmal dem langen Strang des untersuchten PCR-Produktes.

Wenn die Synthese der sticky-ends in der erwünschten Form funktioniert, müssen in der denaturierenden PAGE von B2, B3, C2 und C3 jeweils zwei unterschiedlich lange Einzelstränge auftreten. Die Mobilitäten der Einzelstränge von B2 bzw. C2 können direkt mit den Proben B1 und B4 bzw. C1 und C4 verglichen werden. Zusätzlich kann durch eine Quantifizierung der relativen Intensitäten gezeigt werden, ob die beiden unterschiedlich langen Stränge in einem Mengenverhältnis von 1:1 (n:n) auftreten. Wenn die Polymerase über den PEG-Spacer hinweg läuft, müssten in der denaturierenden PAGE zwei Einzelstränge auftreten, die sich in ihrer Länge nur durch den PEG-Spacer voneinander unterscheiden. Zumindest bei den kleineren PCR-Produkten C2 und C3, ist dieser Unterschied in der denaturierenden PAGE nachweisbar.

Die Bandenmuster der Proben mit überhängenden Enden sprechen alle für einen Erfolg des Syntheseweges (Abb. 108). Es treten jeweils zwei Banden mit vergleichbaren Intensitäten auf. Die Mobilitäten der Einzelstränge von B2, C2 und C2' stimmen mit den entsprechenden Vergleichsproben überein. Bei den Proben C2 und C2' kann eine leichte Retardation des PEG-modifizierten Stranges, im Vergleich zu C4 beobachtet werden.

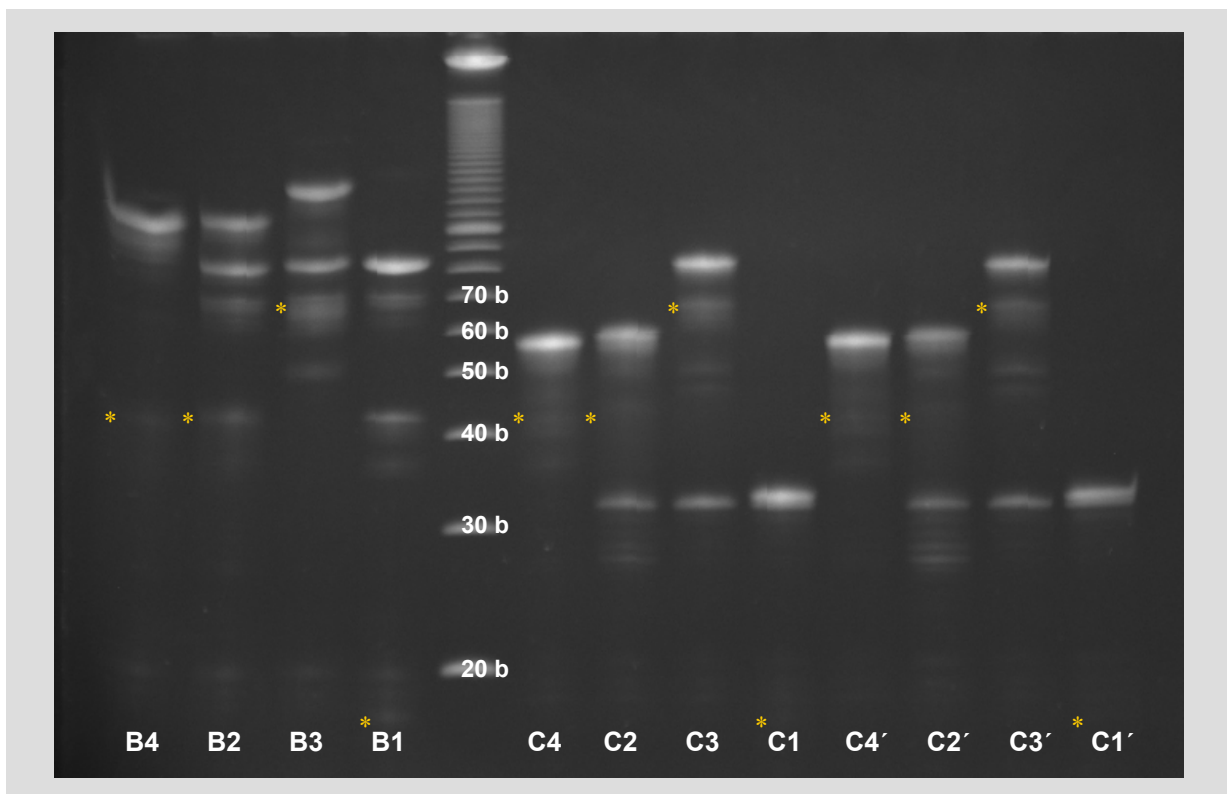


Abb. 108: Untersuchung der Modellverbindungen aus Abb. 107 (20 % denaturierende PAGE): In allen Proben mit überhängenden Enden treten, wie erwartet, zwei unterschiedlich lange DNA-Sequenzen auf. Die Stellen, an denen eine Primerbande im Gel erwartet werden kann, sind mit einem Sternchen markiert. Der zweite, nicht markierte Primer, hat bei den Proben B1-B4 eine Länge von 19 Basen und bei C1-C4 bzw. C1'-C4' eine Länge von 20 Basen. Die Proben C1-C4 und C1'-C4' unterscheiden sich nur dadurch, dass bei C1'-C4' keine Templat-DNA verwendet wurde. (Die entsprechenden Primerpaare haben am 3'-Ende eine Überlappung von 6 Basen.)

Die Auswertung der relativen Intensitäten ist in Tab. 10 zusammengefasst. Die ermittelten Intensitäten stimmen gut mit den berechneten Werten überein. Signifikante Abweichungen treten nur bei C2 und C2' auf. Diese Abweichungen sind auf die verschmierten Banden der PEG-modifizierten Stränge zurückzuführen. Das Ausschmieren führt zur Bildung einer Schulter im Intensitätenplot, wodurch die Auswertung der Peakfläche ungenau wird.

Tab. 10: Auswertung der relativen Intensitäten der Proben mit sticky-ends. Die relativen Intensitäten entsprechen den jeweiligen Anteilen der Einzelstränge in Gewichtsprozent.

Probe	Erwartete Länge	I _{rel.} (gemessen) / %	I _{rel.} (berechnet)
B2	103 b + PEG	57	56
	80 b	43	44
B3	126 b + PEG	65	61
	80 b	35	39
C2 (mit Templat)	54 b + PEG	80	64
	30 b	20	37
C3 (mit Templat)	77 b + PEG	74	71
	30 b	26	29
C2' (ohne Templat)	54 b + PEG	75	64
	30 b	25	37
C3' (ohne Templat)	77 b + PEG	69	71
	30 b	31	29

Für die Untersuchung der Modellstrukturen in der nativen PAGE bietet sich die Herstellung einer weiteren Vergleichsprobe an. Hierfür wurden gleiche Mengen der Proben B1 und B4 bzw. C1 und C4 miteinander gemischt, denaturiert und anschließend rehybridisiert. Durch dieses Vorgehen können alle möglichen Kombinationen der jeweiligen vier Einzelstränge gebildet werden. Die Vergleichsproben sollten daher Moleküle enthalten, die in ihrer Struktur bis auf den PEG-Spacer mit B2 bzw. C2 identisch sind.

Die PCR-Produkte mit einem überhängenden Ende von 23 b zeigen in der nativen PAGE ein unerwartetes Verhalten (Abb. 109). Unabhängig von der Größe zeigen diese PCR-Produkte (B2 bzw. C2) die gleiche elektrophoretische Mobilität wie die entsprechenden „großen“ Doppelstränge, bei denen das sticky-end durch ein dsDNA-Segment von 23 bp ersetzt ist (B4, bzw. C4). Die Proben mit einem Überhang von 46 Basen zeigen hingegen eine verminderte Beweglichkeit.

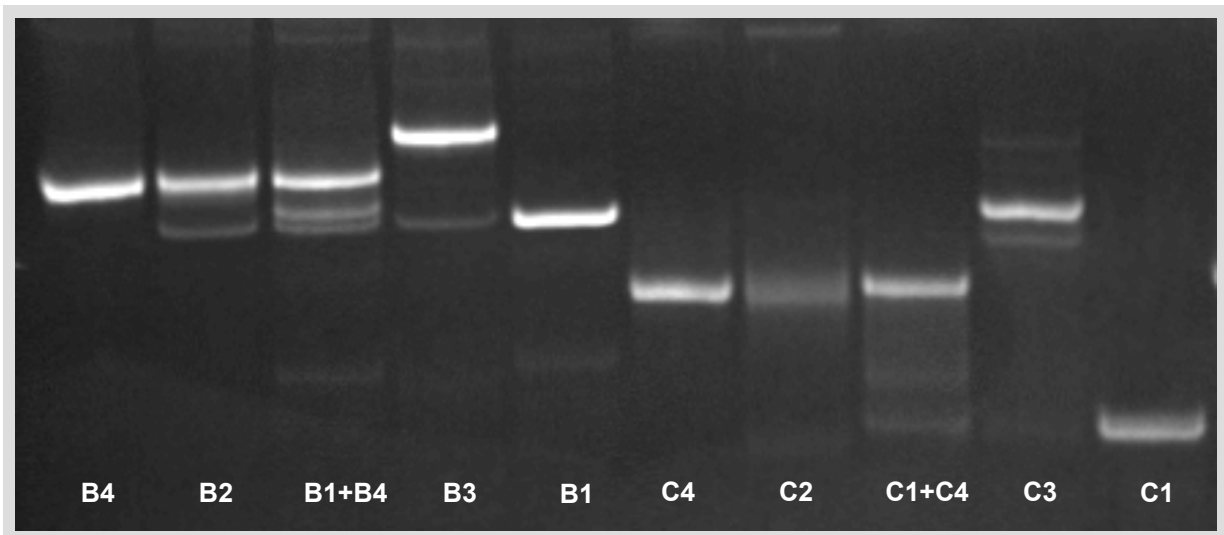


Abb. 109: Native PAGE (20 %) der Modellverbindungen B1 bis B4 und C1 bis C4. Erstaunlicherweise zeigen die Proben B2 und B4 bzw. C2 und C4 identische Mobilitäten. Das Bandenmuster der Vergleichsproben B1+B4 und C1+C4 ist nicht zu verstehen.

Die Tatsache, dass ein Einzelstrang im Vergleich zu einem Doppelstrang mit gleicher Masse (46 Basen anstelle von 23 bp) zu einer stärkeren Erniedrigung der elektrophoretischen Mobilität führt, ist gut zu verstehen, da der Doppelstrang eine sehr viel kompaktere Struktur hat, als der knäuelartige Einzelstrang. Dass die Verlängerung eines PCR-Produktes um 23 b den gleichen Einfluss hat wie die Verlängerung um 23 bp ist aber sehr erstaunlich. Hinzu kommt, dass dieser Zusammenhang sowohl von der Gesamtgröße des PCR-Produktes als auch von der Art der verwendeten Gelmatrix unabhängig ist (Abb. 110). Bei einem sticky-end von 23 b können dadurch die Nebenprodukte, die entstehen könnten, wenn die Polymerase über den Spacer hinweg läuft, weder in der nativen PAGE noch in Agarose Gelen nachgewiesen werden. Dieser Zusammenhang scheint in vergleichbarer Weise auch für das sticky-end von 46 b zuzutreffen: Die Probe C3 (31 bp + 46 b) zeigt eine ganz ähnliche Mobilität wie die Probe B1 („31 bp + 49 bp“). In den Proben mit sticky-end tritt außerdem ein anderes unerwartetes Nebenprodukt auf, das die gleiche Mobilität wie der „kleine“ Doppelstrang ohne überhängendes Ende zeigt. An PCR-Produkten mit einem überstehenden Ende von 46 b wurde die Natur dieses Nebenproduktes näher untersucht (vgl. Abschnitt 3.6.3.2). Die verschiedenen Experimente zeigen, dass sich das Nebenprodukt sehr wahrscheinlich nur durch das Fehlen des überhängende Endes vom Hauptprodukt unterscheidet. Da der PEG-Spacer und die sticky-end-Sequenz in der Festphasensynthese des Primers eingeführt werden und die Primer anschließend mittels denaturierender PAGE gereinigt wurden, kann man sicher sein, dass die verwendeten Primer in der erwünschten Form vorliegen. Ein PCR-Produkt ohne sticky-ends kann also nur gebildet werden, wenn die sticky-end-Sequenzen während der PCR, der Aufarbeitung oder der Hybridisierung abgebaut werden. Diese Zusammenhänge werden im Abschnitt 3.6.3.2 ausführlich diskutiert.

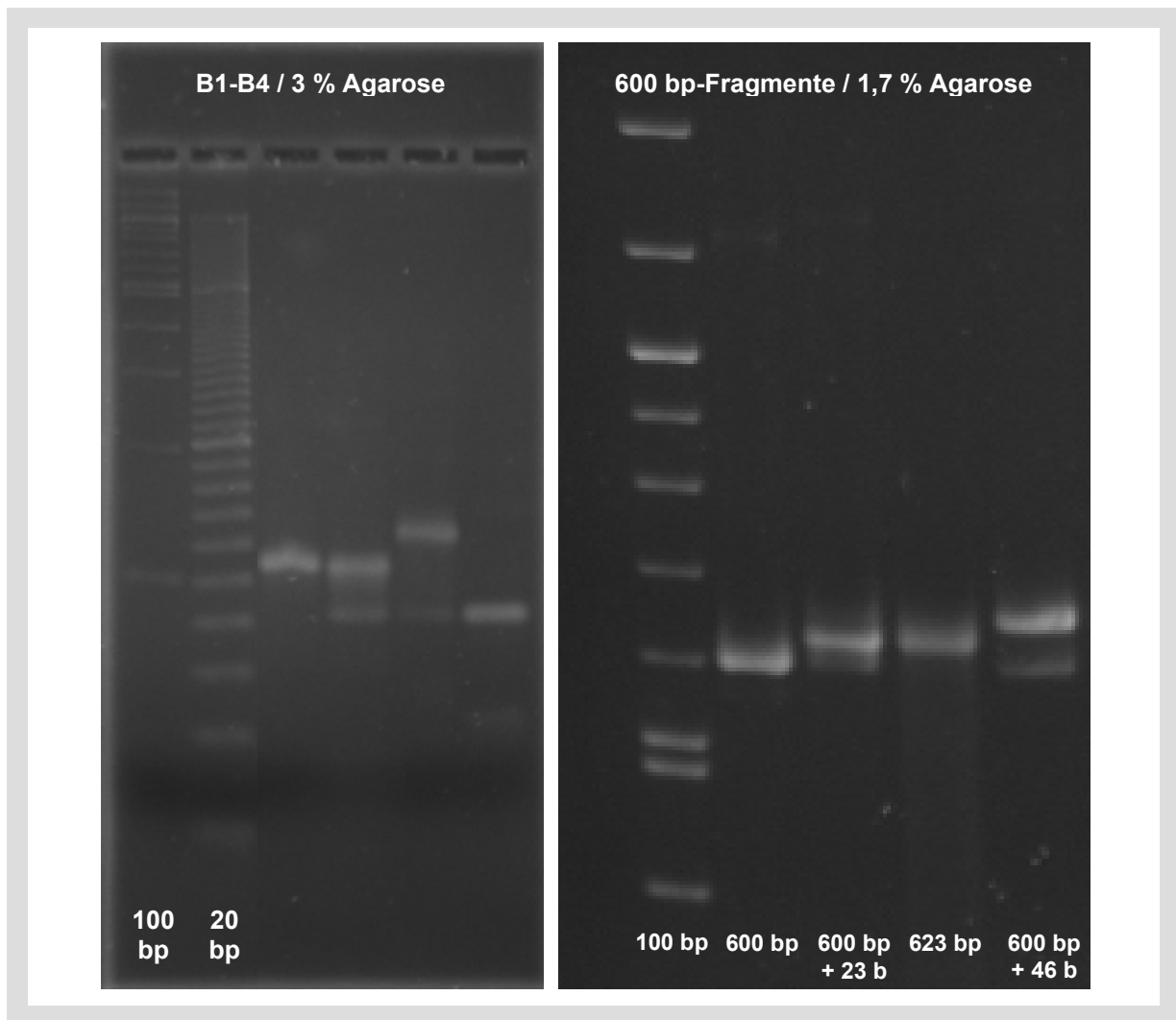


Abb. 110: Variation von Gelmatrix und Größe der PCR-Produkte: Links: 3 % Agarose: 100 bp-Marker, 20 bp-Marker, B4, B2, B3, B1. Die Proben zeigen das gleiche Verhalten wie in der nativen PAGE. Rechts: 1,7 % Agarose (Geldimensionen 180 x 130 x 3 mm): 100 bp-Marker, 600 bp-PCR-Produkt ohne Überhang, 600 bp-PCR mit 23 b sticky-end, 623 bp-PCR ohne sticky-end, 600 bp mit 46 b Überhang. Völlig unabhängig von der Länge des Doppelstrangabschnittes tritt immer das gleiche Bandenmuster auf.

3.5.2 Sequenzierung von PEG-modifizierten PCR-Produkten

Eines der PEG-modifizierten PCR-Produkte mit einem überstehenden Ende von 23 b (Primer: PL3 / PR3Sp18) wurde mittels Sanger-Sequenzierung untersucht. Die Sequenzierung erfolgte mit dem Primer PL3, der in der PCR auf der Seite des glatten Endes die Polymerisation startet, d.h. der PEG-modifizierte Strang dient in der Sequenzierung als Templat. Als Vergleichsprobe diente das entsprechende PCR-Produkt ohne überhängendes Ende (Primer: PL3 / PR3). Im Falle des PCR-Produktes ohne sticky-end läuft die Sequenzierung über die komplette Sequenz. Das Chromatogramm der Probe mit PEG-Modifizierung (Abb. 112) ist annähernd identisch mit dem der Vergleichsprobe (Abb. 111). Der charakteristische Peak des terminalen 3'-Adenosin tritt in beiden Proben exakt an der gleichen Stelle auf.

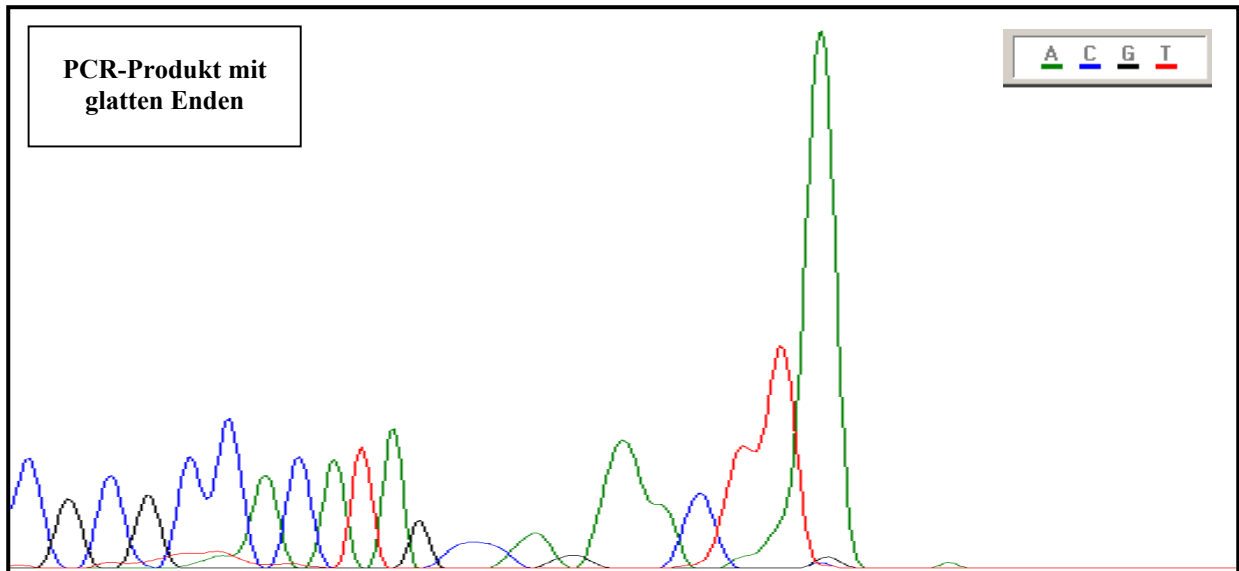


Abb. 111: Sequenzierung („dye terminator sequencing“, GENTERprise, Mainz) der Probe ohne sticky-end. Verwendete PCR-Primer: PL3 und PR3, Sequenzierungsprimer: PL3

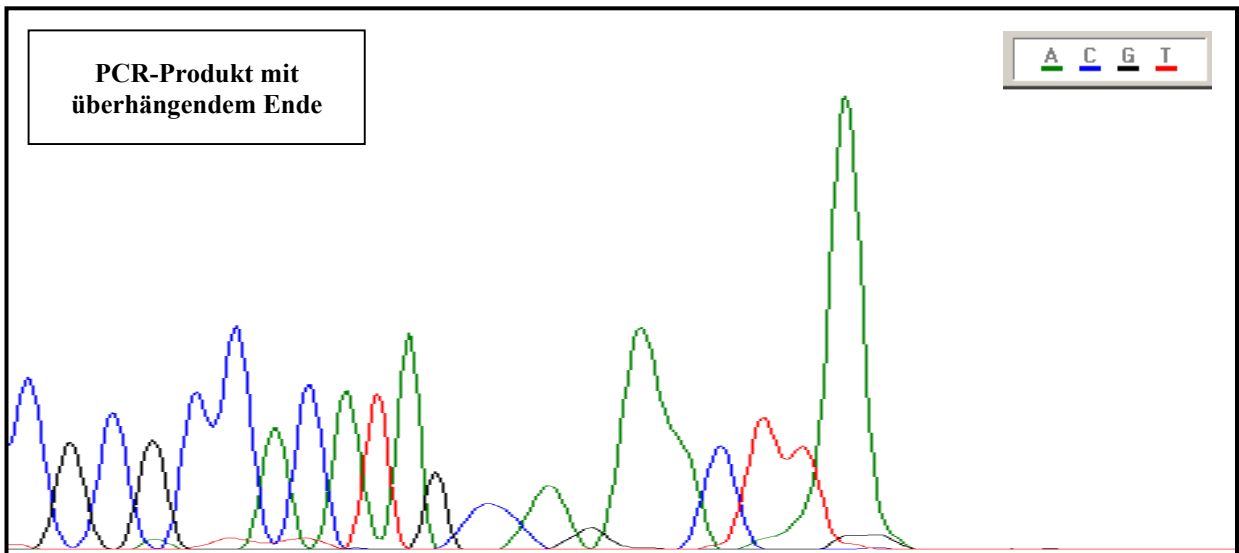


Abb. 112: : Sequenzierung der PEG-modifizierten Probe mit 23 b sticky-end. Verwendete PCR-Primer: PL3 und PR3Sp18, Sequenzierungsprimer: PL3. Das charakteristische Signal des terminalen 3'-Adenosins tritt exakt an der Stelle auf, an der die Polymerase auf den PEG-Spacer trifft.

Aus dem Verhalten der Polymerase in der Sequenzierung kann, genau genommen, nicht direkt auf das Verhalten der in der PCR verwendeten Taq Polymerase geschlossen werden, da es sich hier um zwei unterschiedliche Enzyme handelt. Die Sequenase wird aber offensichtlich sehr effektiv durch den PEG-Spacer gestoppt. Auch bei starker Vergrößerung der Peaks sind nach dem terminalen Adenosin keine weiteren Signale zu erkennen. Die Anwesenheit dieses charakteristischen Peaks ist außerdem ein Indiz dafür, dass die Polymerisation nicht einfach nur zufällig, sondern systematisch genau an dieser Stelle abgebrochen wird. Falls die Taq-Polymerase in der PCR zum Teil über die PEG-Modifizierung hinweg laufen sollte, würde ein Strang gebildet, der am 3'-Ende die zum sticky-end komplementäre Sequenz trägt. Die Sequenzierung mit einem Primer (PR5b), der an diese Sequenz binden würde, liefert keine lesbare Sequenz.

Es gibt nur eine vergleichbare Probe von Sandra Muth, bei der die Sequenzierung nicht vollständig an der Stelle des PEG-Spacers abbricht. Bei dieser Probe wird ein abrupter Abfall der Signalintensität um etwa 80-90 % beobachtet, die Sequenz des sticky-ends ist aber lesbar, obwohl bei dieser Probe die mittleren Intensitäten der Signale niedriger waren als bei der in Abb. 112 gezeigten Sequenzierung. Bei dieser Probe handelt es sich um ein PEG-modifiziertes PCR-Produkt, das durch Ligation in ein Plasmid integriert wurde. Das erhaltene Konstrukt wurde mit zwei Primern erneut amplifiziert, die zu einer Vervielfältigung des eingeführten Integrats führen [167]. An diesem Produkt wurde die oben erwähnte Sequenzierung durchgeführt. Selbst wenn bei der Erzeugung des Integrats nur wenige Moleküle entstehen, bei denen die Polymerase über den PEG-Spacer hinwegläuft, werden diese in der folgenden PCR exponentiell vervielfältigt und können somit in der Sequenzierung nachgewiesen werden.

3.5.3 Hybridisierungsversuche mit PEG-modifizierten PCR-Produkten

Als einfachstes System bietet sich auch hier die Dimerisierung von zwei PCR-Produkten mit komplementären überhängenden Enden an:

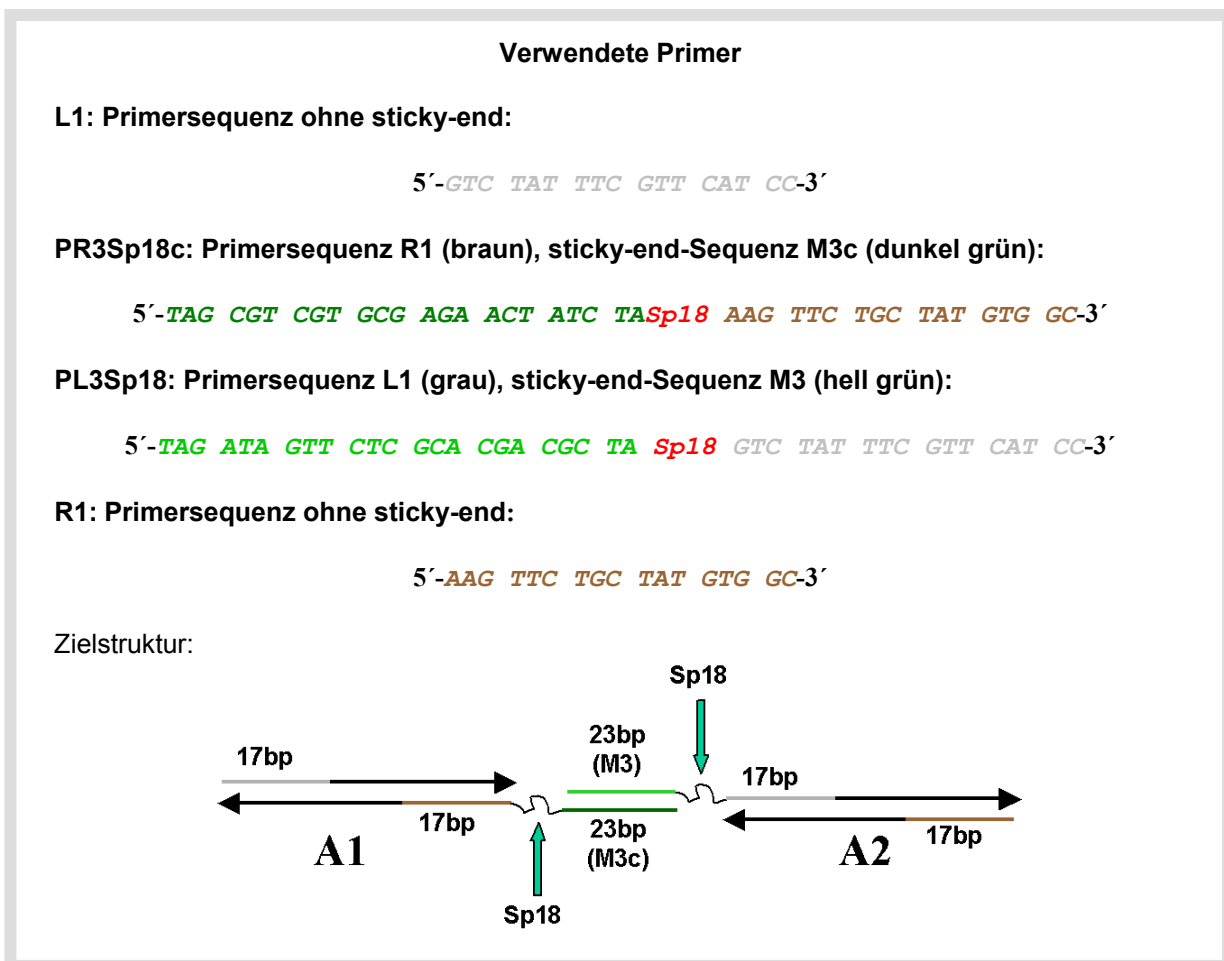


Abb. 113: Verwendete Primer und Zielstruktur der Verknüpfung von PCR-Produkten über komplementäre sticky-ends. Die sticky-end-Sequenzen (M3 bzw. M3c) wurden aus der Pentamersequenz (Anhang E) übernommen. Die beiden anderen eingesetzten Primer (PR3bSp18c und PL3bSp18) enthalten an Stelle von einem Spacer18 drei Spacer-Einheiten hintereinander.

Die ersten Hybridisierungsexperimente mit PEG-modifizierten DNA-Fragmenten führten zu sehr unbefriedigenden Ergebnissen. Wie auch schon bei den PCR-Produkten aus der USER-Reaktion tritt bereits in den einzelnen PCR-Produkten eine Bande bei doppelter Masse auf, die in Wasser durch Erhitzen und schnelles Abkühlen denaturiert werden kann. Die Dimerbande in den Mischungen von PCR-Produkten mit komplementären überhängenden Enden ist nur wenig stärker als in den einzelnen Komponenten (Abb. 114 A). Bei einer Strukturbildung aus Oligonukleotiden wurde ein deutlicher Einfluss des verwendeten Elektrophoresepuffers beobachtet. Hier hatte sich gezeigt, dass die Verwendung von TAE/Mg-Puffer im Vergleich zu TBE Puffer eine positive Wirkung auf die Stabilität von hybridisierten Strukturen ausübt. Im Falle der hier verwendeten PCR-Produkte kann dieser Zusammenhang nicht beobachtet werden (Abb. 114 B). Wiederholungsexperimente mit Primern, die an Stelle von einem Spacer, drei Spacer-Einheiten hintereinander tragen, zeigten vergleichbare Dimerisierungseffektivitäten.

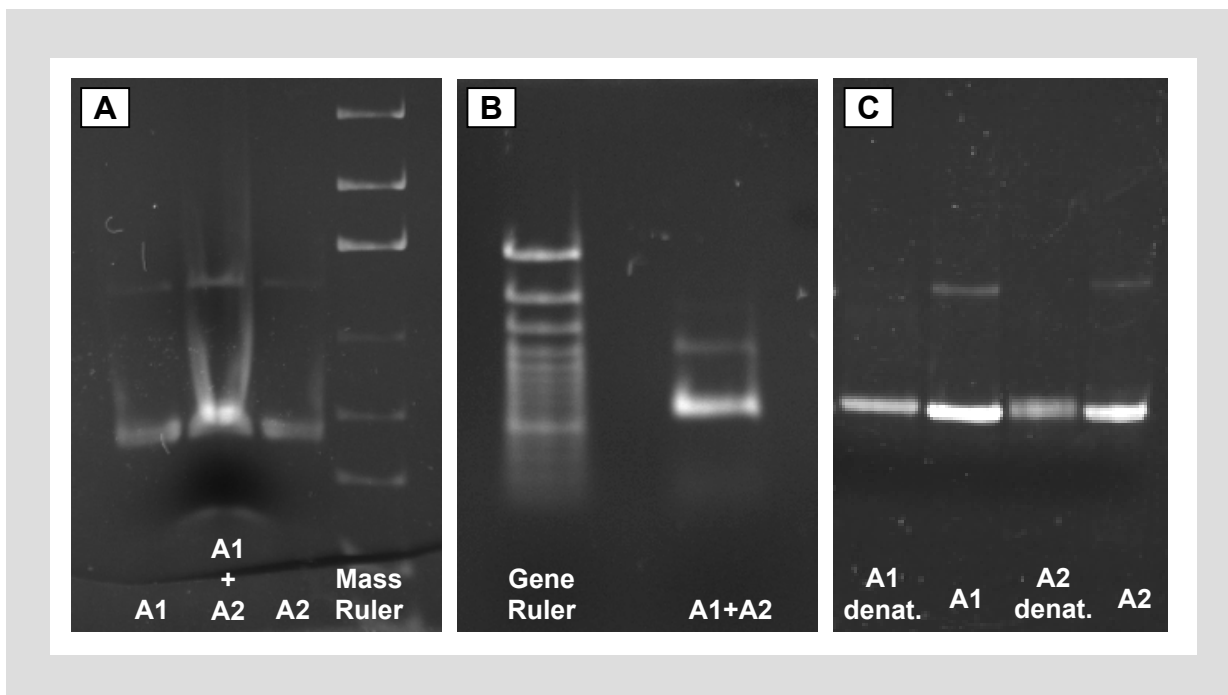


Abb. 114: Hybridisierung von PEG-modifizierten PCR-Produkten (A1 bzw. A2) mit komplementären sticky-ends. Für die Hybridisierung wurde eine stöchiometrische Mischung [$c(A1) = c(A2) = 0,02\mu M$] in TAE/Mg-Puffer mit dem Temperaturprogramm HybF70.CYC inkubiert. A: Elektrophorese in TBE-Puffer, B: Elektrophorese in TAE/Mg-Puffer, C: Verwendete PCR-Produkte vor und nach Denaturierung in Wasser bei 90°C und Abschrecken auf Eiswasser.

Für die weiteren Experimente wurden die gleichen PCR-Produkte noch einmal in größeren Mengen erzeugt. Wie auch schon bei den PCR-Produkten mit uridinmodifizierten Primern sollte die dimere Struktur über die Gelelektrophorese abgetrennt werden, um eine perfekte Stöchiometrie und 100 % hybridisierungsfähige sticky-ends zu garantieren. Bei diesem Trennversuch zeigen sich unerwartet viele Banden in der Gelelektrophorese (Abb. 115).

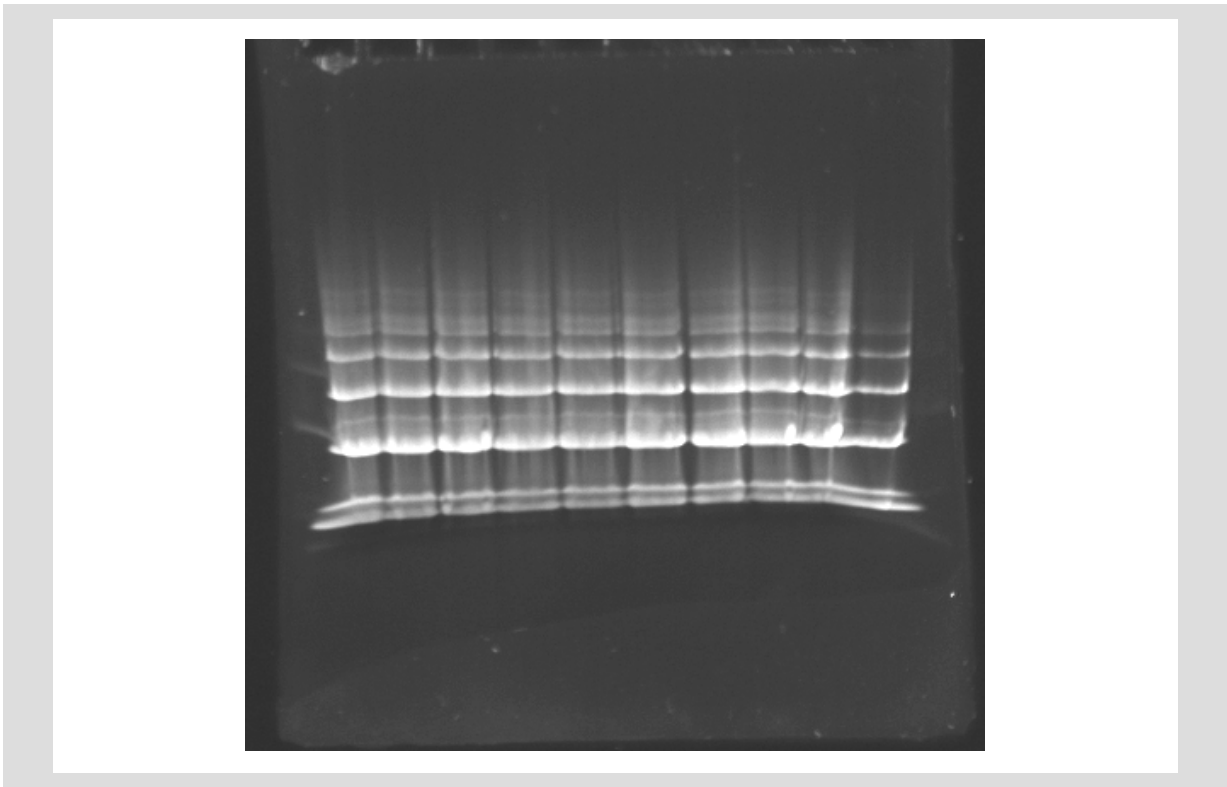


Abb. 115: Isolierungsversuch eines Dimers aus PEG-modifizierten PCR-Produkten. Die Hybridisierung der PCR-Produkte mit komplementären sticky-ends erfolgte mit Hyb90.CYC [$c(A1) = c(A2) = 0,08 \mu\text{M}$]. Nach der Hybridisierung treten unerwartet viele Banden in der Gelelektrophorese auf.

Die verwendeten PCR-Produkte wurden einzeln auf einem Agarosegel überprüft. Beide Proben zeigen eine saubere Produktbande. Als „Nebenprodukt“ tritt nur die bereits in Abb. 114 beobachtete Bande bei doppelter Masse des PCR-Produkts auf. Bei den zusätzlichen Banden in Abb. 115 muss es sich also um eine unerwünschte Wechselwirkung zwischen den PCR-Produkten handeln. Prinzipiell kommen vier verschiedene Möglichkeiten in Betracht:

- Unerwünschte Wechselwirkungen zwischen sticky-ends.
- Wechselwirkungen von sticky-ends mit Doppelsträngen.
- Wechselwirkungen zwischen mehreren Doppelsträngen.
- Sekundärstrukturen, an denen einzelne oder mehrere Stränge beteiligt sind.

Wenn die Bildung der Nebenprodukte durch eine der drei denkbaren Wechselwirkungen verursacht wird, sollte es möglich sein diese durch erhöhte Temperaturen zu zerstören. Falls es sich bei den zusätzlichen Banden um alternative Strukturen handelt, die mit der Zielstruktur in Konkurrenz stehen, sollten die Ergebnisse außerdem von der Temperatur während der Hybridisierung abhängen. Zur Untersuchung dieser Zusammenhänge wurde eine neue Dimermischung angesetzt, bei 90 °C denaturiert und auf Eiswasser abgeschreckt, um alle

unerwünschten Wechselwirkungen aufzubrechen. Anschließend wurde der Ansatz bei verschiedenen Temperaturen hybridisiert. Dabei sollte ein möglichst großer Temperaturbereich abgedeckt werden, um das Verhalten der Probe zu testen. Nach der Inkubation wurden alle Proben auf Eiswasser abgeschreckt und mit dem Ladepuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte unter Eiskühlung. (Die Temperatur in der Pufferkammer liegt hierbei im Bereich von 5-10°C.). Durch dieses Vorgehen soll eine Renaturierung nach der erfolgten Inkubation bzw. während der Gelelektrophorese vermieden werden.

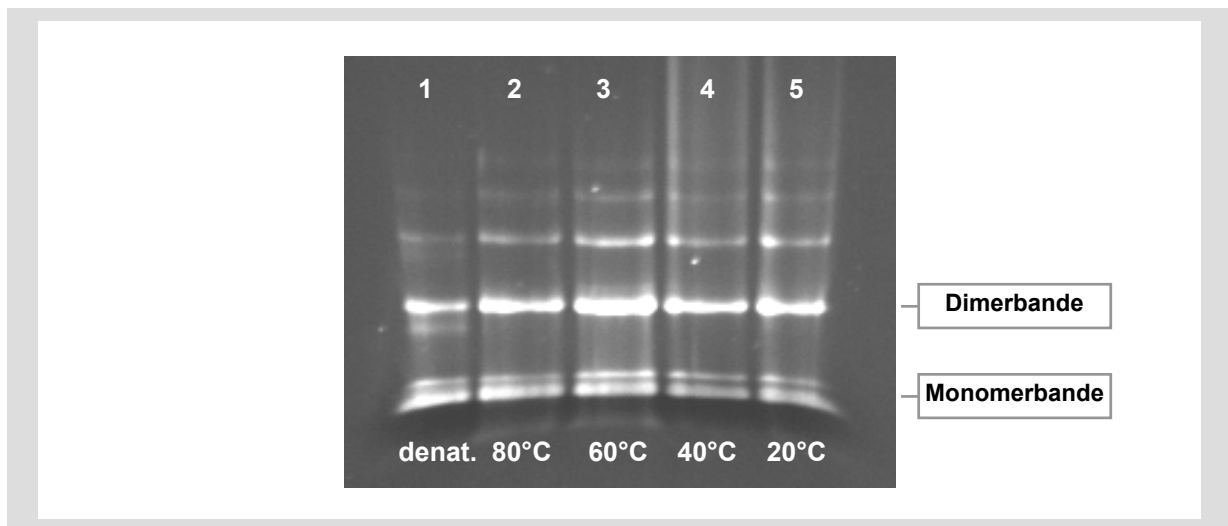


Abb. 116: Äquilibration der denaturierten Dimermischung bei verschiedenen Temperaturen. Die relative Intensität der Dimerbande ist jeweils in Klammern angegeben. Spur 1: Dimermischung direkt nach der Denaturierung (30 %), Spur 2-5; Dimermischung nach Denaturierung und Inkubation für 2 h 45 min bei 80 °C (46 %), 60 °C (50 %), 40 °C (54 %) bzw. 20 °C (48 %) und anschließendem Abschrecken auf Eis.

Die verschiedenen Äquilibrationstemperaturen zeigen keinen systematischen Einfluss. Die zusätzlichen Banden oberhalb von 1200 bp treten in allen Ansätzen mit vergleichbaren Intensitäten auf. Selbst in der denaturierten Probe ist noch eine starke Bande auf Höhe des Dimers zu sehen. Unter den gewählten Bedingungen konnten die Wechselwirkungen offenbar nicht vollständig zerstört werden oder die Proben bilden sich im Verlauf des Experiments erneut.

Um sicher zu gehen, dass vor der Hybridisierung alle Wechselwirkungen aufgebrochen sind, wurde die Denaturierung näher untersucht. Hierbei zeigt sich, dass die Denaturierung in Puffer, anders als in Wasser, nach dem Abkühlen auf Eis unvollständig ist (vgl. Abb. 114 C bzw. Abb. 117 A und B). Die Experimente zur thermischen Stabilität der dimeren Struktur an den Proben aus der USER-Reaktion haben gezeigt, dass der Schmelzpunkt der sticky-ends im Bereich zwischen 45 und 60 °C liegt. Die denaturierten Proben müssen also im Puffer, selbst bei niedrigen Temperaturen, relativ schnell renaturieren. Dieses Ergebnis steht jedoch im Widerspruch zu den Ergebnissen aus den Rehybridisierungsexperimenten mit den PCR-Produkten aus der USER-Reaktion. Eine denaturierte Dimer Probe zeigte hier erst nach drei

Tagen bei RT (20-25°C) das gleiche Bandenmuster wie die nicht denaturierte Vergleichsprobe. Wenn man die Proben nicht in Eiswasser, sondern in flüssigem Stickstoff abschreckt und auf Eis auftauen lässt, bleibt die dimere Struktur in denaturierter Form bestehen. Trotzdem werden zwei schwache Banden bei ca. 1200 bp detektiert (Abb. 117 C). Da diese Bandenmuster bei einem einzelnen PCR-Produkt und einer denaturierten Dimerprobe identisch sind, ist es nicht möglich die Banden bei 1200 bp durch eine Hybridisierung der sticky-ends zu erklären. Eventuell handelt es sich hier um denselben merkwürdigen Effekt, der auch in der denaturierenden PAGE von Oligonukleotiden auftritt: Obwohl die Proben vor der Gelelektrophorese in einem denaturierenden Ladepuffer (90 % Formamid) erhitzt und in kaltem Wasser abgeschreckt werden, die Gelmatrix 50 gew% Harnstoff enthält und die Elektrophorese bei 50 °C erfolgt, werden regelmäßig Banden bei doppelter Molmasse beobachtet.

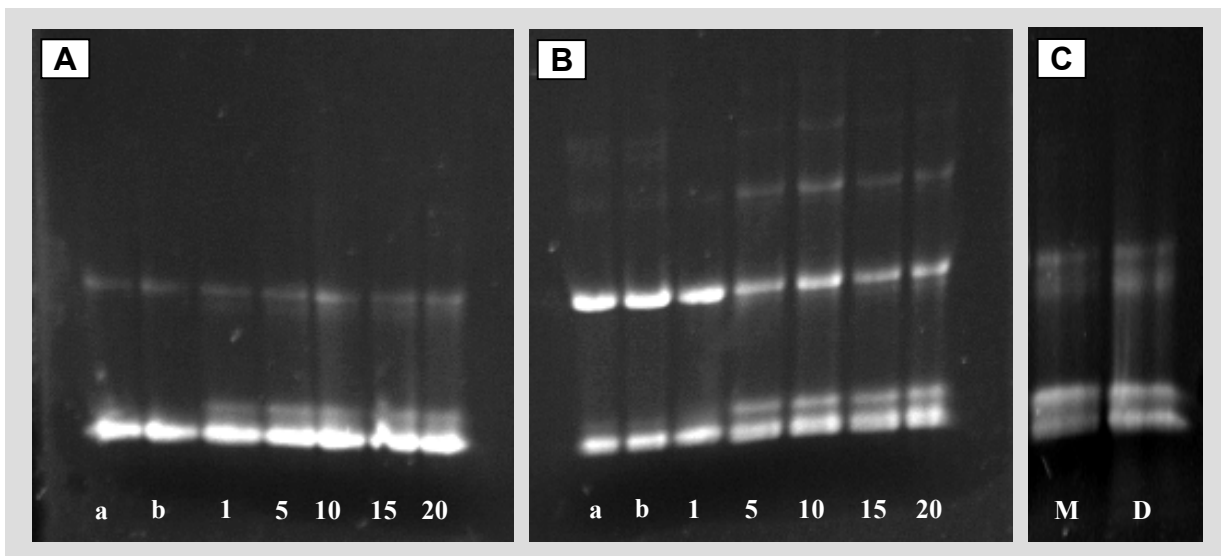


Abb. 117: Denaturierungsversuche: Ein Monomer (A) und eine frisch angesetzte Dimermischung (B) wurden unterschiedlich lange bei 90 °C denaturiert und auf Eiswasser abgeschreckt. Die Denaturierungszeiten bei 90 °C sind in Minuten unter den jeweiligen Proben im Gel vermerkt. Jeweils die beiden ersten Proben wurden nicht denaturiert sondern ca. 20 min bei RT aufbewahrt. Die Zugabe des Ladepuffers wurde bei RT (a), bzw. unter Eiskühlung (b), wie bei den denaturierten Proben durchgeführt. C: Ein Monomer (M) bzw. eine Dimermischung (D) wurden 15 min. bei 95 °C denaturiert und in flüssigem Stickstoff abgeschreckt.

Bei den denaturierten Dimermischungen (Abb. 117 B) können gewisse Trends beobachtet werden. Die zusätzliche Bande kurz oberhalb des PCR-Produktes tritt nur nach der Denaturierung auf. Diese wird durch die Denaturierung des gesamten PCR-Produktes erzeugt. Der entsprechende Einzelstrang zeigt eine verminderte Mobilität im Gel. Die Nebenprodukte, die eine geringere Mobilität als das Dimer zeigen, treten ebenfalls nur in den denaturierten Proben auf. Frisch angesetzte Dimermischungen, die lediglich bei RT inkubiert wurden, zeigen eine relativ effektive Dimerisierung. Ganz anders als erwartet wird offenbar die Bildung der Nebenprodukte durch das Erhitzen auf 90 °C nicht verhindert, sondern verstärkt.

Da sich die hier untersuchten Proben nur durch die PEG-Modifizierung und die Sequenzen der sticky-ends von den Proben aus der USER-Reaktion unterscheiden, ist es naheliegend die Bildung der hochmolekularen Nebenprodukte mit den verwendeten sticky-ends in Verbindung zu bringen. Aus diesem Grund wurde das Verhalten von PEG-modifizierten PCR-Produkten mit anderen stick-end-Sequenzen untersucht. Zusätzliche wurden Mischungen untersucht, die PCR-Produkte mit nicht komplementären sticky-ends enthalten bzw. Mischungen in denen nur eines der beiden Doppelstrangfragmente einen Überhang trägt.

In Mischungen von PCR-Produkten mit und ohne sticky-ends werden die zusätzlichen Banden nach der Inkubation mit Hyb90.CYC nicht beobachtet (Abb. 118 A). Eine Inkubation von 2 h bei 50 °C führt bei einer Dimermischung mit komplementären überhängenden Enden, unabhängig von den verwendeten sticky-end-Sequenzen, zu einer relativ effektiven Dimerisierung (45-60 % Dimer), ohne dass Nebenprodukte gebildet werden. In Mischungen von PCR-Produkten mit nicht komplementären sticky-ends treten keine Wechselwirkungen auf (Abb. 118 B).

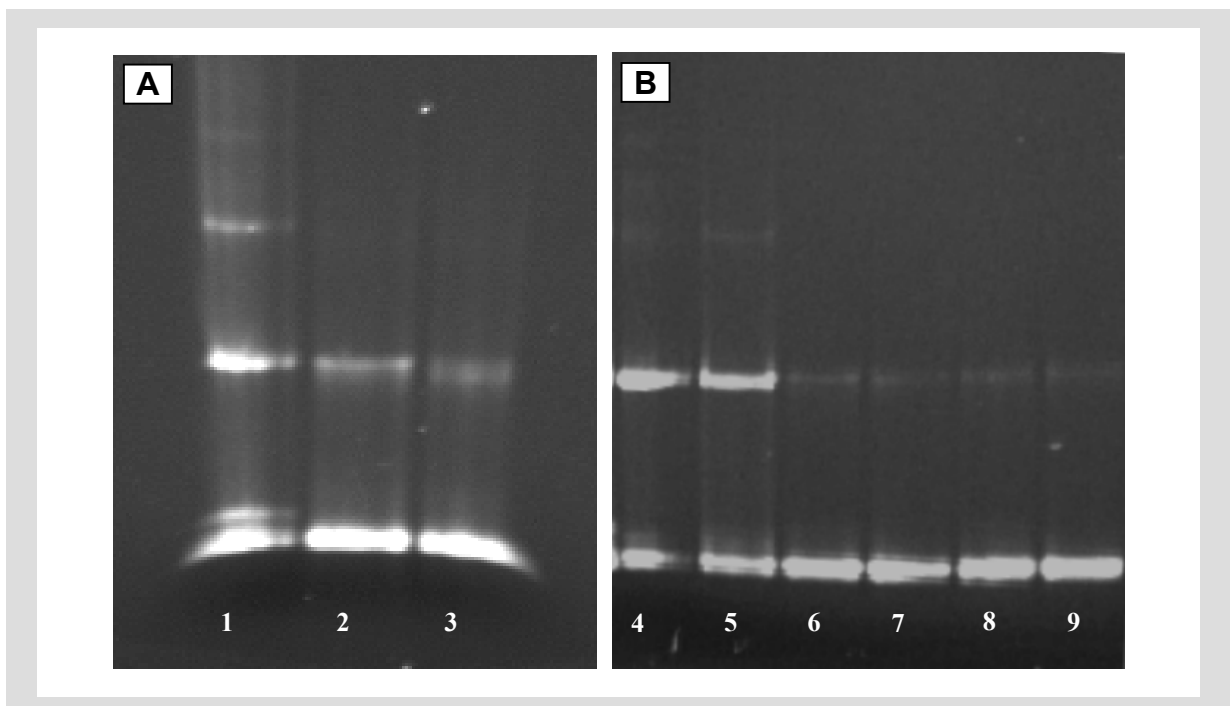


Abb. 118. A: Vergleich der Dimerisierung mit Hyb90.CYC an Mischungen von PCR-Produkten mit sticky-ends (A1, bzw. A2) und ohne sticky-ends (A1-blunt): Spur 1: A1 + A2, Spur 2: A1 + A1-blunt, Spur 3: A2 + A1-blunt, **B:** Vergleich von Dimermischungen mit verschiedenen sticky-ends (Hybridisierung bei 50 °C): Spur 4: A1 + A2 (gleiche sticky-end-Sequenzen wie auf Spur 1 [M3c, bzw. M3]), Spur 5: a1 + a2 (zwei andere komplementäre sticky-end-Sequenzen [M2c, bzw. M2]), Spur 6-9: Mischungen von PCR-Produkten mit nicht komplementären sticky-end-Sequenzen (A1 + a2, A1 + a1, A2 + a2, A2 + a1).

Die verschiedenen Experimente zeigen, dass die hochmolekularen Nebenprodukte nur dann auftreten, wenn die verwendeten PCR-Produkte komplementäre sticky-ends tragen und die Hybridisierungsmischung auf 90°C erhitzt wurde. Diese Ergebnisse stehen mit der folgenden

Erklärung in Einklang: Bei der Dimerisierung der PCR-Produkte mit uridinmodifizierten Primern wurden die sticky-ends mit Hilfe der gleichen Primersequenz eingeführt. Im Unterschied dazu werden in dem hier vorgestellten System die sticky-ends durch zwei verschiedene Primer eingeführt. Dadurch sind die überhängenden Enden einmal an das „linke“ und einmal an das „rechte“ Ende des PCR-Produkts gebunden. Da die Sequenz des Doppelstrangabschnitts in beiden PCR-Produkten identisch ist, kann bei erhöhten Temperaturen die in Abb. 119 dargestellte „Umlagerung“ erfolgen.

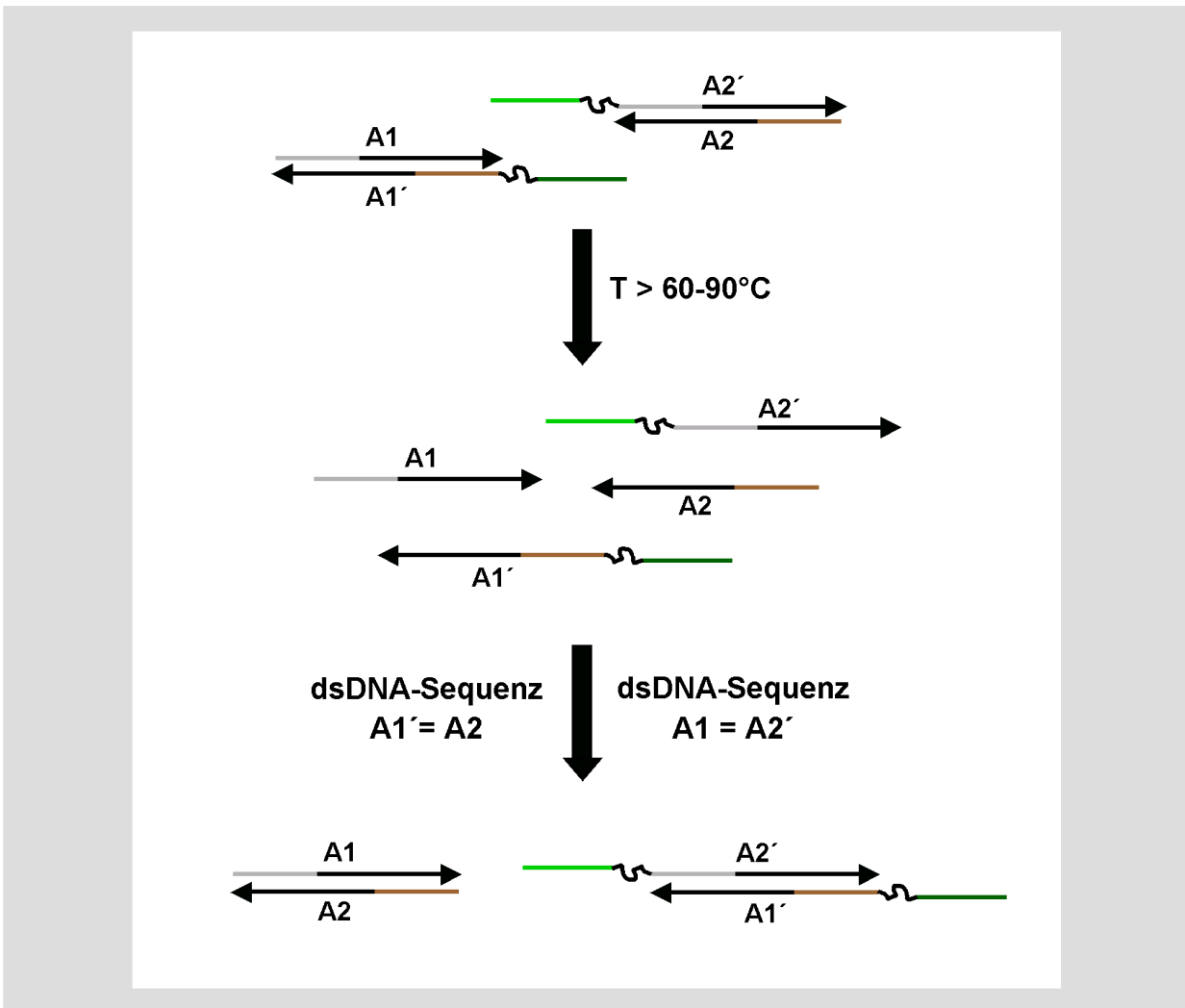


Abb. 119: Denaturierung und Rehybridisierung der verwendeten PCR-Produkte: Sobald die Doppelstrangsequenzen vollständig aufgeschmolzen sind, kann ein Austausch erfolgen. Die Renaturierung liefert dadurch nicht nur die Ausgangsverbindungen, sondern auch Doppelstrangfragmente, die entweder zwei oder gar keine sticky-ends tragen.

Das neu gebildeten Fragment, das beide sticky-end-Sequenzen trägt, bietet die Möglichkeit zur Bildung von multimeren Strukturen. Der Vergleich der gefundenen Nebenproduktbanden mit der Markerspur unterstützt diese Erklärung. Die Auswertung von Abb. 120 liefert für die Banden der Dimermischung Größen von 630, 1200, 1900 und 2600 bp (theoretisch: 600, 1200, 1800 und 2400 bp). Die Abweichungen zwischen Theorie und Experiment werden durch die schiefen Markerbanden bzw. durch den Einfluss der flexiblen PEG-Spacer verursacht.

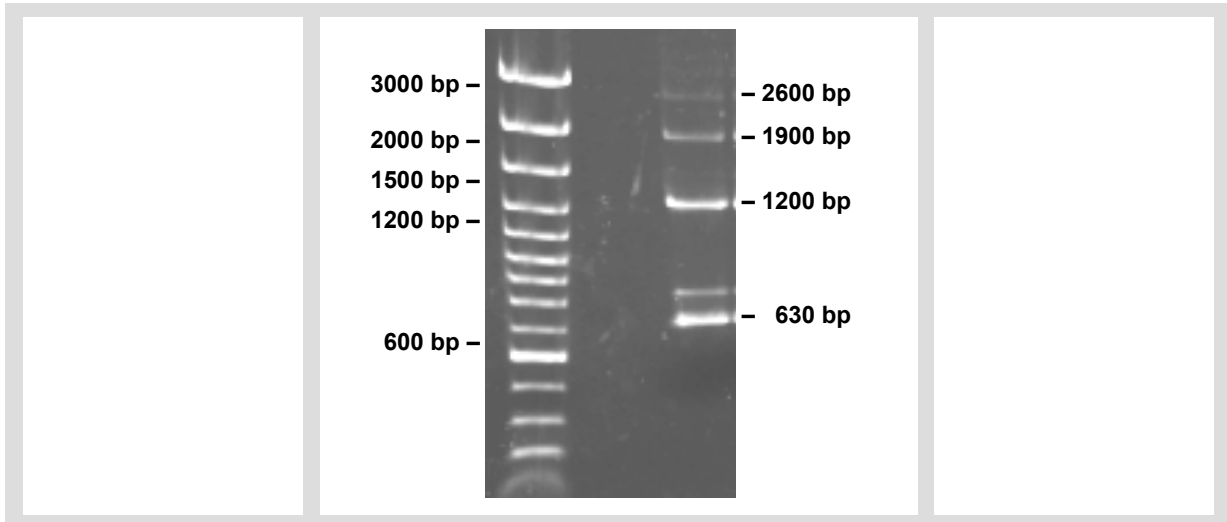


Abb. 120: Größenvergleich der gebildeten Nebenprodukte mit der Markespur. Links: GeneRuler, Rechts: Dimermischung nach Hybridisierung mit Hyb90.CYC, die gefundenen Banden entsprechen 630, 1200, 1900 bzw. 2600 bp. Neben dem Dimer treten also auch tri- und tetramere Strukturen auf, die durch die Anwesenheit des „bifunktionalen“ PCR-Produktes erklärt werden können. Die Bande kurz oberhalb des PCR-Produktes ist entweder auf den entsprechenden Einzelstrang oder auf das neu gebildete Doppelstrangfragment zurückzuführen, das an beiden Seiten überhängende Enden trägt.

Die Bildung der multimeren Strukturen kann völlig ausgeschlossen werden, wenn die überhängenden Enden über die gleiche Primersequenz eingeführt werden. In diesem Fall führt die oben beschriebene „Umlagerung“ zu keiner Strukturänderung in den PCR-Produkten. Eine andere Möglichkeit ist die Hybridisierung bei tieferen Temperaturen. So zeigen z.B. die nicht denaturierten Proben aus Abb. 117 B bereits nach 20 min bei RT (20-25 °C) einen Dimeranteil von gut 50 %. Ein anderer Ansatz zeigt nach der gleichen Zeit sogar knapp 70 % Dimer (Abb. 121). Viel erstaunlicher ist aber, dass auch hier geringe Anteile der multimeren Strukturen erkennbar sind.

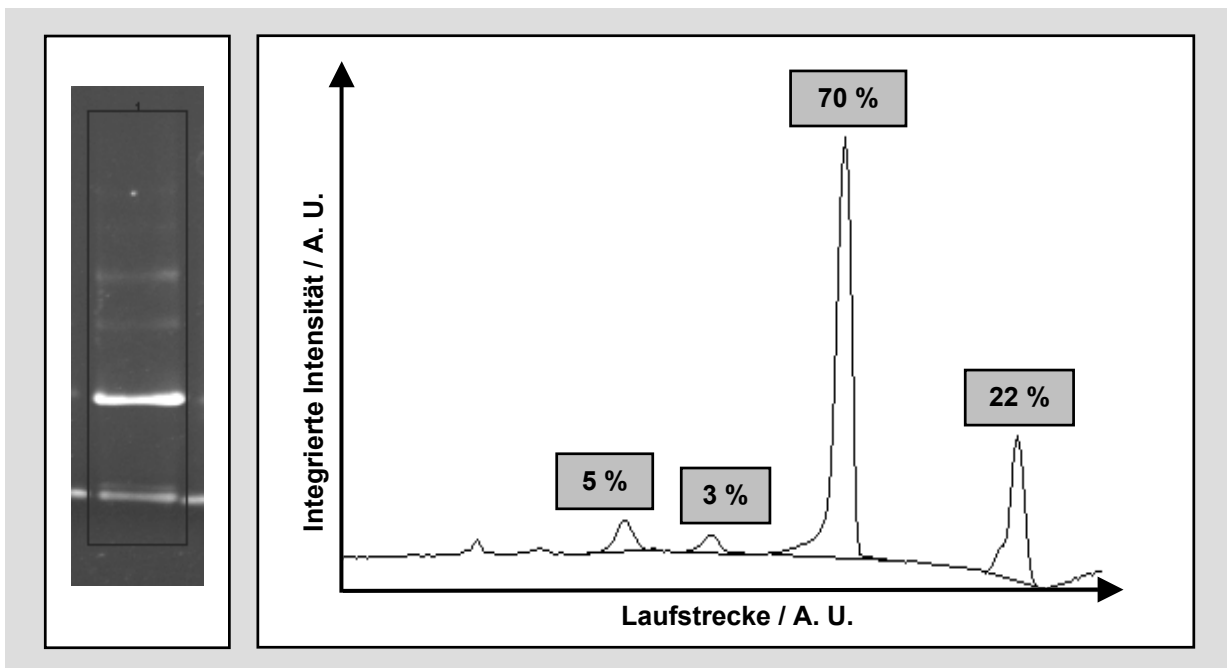


Abb. 121: Bildung von Dimeren und multimeren Strukturen bei RT. Links: Banden in der Gelelektrophorese, Rechts: Plot der integrierten Intensitäten.

Dieser Effekt wurde auch bei anderen Proben beobachtet, die über einen längeren Zeitraum bei RT gehalten wurden bzw. bei Hybridisierungsversuchen mit relativ niedrigen Temperaturen von maximal 44°C (Abb. 122). Die Anteile der hochmolekularen Banden liegen zwar nur im Bereich von wenigen Prozent, in Zusammenhang mit der oben genannten Erklärung zur Bildung der multimeren Strukturen bedeuten diese Ergebnisse jedoch, dass bereits bei RT ein gewisser Austausch zwischen den Doppelsträngen des PCR-Produktes erfolgt, obwohl der Schmelzpunkt des Doppelstrangs bei knapp 90°C liegt. Wenn diese Interpretation richtig ist, kann der Austausch eine entscheidende Rolle für die Stabilität von supramolekularen Strukturen spielen. Bei einer Verknüpfung von 10 Fragmenten über verschiedene DNA-Sequenzen und der Annahme, dass nur 1 % der Verknüpfungsstellen bei RT gespalten wird, wären im Mittel bereits 10 % der supramolekularen Strukturen fehlerhaft. Die Bildung von multimeren Strukturen bei niedrigen Temperaturen wäre verständlich, wenn die PCR-Produkte nach der Synthese teilweise in denaturierter Form vorliegen. In diesem Fall würde man jedoch erwarten, dass eine entsprechende Bande in der Gelelektrophorese detektiert wird. Die Banden kurz oberhalb des PCR-Produkts werden aber immer erst nach der Denaturierung bzw. nach einer Hybridisierung beobachtet. Eine Quantifizierung der Austauschreaktion zwischen Doppelsträngen wäre durch die Zugabe eines radioaktiv markierten Einzelstrangs möglich.

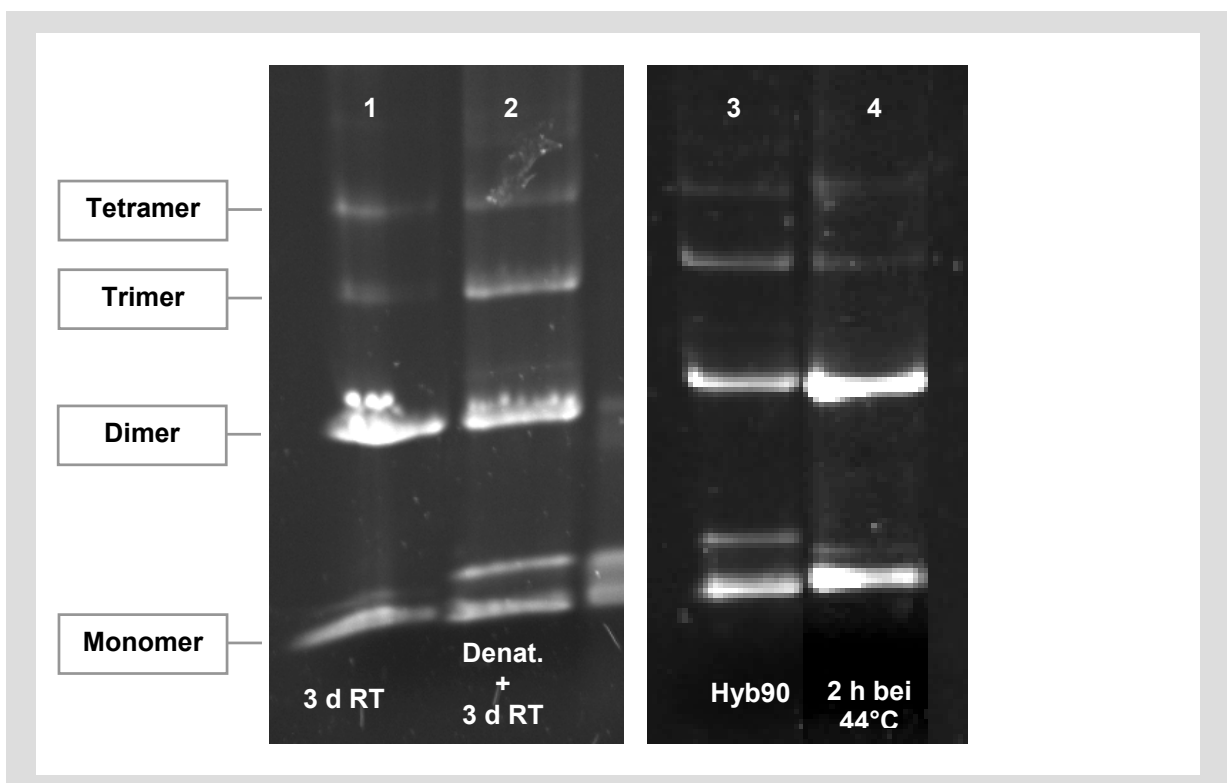


Abb. 122: Bildung der hochmolekularen Strukturen bei RT bzw. 44°C: Spur 1: Dimermischung nach 3 d bei RT, Spur 2: denaturierte Dimermischung nach 3 d RT, Spur 3: Dimermischung nach Hyb90.CYC, Spur 4: Dimermischung nach 2 h Hybridisierung bei 44 °C.

Sekundärstrukturen der verwendeten PCR-Produkte spielen offenbar keine Rolle bei der Bildung der hochmolekularen Nebenprodukte. Es wäre aber vorstellbar, dass die Unterschiede zwischen der quantitativen Hybridisierung von Oligonukleotiden und der Dimerisierung von PCR-Produkten mit Sekundärstrukturen im Zusammenhang steht, in denen das sticky-end durch eine intramolekulare Wechselwirkung blockiert ist. Die Bildung derartiger Sekundärstrukturen könnte man sich folgendermaßen erklären: In der PCR wird die DNA in jedem Zyklus denaturiert. Im letzten Elongationsschritt wird die Lösung für 5 min auf 72 °C erwärmt und anschließend schnell auf 4 °C abgekühlt. Durch die relativ kurze „Annealingzeit“ bei 72 °C und das schnelle Abkühlen, ist es nicht klar, ob die erzeugten Fragmente nach der PCR immer als „ordentlicher“ Doppelstrang auftreten oder evtl. in einer alternativen Struktur gefangen sind. Aus diesem Grund wurde das folgende Experiment durchgeführt: Die beiden PCR-Produkte wurden in separaten Ansätzen zunächst 10 min bei 90°C denaturiert, um alle vorliegenden Strukturen aufzubrechen. Danach wurden die Lösungen im Verlauf von 13 h auf 50 °C abgekühlt, um eine vollständige Renaturierung zu erreichen. Nach kurzem Abkühlen bei 5-10 °C wurden äquimolare Mengen der beiden Ansätze miteinander gemischt und für 2 h bei 20, 30, bzw. 40 °C inkubiert. Als Vergleichsproben wurden dieselben PCR-Produkte ohne vorheriges Annealing unter den gleichen Bedingungen hybridisiert. In der Gelelektrophorese (Abb. 123) ist deutlich zu erkennen, dass die thermische Vorgeschichte der PCR-Produkte einen Einfluss auf die Dimerisierung hat.

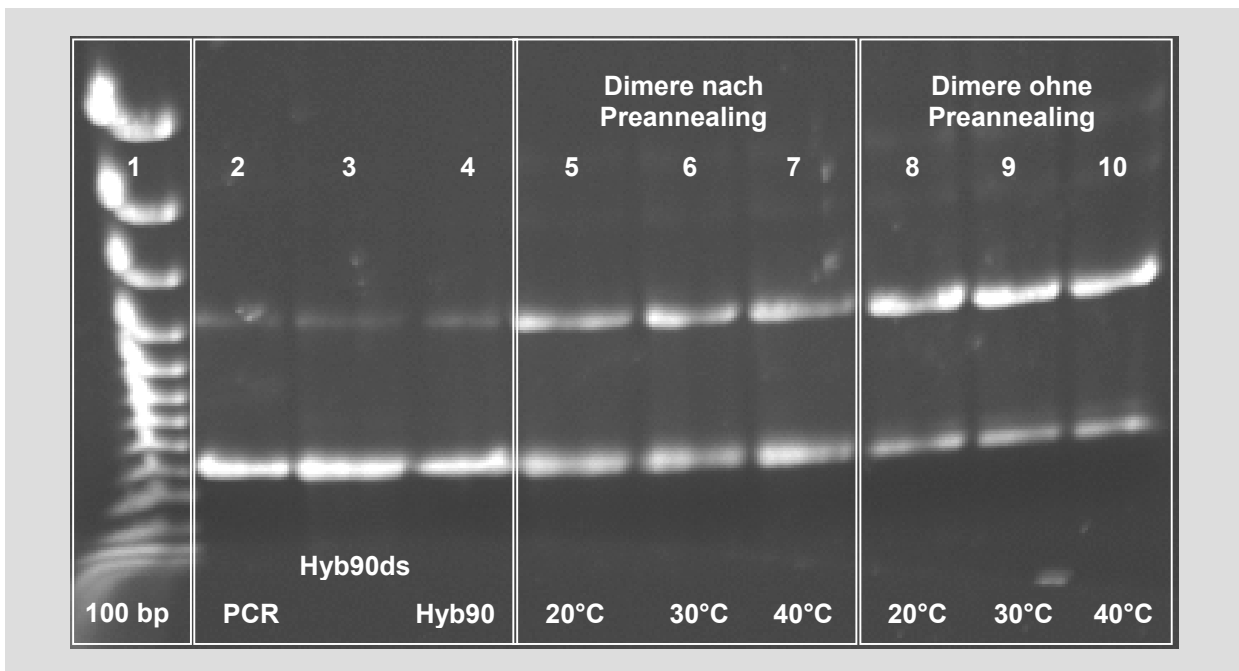


Abb. 123: Dimerisierung nach Preannealing der einzelnen PCR-Produkte. Spur 1: 100 bp-Marker, Spur 2: A1 direkt nach der PCR, Spur 3: A1 nach Preannealing (Hyb90ds.CYC), Spur 4: A1 nach Hyb90.CYC, Spuren 5-7: Dimere nach Preannealing der einzelnen PCR-Produkte: Hybridisierung für 2 h bei 20 °C (38 % Dimer), 2 h bei 30°C (42 % Dimer) bzw. 2 h bei 40°C (39 % Dimer), Spuren 8-10: Dimere ohne Preannealing der einzelnen PCR-Produkte: Hybridisierung für 2h bei 20°C (66 % Dimer), 2 h bei 30°C (67 % Dimer) bzw. 2 h bei 40°C (69 % Dimer).

Nach dem Preannealing der Einzelkomponenten wird, anders als erwartet, kein größerer, sondern ein geringerer Anteil der dimeren Zielstruktur gebildet. Obwohl die Vorbehandlung der Einzelkomponenten einen Einfluss auf die anschließende Hybridisierung ausübt, zeigen die reinen PCR-Produkte unabhängig von der thermischen Vorgeschichte identische Bandenmuster in der Gelelektrophorese. Dieses Ergebnis kann eigentlich nur erklärt werden, wenn ein gewisser Anteil der sticky-ends während des Preannealings abgebaut wird. Hinweise auf einen derartige Abbau der sticky-ends wurden bereits im Rahmen der Nachweisversuche der überhängenden Enden an den Modellverbindungen B1 bis B4 und C1 bis C4 beobachtet (vgl. Abschnitt 3.5.1) und treten ebenso bei der Untersuchung von PCR-Produkten mit längeren überhängenden Enden auf (vgl. Abschnitt 3.6.3.2).

3.5.4 Zusammenfassung

Es wurde eine neue Methode entwickelt, überstehende Enden beliebiger Sequenz direkt in der PCR durch PEG-modifizierte Primer einzuführen. Der große Vorteil dieser Methode liegt in der enormen Zeitersparnis und dem deutlich geringeren Syntheseaufwand, im Vergleich zu der in Abschnitt 2.3.1 beschriebenen Vorgehensweise. Im Unterschied zur Erzeugung von sticky-ends mit Hilfe der USER-Reaktion ist weder eine enzymatische Modifikation des PCR-Produkts noch eine denaturierende Abtrennung von komplementären Sequenzen erforderlich. Durch den stark vereinfachten Syntheseweg, und die hohe Flexibilität der entwickelten Methode ist es deutlich einfacher, verschieden molekulare Parameter, wie z.B. die Länge des dsDNA-Fragments oder die Länge bzw. die Sequenz der überstehenden Enden systematisch zu variieren und die erwünschten Produkte im größeren Maßstab herzustellen.

Die Bildung der überhängenden Enden wurde an kleinen PCR-Produkten mit einer Länge von 30 bzw. 80 bp durch eine Kombination von denaturierender und nativer PAGE nachgewiesen. Die Ergebnisse aus verschiedenen Restriktionsanalysen und die Sequenzierung des PCR-Produktes sprechen ebenfalls für den Erfolg des beschriebenen Synthesewegs. Anders als erwartet entspricht die elektrophoretische Mobilität des einzigen detektierbaren Nebenprodukts der dsDNA-Sequenz ohne überhängende Enden. Der Anteil dieser Spezies liegt bei ca. 10 %. Die Bildung dieses Nebenproduktes ist wahrscheinlich auf eine unerwünschte Aktivität der Polymerase zurückzuführen, die bei der Aufarbeitung mittels Ultrafiltration nicht vollständig abgetrennt wird. Dieser Zusammenhang wird in Abschnitt 3.6.3.2 noch einmal näher erläutert.

Bei den Dimerisierungsversuchen von PCR-Produkten mit komplementären überhängenden Enden wurden multimere Strukturen gefunden. Die Bildung dieser Strukturen kann durch einen Austausch der einzelnen Stränge der beteiligten PCR-Produkte erklärt werden. Die Bildung dieser Multimere lässt sich durch eine geeignete Struktur der PCR-Produkte ausschließen bzw. durch die Vermeidung von denaturierenden Bedingungen umgehen. Bei Hybridisierungsexperimenten mit ausreichend niedriger Temperatur werden 50-70 % der dimeren Zielstruktur gebildet. Der Maximalwert liegt im gleichen Bereich wie bei den Dimerisierungsversuchen mit PCR-Produkten aus der USER-Reaktion. Hier wurden selbst nach der Isolierung eines gebildeten Dimers, durch Denaturierung und anschließende Rehybridisierung lediglich 70 % des Dimers gebildet. Bei der unvollständigen Dimerisierung handelt es sich also offenbar um eine inhärente Eigenschaft von langen überstehenden Enden, die nicht auf ein spezielles System beschränkt ist.

Da sich die Verknüpfung von PCR-Produkten und die Hybridisierung von Oligonukleotiden nur durch die Anwesenheit der Doppelstrangfragmente unterscheiden, wäre eine intramolekulare Wechselwirkung der überstehenden Enden mit der Doppelhelix eine naheliegende Erklärungsmöglichkeit. In diesem Fall würden zwei Gleichgewichtsprozesse miteinander in Konkurrenz stehen, wodurch eine systematische Erniedrigung der Verknüpfungseffektivität zu erwarten wäre. Ein Vergleich mit dem Stand der Literatur ist in diesem Zusammenhang schwierig. Typische Problemstellungen, bei denen eine Verknüpfung von Doppelstrangfragmenten erreicht werden soll, werden üblicherweise durch die Ligation von kurzen überstehenden Enden gelöst. Lange überstehende Enden werden lediglich bei speziellen Klonierungsverfahren genutzt. Bei diesen Experimenten wird das Integrat im Überschuss eingesetzt und die Ausbeute des Synthesewegs anhand der Zahl an rekombinanten Klonen bestimmt. Eine Aussage über die Effektivität einer stöchiometrischen Verknüpfung von dsDNA-Fragmenten ist somit nicht möglich.

Ein Experiment, das Aufschlüsse über den Einfluss der sticky-ends auf die Effektivität der Dimerisierung von PCR-Produkten erlauben würde, wäre eine gezielte Variation von Länge und Sequenz der überhängenden Enden. Wenn die Ergebnisse der Hybridisierung durch eine intramolekulare Wechselwirkung der sticky-ends mit den Doppelstrangabschnitten beeinflusst werden, sollte eine Abhängigkeit von der Länge und dem GC-Gehalt der verwendeten sticky-end-Sequenzen auftreten.

3.5.5 Ausblick

Die ersten Hybridisierungsversuche mit PEG-modifizierten PCR-Produkten (Abb. 114) zeigten keine multimeren Strukturen und eine sehr schlechte Dimerisierungseffektivität. Die Bande bei 1200 bp hat in der Dimermischung in etwa die gleiche Intensität wie auch schon in den einzelnen Komponenten. Bei den weiteren Experimenten mit PCR-Produkten, die mit Hilfe derselben Primer in einem neuen Ansatz erzeugt wurden, konnten Dimeranteile von 50-70 % erreicht werden. Der einzige Unterschied zwischen diesen Proben liegt in der Art der verwendeten Polymerase. Die Proben aus Abb. 114 wurden durch die Amplifikation mit Hilfe der Phusion High Fidelity Polymerase erzeugt. Dieses Enzym besteht aus zwei Domänen. Die eigentliche Polymerase (in Abb. 124 in Grün dargestellt) ist über einen Linker mit einer Domäne verknüpft, die an den gebildeten Doppelstrang bindet (Blaue Domäne in Abb. 124).



Abb. 124: Schematischer Aufbau der Phusion High Fidelity Polymerase [168].

Wenn die Polymerase während der Synthese des Tochterstrangs kurzzeitig den Kontakt zum Templatstrang verliert, wird sie von der doppelstrangbindenden Domäne festgehalten. Durch diesen Mechanismus ist es in vielen Fällen möglich einen vorzeitigen Abbruch der Polymerisation zu vermeiden. Die Phusion High Fidelity Polymerase ist daher besonders gut für die Amplifikation von sehr langen Templatsequenzen geeignet. Durch die erhöhte Affinität zu dsDNA ist es evtl. möglich, dass die Polymerase vom PEG-Spacer gestoppt wird, aber durch die zweite Domäne an den Doppelstrang gebunden bleibt. Wenn die Polymerase ausreichend lange in dieser Situation verweilt, kann ein Kontakt zur ersten Base des sticky-ends gebildet werden, der eine Fortführung der Polymerisation des Tochterstrangs über den PEG-Spacer hinaus ermöglicht. Da in diesem Fall keine sticky-ends am PCR-Produkt gebildet werden, könnte dieser Mechanismus sowohl die deutlich schlechtere Effektivität der Dimerisierung als auch die Abwesenheit von multimeren Strukturen, bei den Proben aus Abb. 114 erklären.

Von einem molekular genetischen Standpunkt aus betrachtet, würde dieses Verhalten eine interessante Möglichkeit bieten: In verschiedenen PCR-Ansätzen mit PEG-modifizierten Primern unter Verwendung der Taq-Polymerase können verschieden Fragmente mit überhängenden Enden erzeugt werden. Wenn die Fragmente komplementäre sticky-ends tragen, lassen sich die verschiedenen Abschnitte durch Hybridisierung aneinander lagern. Durch eine weitere PCR mit der Phusion High Fidelity Polymerase könnte die gesamte Sequenz der aneinandergereihten Fragmente amplifiziert werden. Dieses System hätte Anwendungsmöglichkeiten im Bereich der Mutagenese bzw. bei der Erzeugung von genetischen Chimären.

Unabhängig von dem Verhalten der Phusion High Fidelity Polymerase, wäre es auch interessant, die Reaktion von biologischen Systemen auf die Anwesenheit des PEG-Spacers zu untersuchen. Es wäre beispielsweise zu erwarten, dass die Replikation eines PEG-modifizierten Klons in einer Zelle zur Vervielfältigung eines linearisierten Plasmids führt. Damit würde die Möglichkeit bestehen, ein zirkulares Molekül für die Transformation einzusetzen, das erst in der Zelle in seine lineare Form überführt wird. Der Vorteil bei dieser Herangehensweise liegt in der Tatsache, dass zirkuläre DNA sehr viel effektiver in bakterielle Zellen aufgenommen wird, während lineare DNA deutlich leichter in die genomische DNA der Wirtszelle integriert werden kann. Eine andere Idee wäre, den PEG-Spacer an einer ganz bestimmten Stelle in ein Gen zu integrieren. In diesem Fall könnte die Spacer-Einheit als künstlicher Transskriptionsstop dienen. Auf diese Weise wäre es möglich, sowohl in die RNA-Synthese als auch in die Proteinsynthese einzugreifen.

3.6 Verzweigte DNA-Strukturen

In den letzten Abschnitten wurden die Synthesen verschiedener Moleküle vorgestellt, die über die Sequenzerkennung von komplementären Oligonukleotidsequenzen zur Bildung von supramolekularen Strukturen geeignet sind. Durch die chemische Verknüpfung von zwei unterschiedlichen Oligonukleotiden mit den beiden Enden eines synthetischen Polymers können flexible Struktureinheiten erzeugt werden. In diesem Fall wird nur die spezifische Assoziation der beteiligten Sequenzen genutzt. Durch die Synthese von Doppelstrangfragmenten unterschiedlicher Länge, die an beiden Seiten lange überhängende Enden tragen, ist auch die Einführung von steifen bzw. semiflexiblen Blöcken möglich. Neben der Primärstruktur der DNA, die zur spezifischen Erkennung führt, wird hier zusätzlich die Sekundärstruktur der DNA ausgenutzt, die den kettensteifen Charakter der Doppelhelix bedingt. Für den Aufbau von komplexen supramolekularen Strukturen ist es erforderlich neben der chemischen Natur, der Länge und der Flexibilität der einzelnen Blöcke auch die geometrische Anordnung ihrer Verknüpfung zu steuern. Prinzipiell wäre die Einführung einer Verzweigungsstelle sowohl in den synthetischen Blöcken als auch in den DNA-Blöcken denkbar. Die gezielte Verknüpfung von beispielsweise drei oder vier verschiedenen Enden einer verzweigten Polymerstruktur mit unterschiedlichen Oligonukleotiden würde aber eine sehr komplizierte Schutzgruppenchemie erforderlich machen. Die Einführung des Verzweigungspunktes in einen DNA Abschnitt ist hier deutlich praktikabler, da die Adressierbarkeit der einzelnen Arme durch die Wahl der Sequenzen sehr einfach gesteuert werden kann. Für die Herstellung verzweigter DNA Strukturen sind verschiedene Ansätze in der Literatur beschrieben. Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten zur Synthese von verzweigten Oligonukleotidsequenzen, die auf der Verwendung von modifizierten Basen mit einer zusätzlichen selektiv geschützten OH-Gruppe [169] oder 2',3'-Bis(phosphoramiditen) [170] beruhen. Ganz ähnliche Verzweigungspunkte können auch durch die Kopplung von endfunktionalisierten Oligonukleotiden mit multifunktionellen „Kernmolekülen“ realisiert werden. Beispiele sind die kovalente Verknüpfung von aminofunktionalisierten PNAs mit 1,3,5-Benzoltricarbonsäure [171] oder die Anlagerung von Biotin markierten PCR-Produkten an Streptavidin [172]. In diesen beiden Fällen können nur symmetrische Strukturen erzeugt werden, die in allen Armen die gleiche Sequenz tragen. Es gibt andere Proteine, die in der Lage sind Biotin-markierte DNA-Stränge sequenzspezifisch an einen Doppelstrang zu binden, wodurch eine Kreuzung mit drei Armen gebildet wird [173]. Andere Ansätze beruhen auf der Verwendung von teilkomplementären Sequenzen, bei denen die Basenpaarung zur Bildung der Verzweigungsstelle führt. Die erste stabile Kreuzstruktur dieser Art wurde 1983 von

Kallenbach, Ma und Seeman entwickelt [28]. Mittlerweile wurden mit dieser Methode Verzweigungspunkte mit 3, 4, 5, 6, 8 und 12 Armen erzeugt [174-176]. Da dieses Verfahren auf der Verwendung von synthetischen Oligonukleotiden beruht, sind die realisierbaren Armlängen beschränkt. Es gibt einige Arbeiten, in denen versucht wurde diese Beschränkung zu überwinden. Eine besonders große Struktur, mit einer Armlänge von 48500 bp, konnte durch die Ligation von sticky-ends der λ -DNA eines Bakteriophagen erzeugt werden. Die Ausbeute dieses Synthesewegs liegt allerdings im Bereich von wenigen Promille [177]. Andere Ansätze beruhen auf einer relativ aufwendigen Erzeugung von langen Einzelstrangsequenzen [178] oder auf der Ligation von Restriktionsfragmenten an die Arme einer oligomeren Kreuzstruktur

[179, 180]. Bei der Ligation von Restriktionsfragmenten treten die gleichen Probleme auf, wie sie in Abschnitt 3.3.2, bei der Ligation von Oligonukleotiden an das EcoRI-HindIII-Fragment diskutiert wurden. Die palindromischen Sequenzen der kurzen sticky-ends führen zur Dimerisierung der oligomeren Kreuzstruktur bzw. zu Dimeren des Restriktionsfragments. Durch die Verwendung von PCR-Produkten mit langen überhängenden Enden, wie sie in den letzten beiden Abschnitten beschrieben wurden, können diese Probleme umgangen werden. Die Sequenzen und die Längen der überstehenden Enden können frei gewählt werden, so dass keine palindromischen Sequenzen auftreten und die Ligation nicht mehr erforderlich ist. Außerdem kann jeder Arm problemlos mit einem anderen sticky-end versehen werden. Da die Länge der PCR-Produkte ebenfalls in einem breiten Bereich sehr exakt eingestellt werden kann, ist auf diesem Weg die gezielte Erzeugung verzweigter Strukturen mit unterschiedlichen Armlängen möglich.

3.6.1 Oligomere Kreuzstrukturen mit überstehenden Enden

Als Ausgangspunkt dient die in der Gruppe von N. C. Seeman entwickelte Kreuzstruktur J1 [28, 181]. Diese besteht aus vier hexadecameren Oligonukleotiden, die durch Watson-Crick Paarung eine verzweigte Struktur mit vier gleich langen Armen bilden. Jeder dieser vier Arme besteht aus 8 bp (Abb. 125). Die Sequenzen der beteiligten Oligonukleotide wurden mit Hilfe eines computergestützten Algorithmus so entworfen, dass alle möglichen tetrameren Untereinheiten nur ein Mal in der gesamten Struktur auftreten [182]. Des Weiteren wurden selbstkomplementäre Sequenzen vermieden. In direkter Nähe zum Verzweigungspunkt darf außerdem keine Symmetrie auftreten, die eine „branch point migration“ zulässt [84]. In Bezug auf Struktur und Stabilität ist dieses System bereits intensiv untersucht worden [90, 92, 97, 179, 183].

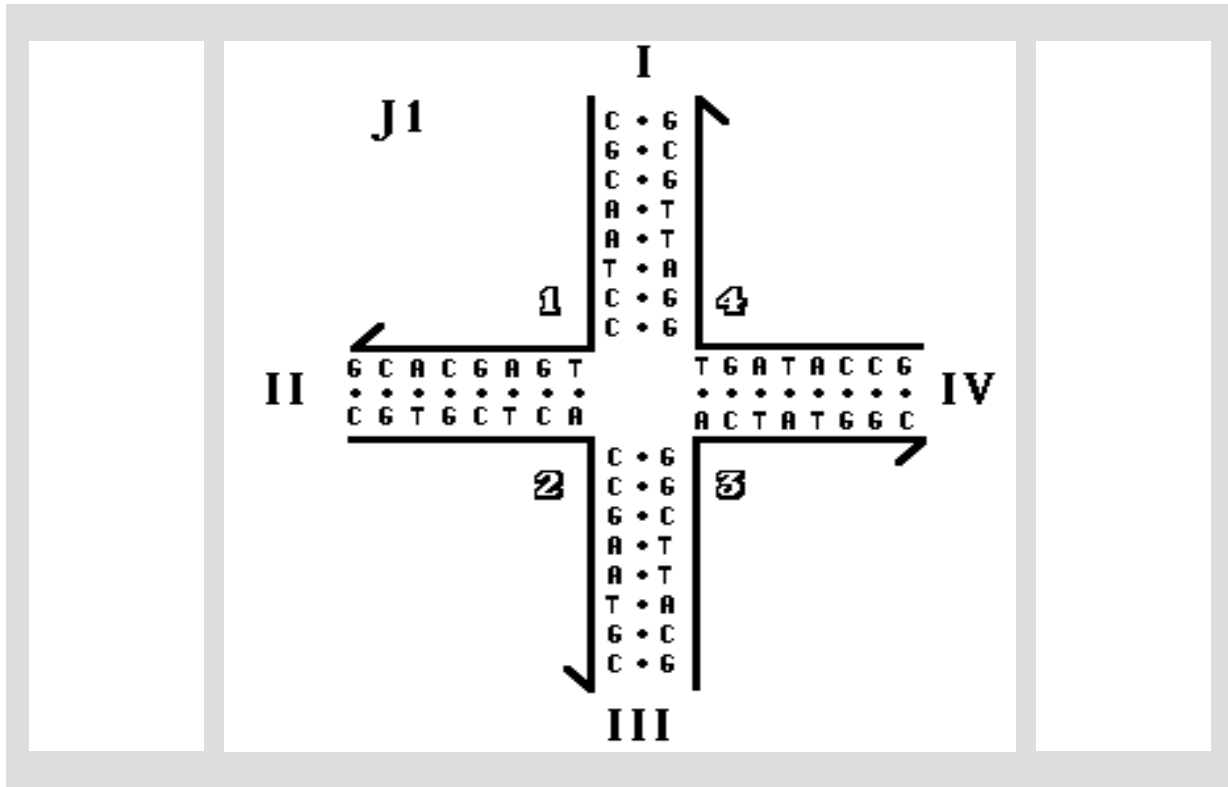


Abb. 125: Aufbau und Sequenzen der verzweigten Struktur J1. Die verschiedenen Stränge sind mit arabischen Zahlen gekennzeichnet, die Bezeichnung der verschiedenen Arme ist in römischen Zahlen dargestellt. Die 3'-Enden der beteiligten Oligos sind durch Pfeilspitzen markiert [184].

Durch eine Verlängerung der 3'-Enden dieser vier Oligonukleotide kann die Kreuzstruktur so modifiziert werden, dass sie mit den überstehenden Enden eines PCR-Produktes aus der USER-Reaktion kompatibel wird*. Da die Sequenzen im Bereich der Verzweigungsstelle unverändert beibehalten werden, sollte sich die Stabilität der Struktur dadurch nicht ändern. Neben den 23 Basen, die zu der eigentlichen sticky-end-Sequenz des PCR-Produktes komplementär sind, wurden zwei zusätzliche Thymidineinheiten eingefügt. Die eine befindet sich direkt am 3'-Ende der hexadecameren Oligos. An dieser Stelle erfolgt die Basenpaarung mit dem Adenosin, das durch die Taq Polymerase am 3'-Ende des PCR-Produktes angefügt wird. Die andere Thymidin Einheit wurde an das 5'-Ende der angehängten sticky-end-Sequenz gebunden. An dieser Stelle erfolgt die Basenpaarung mit dem Adenin, das durch die Polymerase als Komplement zur Uridinmodifizierung des Primers eingefügt wird. Durch die Verlängerung der Oligonukleotide aus Abb. 125 treten an zwei Stellen tetramere Sequenzen in der modifizierten Kreuzstruktur auf, die auch in den überhängenden Enden des PCR-Produktes zu finden sind. Aufgrund der sehr niedrigen Schmelzpunkte dieser tetrameren Sequenzen, sollte die Kreuzstruktur aber immer noch die bei weitem stabilste Konformation darstellen.

* Das Sequenzdesign und die experimentellen Untersuchungen der modifizierten Kreuzstrukturen aus Oligonukleotiden erfolgte in Zusammenarbeit mit Sabine Flügel.

Oligonukleotide für die Modifizierung von J1 mit überstehenden Enden:

K1S1: 5'-CGC AAT CCT GAG CAC **GTT TAC TGT GAC TTG TCC TAA GAC AT**-3'

K1S2: 5'-CGT **GCT CAC** CGA ATG **CTT TAC TGT GAC TTG TCC TAA GAC AT**-3'

K1S3: 5'-GCA TTC **GGA CTA** TGG **CTT TAC TGT GAC TTG TCC TAA GAC AT**-3'

K1S4: 5'-GCC ATA GTG GAT TGC **GTT TAC TGT GAC TTG TCC TAA GAC AT**-3'

Zielstruktur (K1): 8 bp je Arm + 25 Basen sticky-end:

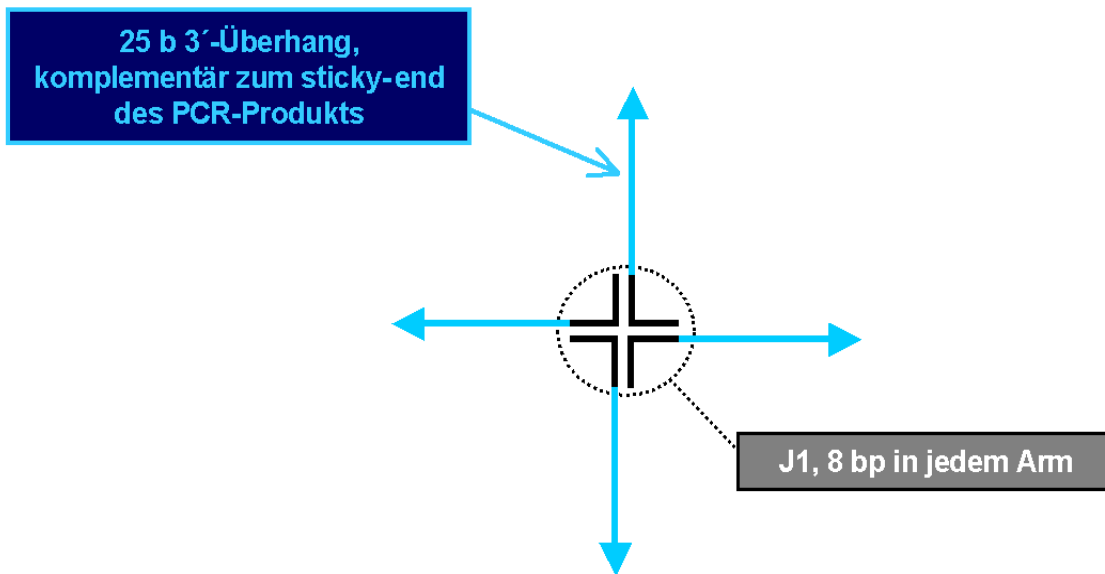


Abb. 126: Aufbau und Sequenzen der modifizierten Kreuzstruktur K1. Die original Sequenzen von J1 (J1S1-J1S4) sind in schwarz dargestellt, die angefügte sticky-end-Sequenz (M2) in Cyan. Die beiden tetrameren Sequenzen, die einen komplementären Partner in den sticky-ends finden können, sind im entsprechenden Oligo rot bzw. orange hervorgehoben. Das erste und letzte T der sticky-end-Sequenzen wurde eingefügt, um eine vollständige Hybridisierung mit den überhängenden Enden des PCR-Produktes zu gewährleisten.

Da die eingeführten sticky-ends, neben den beiden Tetrameren, keine komplementären Partner innerhalb der Kreuzstruktur haben, ist es kein Problem wenn dieser Sequenzabschnitt mehrfach auftritt. Die Einstellung der Stöchiometrie wird dadurch deutlich vereinfacht, da bei der Kombination der verzweigten Struktur mit dem PCR-Produkt nur eine weitere Komponente zugesetzt werden muss. Durch die Symmetrie der Struktur ist es außerdem möglich einen Überschuss des PCR-Produktes einzusetzen, ohne dadurch die Bildung der Zielstruktur zu stören. Dies ist ein deutlicher Vorteil im Vergleich zu linearen Strukturen. Wenn hier ein Verknüpfungstück im Überschuss eingesetzt wird, führt dieses zur Absättigung der beiden Komponenten, die eigentlich verknüpft werden sollten und unterbricht dadurch die Struktur. Neben der Hybridisierung der vollständigen modifizierten Kreuzung K1 wurden zusätzlich alle

möglichen Unterstrukturen parallel angesetzt. Die Mischungen wurden so hergestellt, dass die Gesamtkonzentration an DNA in allen Ansätzen identisch ist ($0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l} \approx 8 \mu\text{M}$). Die Hybridisierung erfolgte mit dem Temperaturprogramm Hyb90.CYC, in TAE/Mg-Puffer. Ganz anders als erwartet, zeigt die Gelelektrophorese in TBE-Puffer bei 25°C überhaupt keine Strukturbildung. Die Banden liegen alle auf Höhe der verwendeten Oligonukleotide. Die Verwendung von TAE-Puffer mit $12,5 \text{ mM Mg}(\text{OAc})_2$ führt zwar zu einer gewissen Stabilisierung der Kreuzstruktur, die Mischungen aus drei Oligos zeigen aber immer noch eine deutlich höhere Mobilität, als es für die entsprechenden Strukturen zu erwarten ist. Auch die Durchführung der Elektrophorese bei tieferen Temperaturen (Thermostat: $1,5^\circ\text{C}$; Pufferkammer: ca. $5-7^\circ\text{C}$) liefert nicht das erwünschte Ergebnis. Alle Ansätze mit mehr als einem Oligo zeigen einen stark verschmierten Bereich zwischen etwa 20 und 40 bp. Ein Großteil der Intensität bleibt aber immer noch auf Höhe der einzelnen Oligonukleotide zurück.

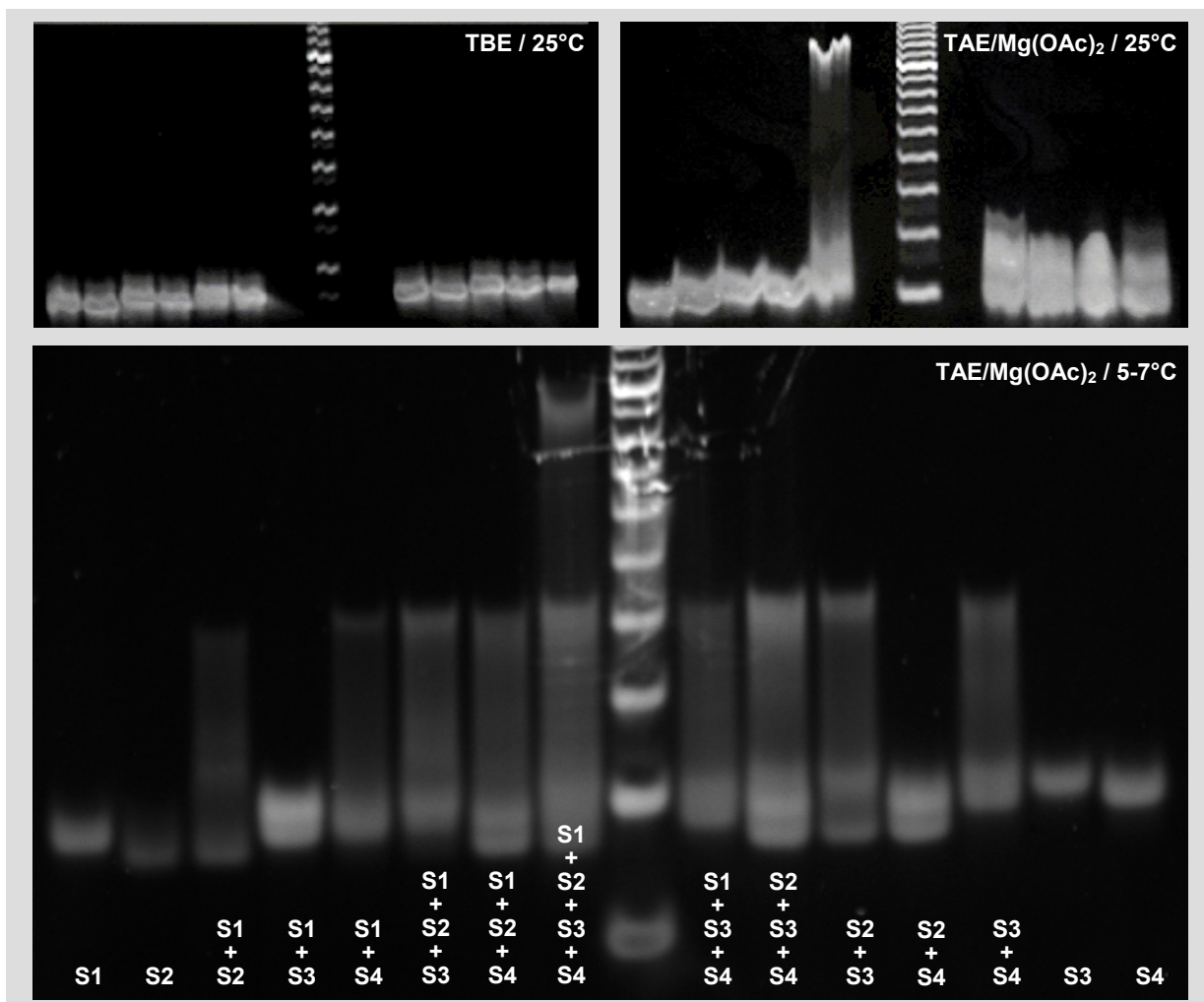


Abb. 127: Stabilität von K1, native PAGE (10 %). Oben links: Bei der Gelelektrophorese in TBE-Puffer ist keine Strukturbildung zu erkennen (Spuren 1-6: Dimere, Spur 7: 10 bp-Marker, Spur 8: Tetramer, Spuren 9-12: Monomere). Alle Banden liegen auf Höhe der verwendeten Oligos. Oben rechts: Die Gelelektrophorese in TAE-Puffer mit $12,5 \text{ mM Mg}(\text{OAc})_2$ führt zu einer gewissen Stabilisierung der Kreuzstruktur (Spuren 1-4: Monomere, Spur 5: Tetramer, Spur 6: 10 bp-Marker, Spuren 7-10: Trimere). Unten: Auch bei tieferen Temperaturen ($5-7^\circ\text{C}$) erfolgt die Strukturbildung nicht quantitativ. Alle Mischungen zeigen einen stark verschmierten Bereich zwischen etwa 20 und 40 bp.

3 Ergebnisse und Diskussion

Aufgrund der unerwarteten Probleme bei der Bildung der Kreuzstruktur mit überhängenden Enden wurde zunächst versucht die ursprüngliche Struktur mit der in Mainz gegebenen Infrastruktur zu reproduzieren (Abb. 128). Für einen Vergleich der Stabilitäten wurde die Ausgangsverbindung J1 zusätzlich bei verschiedenen Temperaturen mittels Gelelektrophorese untersucht.

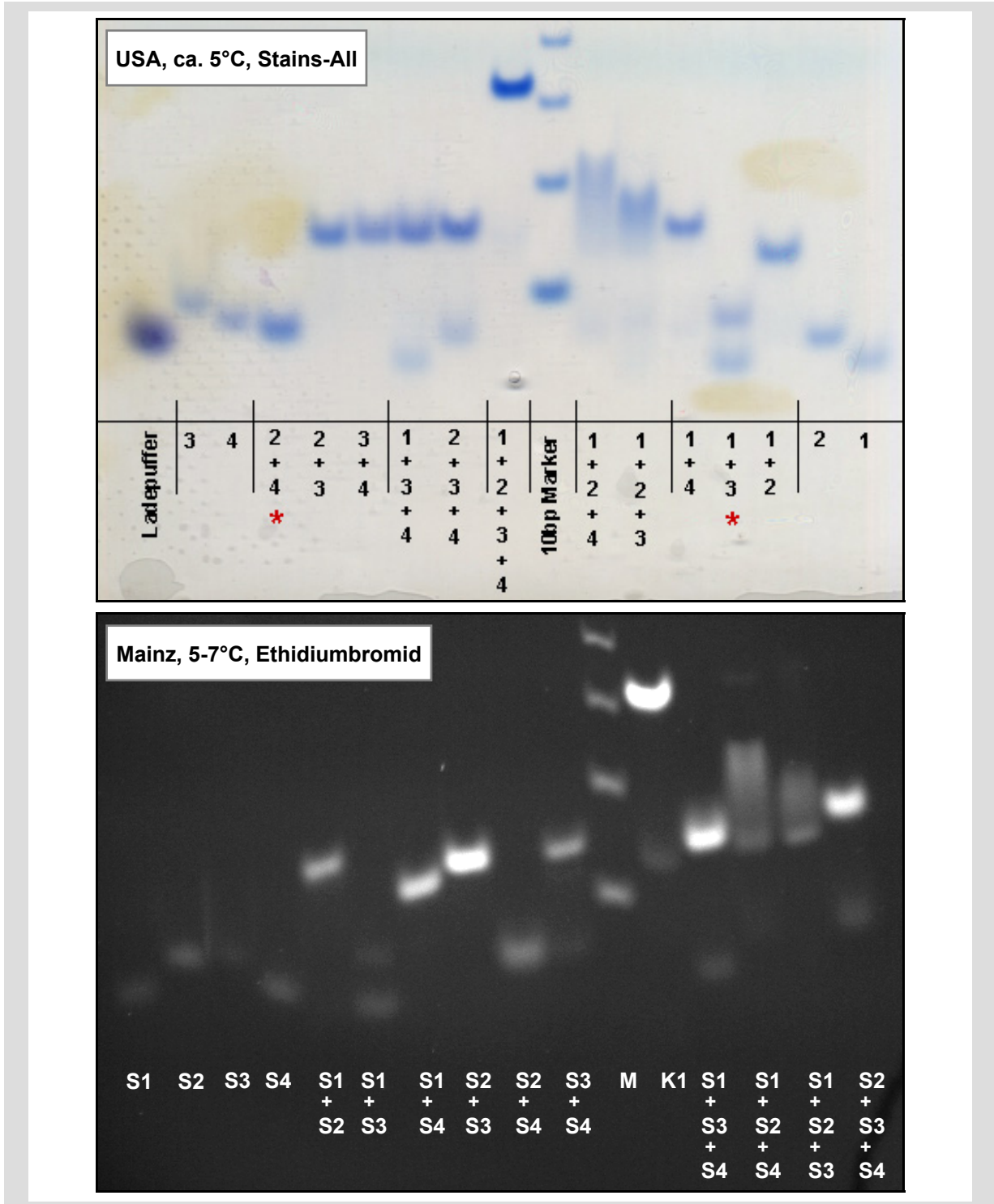


Abb. 128: Reproduzierbarkeit der Kreuzstruktur J1. Das obere Bild wurde während des Aufenthalts im Arbeitskreis von Prof. N. C. Seeman (New York University) erstellt. Das untere Bild zeigt die Reproduzierung im Arbeitskreis von Prof. M. Schmidt (Uni Mainz) mit Oligonukleotiden eines anderen Herstellers und unter Verwendung von anderen Apparaturen. Selbst in den Details zeigt das Bandenmuster eine hervorragende Reproduzierbarkeit. (Rote Sternchen: Nichtkomplementäre Primerpärchen.)

Selbst bei der Verwendung von Oligonukleotiden eines anderen Anbieters und der Verwendung von anderen Apparaturen zeigen die frisch angesetzten Proben sogar im Detail eine hervorragende Reproduzierbarkeit des Bandenmusters von J1 und den entsprechenden Unterstrukturen (Abb. 128). Bei 5-6 °C ist die Kreuzstruktur ohne überhängende Enden deutlich stabiler als die modifizierte Struktur, die sich nur durch die angehängten sticky-ends von J1 unterscheidet. Selbst bei einer Temperatur von 25 °C wird die verzweigte Struktur J1 annähernd quantitativ gebildet (Abb. 129). Die Mischungen von zwei bzw. drei komplementären Oligos laufen alle auf der Höhe von Oligonukleotid-Paaren. In diesen Strukturen sind jeweils zwei Oligonukleotide über lediglich 8 bp gebunden. Die Tatsache, dass die Dimere unter den gegebenen Bedingungen stabil sind, während die Trimere zum Teil denaturieren, zeigt, dass die Instabilität der Dreierkombinationen nicht allein durch die Zahl, der zur Verknüpfung genutzten Basenpaarungen, bestimmt wird. In Abb. 128 ist ebenfalls zu erkennen, dass die Kombination von drei Oligonukleotiden zu einer unvollständigen Strukturbildung führt. In zwei Fällen wird eine Mischung eines Dimers mit einem Monomer erhalten. Offensichtlich hat die Geometrie der Struktur einen entscheidenden Einfluss auf die Stabilität. Bei 35 °C zeigt die Gelelektrophorese immer noch einen deutlichen Teil der Kreuzstruktur mit unveränderter Mobilität, die Bande ist aber bereits stark verschmiert. Bei 45°C findet keine Strukturbildung mehr statt.

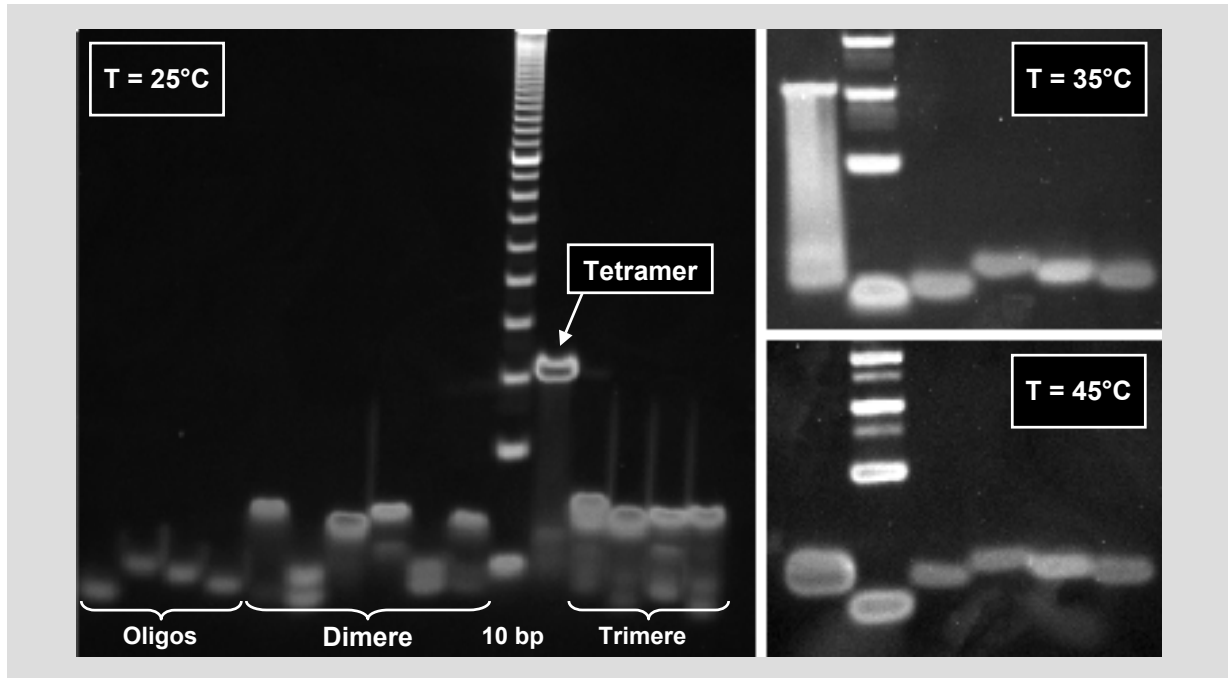


Abb. 129: Thermische Stabilität der verzweigten Struktur J1. Bei 25°C bleibt die Kreuzstruktur annähernd vollständig erhalten. Alle Mischungen von zwei bzw. drei Oligonukleotiden zeigen Banden auf der Höhe von Dimeren. Bei den Trimeren (rechts neben dem Kreuz) ist bereits eine deutliche Destabilisierung zu erkennen. Ein relativ großer Anteil der tetrameren Mischung liegt sogar noch bei 35°C in der verzweigten Struktur vor (oben rechts). Die Bande ist aber bereits stark verschmiert. Bei 45°C wird keine Strukturbildung mehr beobachtet (unten rechts). In den beiden rechten Abbildungen ist die Reihenfolge der aufgetragenen Proben identisch: Spur 1: Tetramer, Spur 2: 10 bp-Marker, Spuren 3-6: Monomere.

Die Stabilität der Kreuzstruktur wird offensichtlich durch das Anhängen der überstehenden Enden deutlich gestört. Da auf der Basis von J1 keine stabile Verbindung mit überhängenden Enden erhalten wurde, sollte der Doppelstranganteil der Struktur vergrößert werden. Hierzu wurden die Oligonukleotidsequenzen aus J1 an beiden Enden um jeweils 15 b verlängert, so dass die eigentliche Kreuzstruktur im Bereich der Verzweigung unverändert bleibt. Diese Struktur wurde einmal ohne (K2) und einmal mit überhängenden Enden (K3) hergestellt, um den Einfluss der sticky-ends zu überprüfen.

Oligonukleotide für die Bildung der Kreuzstruktur K2:

K2S1:

5'- **CGG TAG TAC AAC GCT** CGC AAT CCT GAG CAC **GTT CGA TAC TCC GTG G** - 3'

K2S2:

5'- **CCA CGG AGT ATC GAA** CGT GCT CAC CGA ATG **CGT GTC GTA ACG ATC A** - 3'

K2S3:

5'- **TGA TCG TTA CGA CAC** GCA TTC GGA CTA TGG **CAT ACC TGG TCA TCT C** - 3'

K2S4:

5'- **GAG ATG ACC AGG TAT** GCC ATA GTG GAT TGC **GAG CGT TGT ACT ACC G** - 3'

Zielstruktur (K2): 23 bp je Arm:

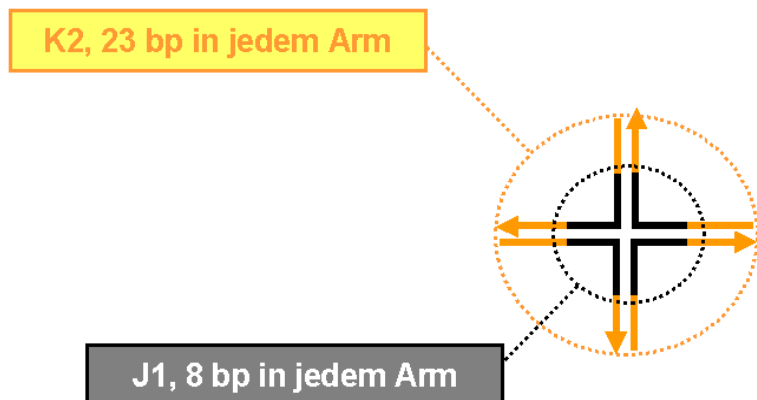


Abb. 130: Aufbau und Sequenzen der Kreuzstruktur K2. Für die Erzeugung von K2 wurden die ursprünglichen Sequenzen von J1 (schwarz) an beiden Enden verlängert (orange). Die Sequenzen in der Nähe der Verzweigung bleiben gleich, die Länge der einzelnen Arme wird auf 23 bp erhöht.

Oligonukleotide für die Bildung der Kreuzstruktur K3:

K3S1:

5'- **CGG TAG TAC AAC GCT CGC AAT CCT GAG CAC GTT CGA TAC TCC GTG GTT TAC**
TGT GAC TTG TCC TAA GAC AT - 3'

K3S2:

5'- **CCA CGG AGT ATC GAA CGT GCT CAC CGA ATG CGT GTC GTA ACG ATC ATT TAC**
TGT GAC TTG TCC TAA GAC AT - 3'

K3S3:

5'- **TGA TCG TTA CGA CAC GCA TTC GGA CTA TGG CAT ACC TGG TCA TCT CTT TAC**
TGT GAC TTG TCC TAA GAC AT - 3'

K3S4:

5'- **GAG ATG ACC AGG TAT GCC ATA GTG GAT TGC GAG CGT TGT ACT ACC GTT TAC**
TGT GAC TTG TCC TAA GAC AT - 3'

Zielstruktur (K3): 23 bp je Arm + 23 Basen sticky-end:end:

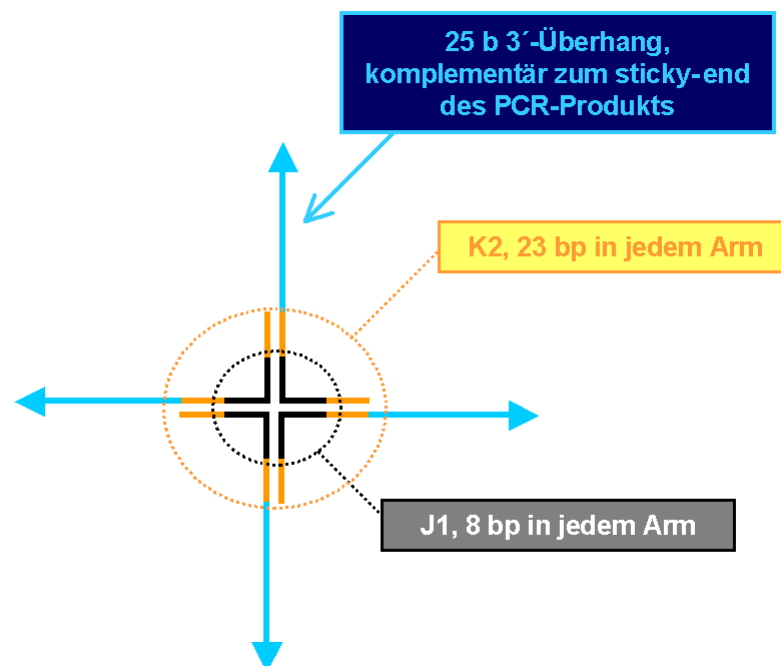


Abb. 131: Aufbau und Sequenzen der Kreuzstruktur K3. Die Verzweigungsstelle von K3 ist mit K2 identisch. Die vier Arme wurden am 3'-Ende der Oligos mit den gleichen überhängenden Enden wie in K1 verknüpft.

Die Hybridisierung wurde unter den gleichen Bedingungen wie bei K1 durchgeführt. Die native PAGE bei 20 °C zeigt eine quantitative Bildung der Kreuzstruktur ohne überhängende Enden (Abb. 132, links). Auch die entsprechenden Unterstrukturen aus zwei bzw. drei Oligos sind bei 20 °C stabil. Im Falle der Kreuzstruktur mit überhängenden Ende führen nur die Kombinationen von zwei bzw. vier Oligonukleotiden zu einer stabilen Doppelstrangbildung

(Abb. 132, rechts). Die geringen Anteile der Unterstrukturen mit drei bzw. zwei Oligos in der Tetramer-Mischung treten bei einem Wiederholungsexperiment nicht mehr auf. Durch die Erhöhung des Doppelstranganteils konnte also, wie erwartet, eine Stabilisierung der Zielstruktur erreicht werden. Die destabilisierende Wirkung der überstehenden Enden wird nur noch in den Mischungen von drei Oligonukleotiden beobachtet. Dieses Ergebnis ist gut zu verstehen, da die trimeren Strukturen auch in der ursprünglichen Kreuzstruktur J1 die geringsten thermischen Stabilitäten zeigen (vgl. Abb. 128). Der Einfluss von überstehenden Enden auf die Verknüpfung von Oligonukleotiden wurde zusätzlich an verschiedenen linearen Modellsystemen bei konstanter Doppelstranglänge und unterschiedlich langen sticky-ends untersucht. In diesen Systemen konnte der destabilisierende Effekt jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden.

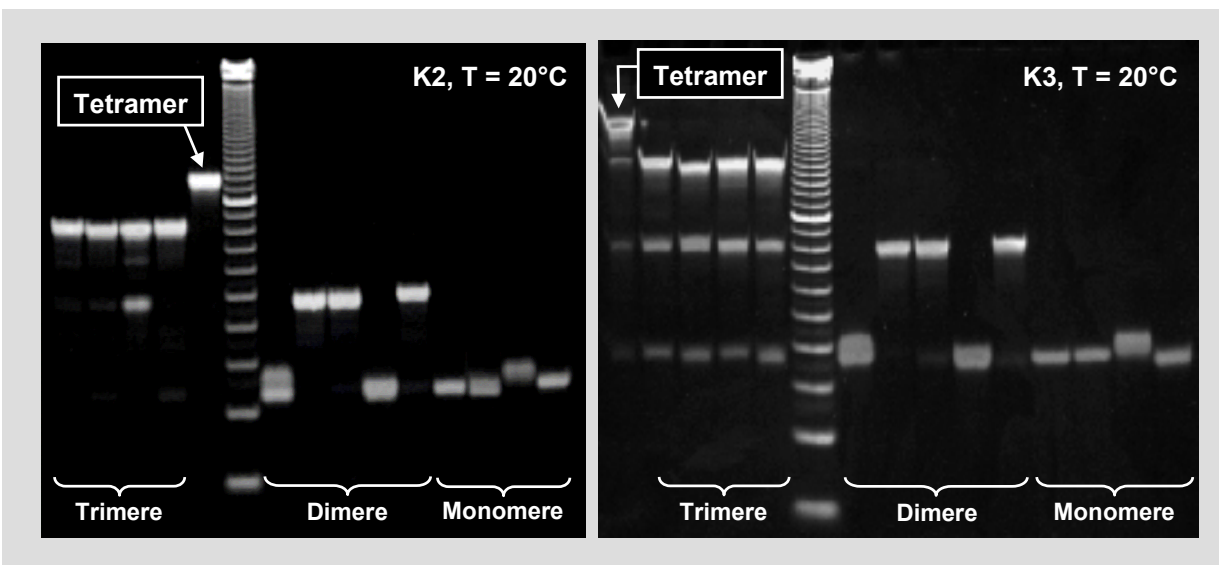


Abb. 132: Vergleich der thermischen Stabilität von K2 und K3. Wie erwartet führt die Verlängerung der einzelnen Arme von 8 auf 23 bp zu einer Erhöhung der Schmelztemperatur. Alle Unterstrukturen von K2 (links) sind bei 25°C stabil. Die destabilisierende Wirkung der sticky-ends scheint aber auch in diesem System eine Rolle zu spielen. Sowohl in der komplette Kreuzstruktur von K3 (rechts) als auch in den Mischungen von jeweils drei Oligos treten deutliche Anteile der Unterstrukturen auf.

3.6.2 Hybridisierung eines PCR-Produkts mit der oligomeren Kreuzstruktur

Mit den bisher gezeigten Experimenten wurde, genau genommen, noch nicht nachgewiesen, dass tatsächlich eine kreuzförmige DNA Struktur gebildet wird, auch wenn die Analogie mit der ursprünglichen Struktur J1 diese Vermutung natürlich sehr nahe legt. Die oligomere Kreuzstruktur K3 kann aber nun mit einem PCR-Produkt aus der USER-Reaktion kombiniert werden. Die Kombination von K3 mit 4 Äq. des PCR-Produkts sollte zu einer Kreuzstruktur mit vier gleich langen Armen führen, die jeweils eine Konturlänge von ca. 200 nm aufweisen. Dadurch ist es möglich die gebildete Verbindung mit Hilfe des AFM abzubilden und so die erfolgreiche Strukturbildung nachzuweisen.

Verwendete Primer:

L1: Primer ohne sticky-end-Sequenz:

5'-GTC TAT TTC GTT CAT CC-3'

PR2-TXR: Primersequenz R1 (braun), sticky-end-Sequenz M2 (hell-blau)

5'-TXR - TTA CTG TGA CTT GTC CTA AGA CAU AAG TTC TGC TAT GTG GC-3'

Abb. 133: Verwendete Primer für die Erzeugung eines PCR-Produkts mit einem überstehenden Ende, das zu den Überhängen der Kreuzstruktur K3 komplementär ist. Durch die USER-Reaktion wird die Sequenz M2 vom PCR-Produkt abgetrennt, so dass die eigentliche sticky-end-Sequenz M2c freigesetzt wird.

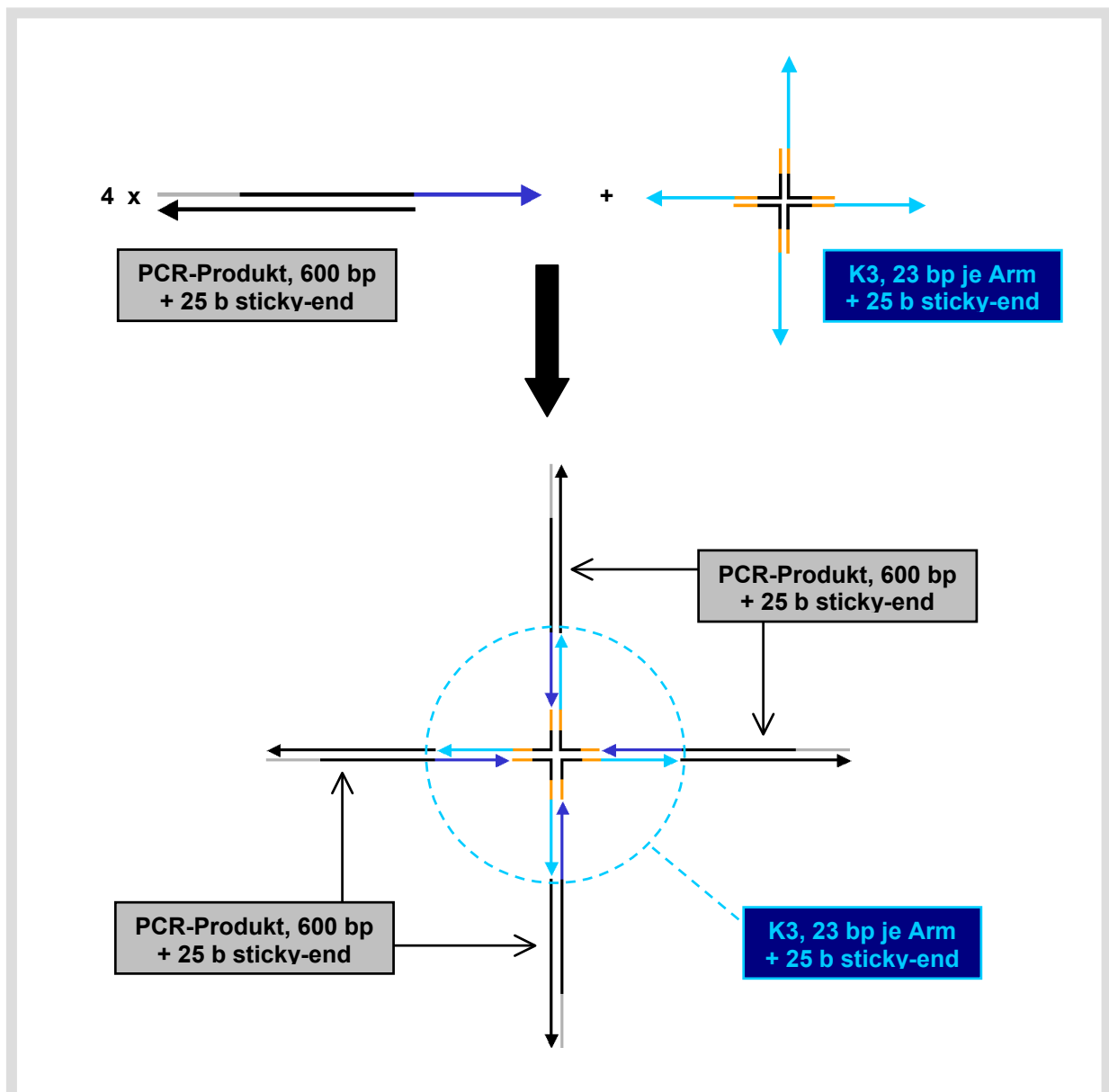


Abb. 134: Kombination der oligomeren Kreuzstruktur K3 mit einem PCR-Produkt aus der USER-Reaktion. Das überhängende Ende des PCR-Produktes (600 bp + 25 b sticky-end) besteht aus der Sequenz M2c und jeweils einem zusätzlichen Adenosin an den beiden Enden der Sequenz. Am 5'-Ende wird ein A als komplementäre Base zum U des Primers eingebaut. Am 3'-Ende wird eine zusätzliches A durch die nucleotidyl transferase Aktivität der Taq-DNA-Polymerase angehängt.

Das verwendete PCR-Produkt hatte in Dimerisierungsversuchen mit einem anderen PCR-Produkt mit dem entsprechenden komplementären sticky-end zur Bildung von etwa 60 % der dimeren Struktur geführt. Wie bereits weiter oben erwähnt, führt die Symmetrie des hier diskutierten verzweigten Systems zu der Möglichkeit, das PCR-Produkt im Überschuss einzusetzen. Dadurch ist es evtl. möglich, die Tendenz zur Bildung der kompletten Zielstruktur zu steigern. Die Hybridisierung wurde in drei unterschiedlichen Ansätzen durchgeführt. In zwei Fällen wurden jeweils 0,16 pmol der Oligonukleotid in 10 µl gemischt und die Kreuzstruktur mit dem Temperaturprogramm Hyb90.CYC inkubiert. Anschließend wurde diese Mischung mit einem bzw. mit vier Äquivalenten (0,64 bzw. 2,56 pmol) des PCR-Produktes versetzt und von 40 °C in Schritten von 0,7 °C/h auf 8° C abgekühlt (Hyb40.CYC). Bei diesem Vorgehen sollte die oligomere Kreuzstruktur erhalten bleiben, während die sticky-ends mit dem PCR-Produkt hybridisieren. Im dritten Ansatz wurden alle Komponenten im stöchiometrischen Verhältnis zusammen gegeben und direkt mit dem Temperaturprogramm Hyb40.CYC inkubiert. Die Bildung der Kreuzstruktur wird, wie erwartet, durch den Überschuss des PCR-Produktes begünstigt (Abb. 135, links). Im Vergleich zu den stöchiometrischen Ansätzen ist die entsprechende Bande deutlich stärker. Es treten aber trotzdem noch Banden der dimeren und trimeren Strukturen auf. Die Art der Hybridisierung hat keinen erkennbaren Einfluss. Die Dimerbanden im Ansatz mit vierfachem Überschuss an PCR-Produkt ist im Vergleich zu den anderen Ansätzen deutlich verschoben. Dieser Effekt tritt jedoch in einem Wiederholungsexperiment nicht mehr auf (Abb. 135, Spur 4). Hier ist auch die Verzerrung der Banden nicht mehr so stark ausgeprägt. Als Vergleich sind auf diesem Gel zwei weitere Proben gezeigt, die aus einem anderen Experiment stammen. Die obere Bande auf Spur 5 entspricht der Verknüpfung von zwei PCR-Produkten, auf Spur 6 ist eine Kreuzstruktur mit annähernd gleichem Aufbau wie die hier diskutierten Proben aufgetragen.

Der Vergleich der Spuren 4, 5 und 6 zeigt, dass die Verzerrung auf den Bereich der 600 bp Bande von Spur 4 beschränkt ist. Ein Vergleich mit dem Marker verdeutlicht den Einfluss der Geometrie auf die elektrophoretische Mobilität der Proben. Die dimeren Strukturen, die ja noch weitgehend linear sind, liegen entsprechend ihrer Größe auf Höhe der Markerbande mit 1200 bp. Die verzweigten Strukturen mit drei bzw. vier Armen zeigen, aufgrund ihrer Geometrie, eine deutlich niedrigere Mobilität als die entsprechenden linearen DNA Fragmente. In der ursprünglichen Kreuzstruktur J1 ist dieser Effekt noch nicht zu erkennen. Hier kann das veränderte Verhalten im Vergleich zu linearen DNA-Strukturen erst durch die Steigung im Ferguson Plot nachgewiesen werden [28]. Bei der größeren oligomeren Kreuzstruktur (K2) ist die Verminderung der Mobilität aufgrund der verzweigten Struktur bereits deutlich erkennbar.

Die Kreuzstruktur mit insgesamt 92 bp zeigt eine elektrophoretische Mobilität, die einem linearen DNA-Molekül von 110-120 bp entspricht. In dem hier beschriebenen polymeren verzweigten System zeigt die vollständige Struktur mit 2600 bp eine Bande, die deutlich oberhalb der 3000 bp Bande des Markers liegt.

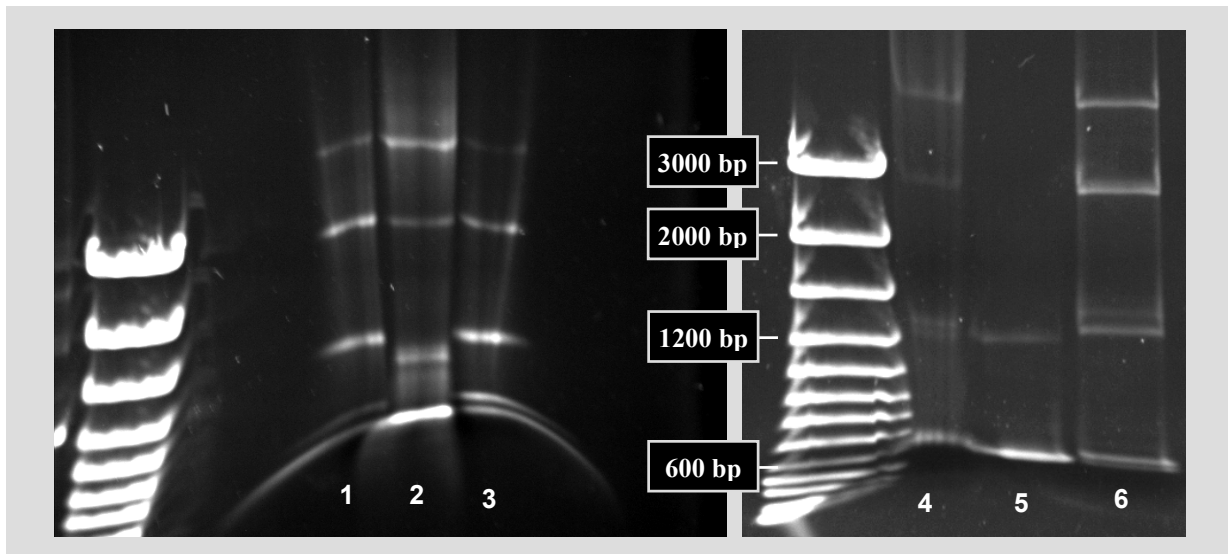


Abb. 135: Links: GeneRuler, Spur 1: Oligo-Kreuz + 1 Äq. PCR-Produkt, Spur 2: Oligo-Kreuz + 4 Äq PCR-Produkt, Spur 3: Oligos der Kreuzstruktur + 1 Äq. PCR-Produkt gemeinsam hybridisiert. Rechts: GeneRuler, Spur 4: Gleiche Probe wie auf Spur 2, Spuren 5 u. 6: Kreuzstrukturen auf der Basis von J1 bzw. K2 (wird im Text erläutert).

Eine quantitative Auswertung der Intensitäten aus Abb. 135 (links) ist aufgrund der starken Hintergrundintensität sicherlich mit relativ großen Fehlern behaftet. Die Plots der integrierten Intensitäten (Abb. 136) lassen aber zumindest eine grobe Abschätzung zu. In der Mischung mit vierfachem Überschuß liegt der Anteil an nicht hybridisierten PCR-Produkten bei gut 60 %. Aufgrund der Stöchiometrie müssen aber mindestens 75 % in monomerer Form vorliegen. Diese Diskrepanz ist durch den Fehler in der Auswertung zu erklären. Das Ergebnis legt aber nahe, dass der größte Teil der zugesetzten Oligonukleotide an einer Hybridisierung mit den PCR-Produkten beteiligt ist. In der stöchiometrischen Mischung sind ca. 60 % der PCR-Produkte an der Bildung von di-, tri- und tetrameren Strukturen beteiligt. Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen der Dimerisierungsversuche mit diesem Doppelstrangfragment überein. Hier tritt aber direkt oberhalb des Monomers eine zusätzliche Bande auf. Diese ist um ca. 50 bp verschoben. Das Auftreten dieser Bande kann nicht durch die Denaturierung des PCR-Produktes erklärt werden, da sie auch in der Probe zu sehen ist, die während der Hybridisierung auf maximal 40 °C erwärmt wurde. Hier kann es sich eigentlich nur um eine Anlagerung von einem oder mehreren Oligos an das PCR-Produkt handeln. Diese Bande tritt in der Probe mit überschüssigem PCR-Produkt nicht auf. Hier führt offenbar die größere Menge an freien Doppelsträngen zu einer Hybridisierung solcher Strukturen mit einem weiteren Monomer.

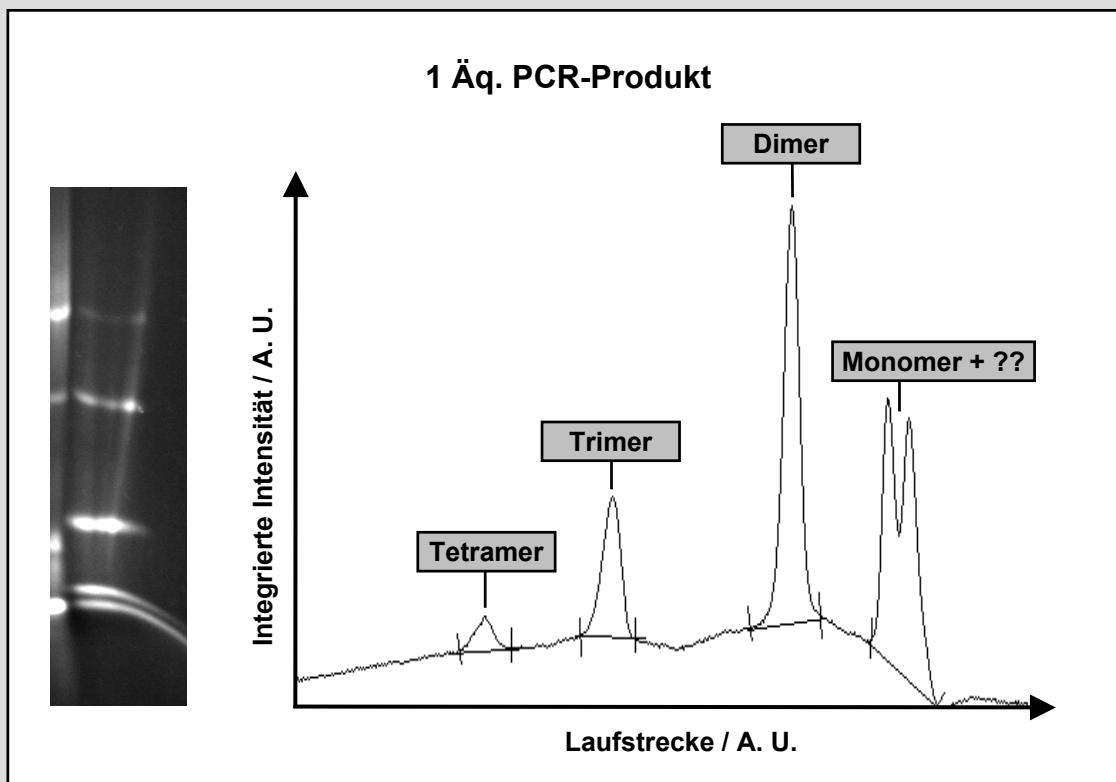
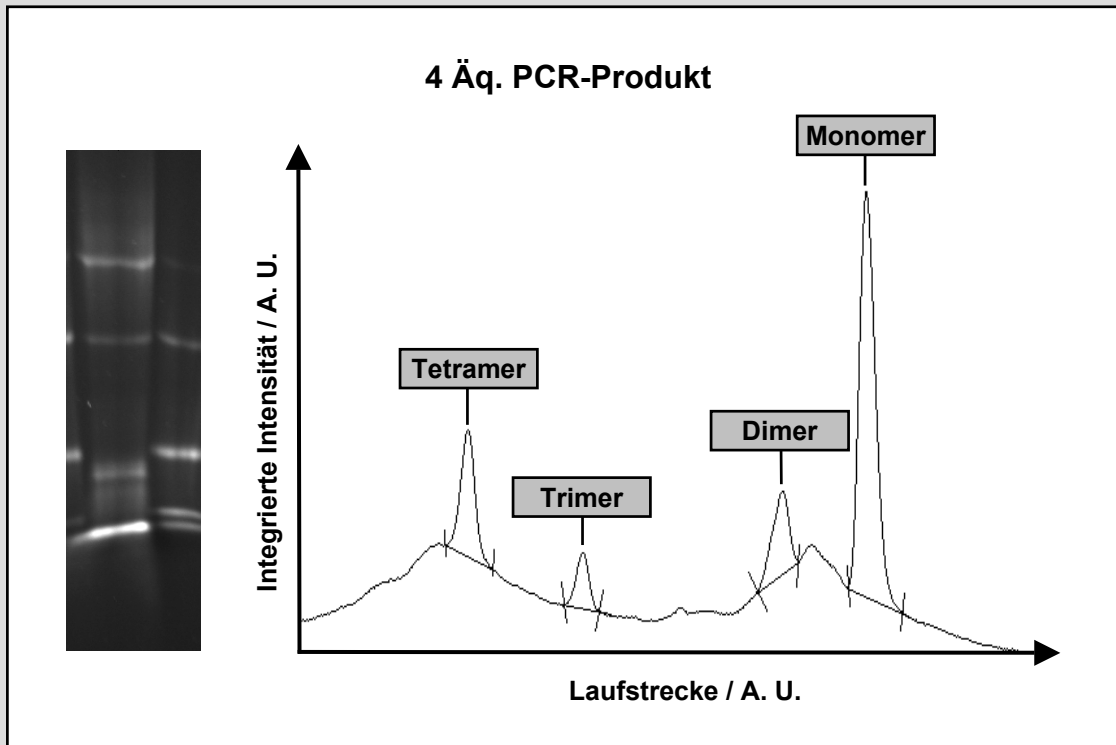


Abb. 136: Oben: Verlauf der integrierten Intensitäten der Spur 2 aus Abb. 135. Unten: Verlauf der integrierten Intensitäten der Spur 3 aus Abb. 135. Durch die Verwendung des PCR-Produktes im Überschuss wird die Bildung der vollständigen Kreuzstruktur begünstigt. Die zusätzliche Bande bei ca. 650 bp tritt nur in den stöchiometrischen Mischungen auf. Hierbei kann es sich eigentlich nur um eine Kombination eines PCR-Produktes mit einem oder mehreren Oligos handeln.

Die Struktur der DNA-Kreuzung mit semiflexiblen Armen, mit einer Konturlänge von rund 200 nm, lässt sich sehr schön mit Hilfe des AFM abbilden (Abb. 137). Auch die Anwesenheit der dimeren und trimeren Strukturen ist gut zu erkennen. Im Fall der trimeren Verbindung ist die Verknüpfung der drei Arme in einem klar definierten Kreuzungspunkt gut aufgelöst.

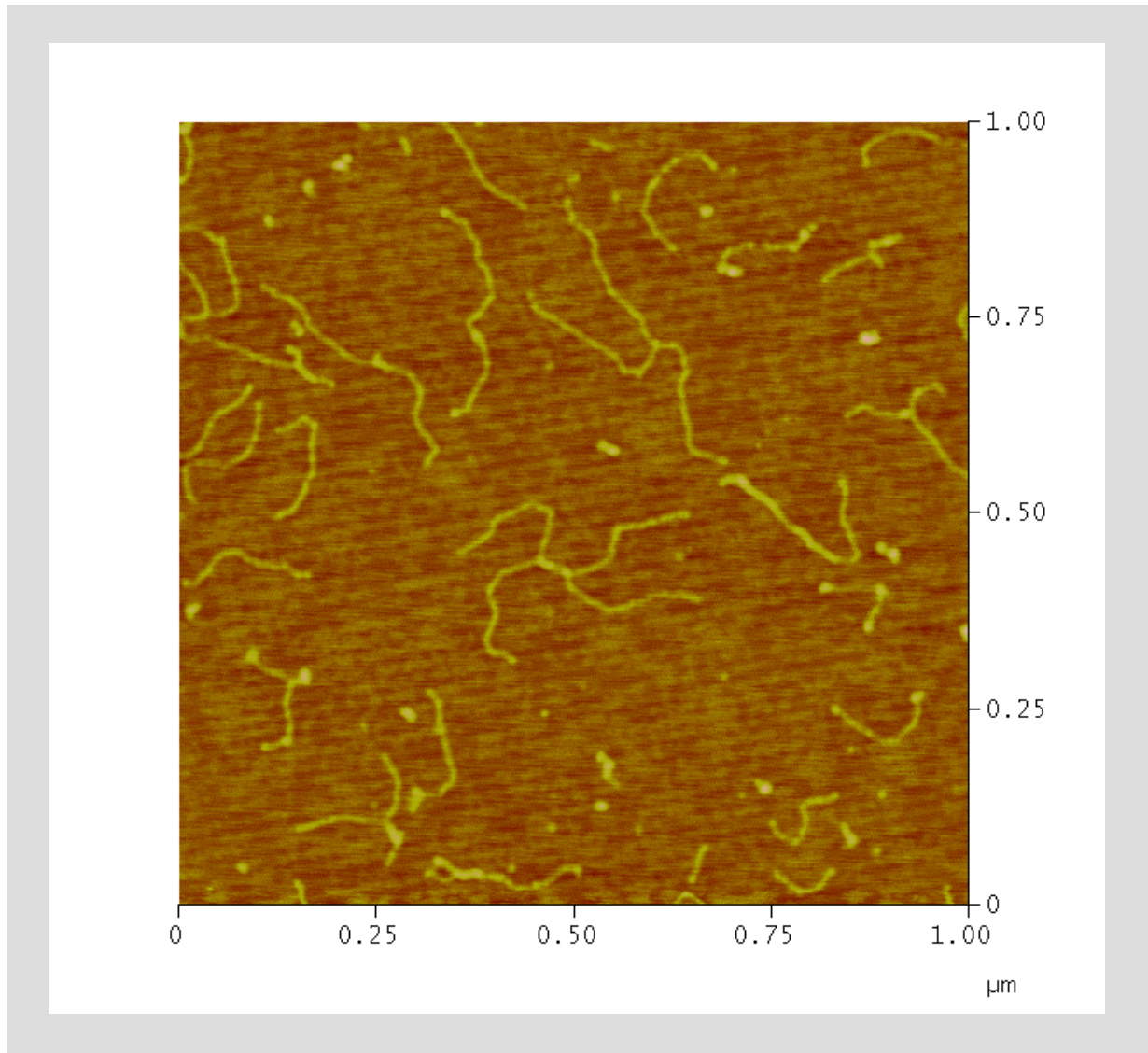


Abb. 137: Abbildung der verzweigten DNA-Struktur mittels AFM. Zur Probenpräparation wird die Mg^{2+} -haltige DNA-Lösung auf frisch gespaltenes Mica gegeben. Nach einer Adsorptionszeit von 5-10 min wird das Substrat mit Milli-Q-Wasser gespült und anschließend mit Stickstoff trocken geblasen. Die Abbildung erfolgt im Tappingmode.

Die Arme der gezeigten tetrameren Verbindung sind im Bereich des Verzweigungspunktes umeinander verdrillt. Dementsprechend zeigt die Struktur in diesem Bereich eine Höhenmodulation (Abb. 138). Mit einer Höhe von 0,2-0,3 nm zeigen die einzelne Arme eine recht gute Übereinstimmung mit dem erwarteten Helixdurchmesser ($\varnothing[B-DNA] = 20 \text{ \AA}$ [81]). In der Nähe der Verzweigungsstelle erreicht die gemessene Höhe in etwa den doppelten Wert.

3 Ergebnisse und Diskussion

Die Tendenz zur Verdrillung scheint in einigen Fällen auch zur Verknüpfung von PCR-Produkten zu führen, ohne dass Oligonukleotide beteiligt sind, da zum Teil Strukturen auftreten, die nicht durch die Verknüpfung mit Oligonukleotiden erklärbar sind (Abb. 139).

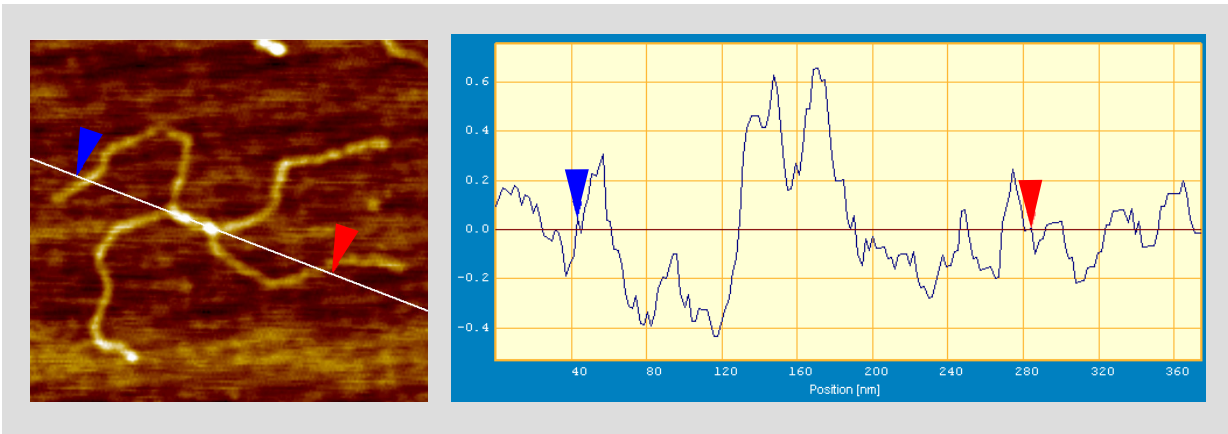


Abb. 138: Lineares Höhenprofil über den Bereich der Verzweigungsstelle: Die Höhe der einzelnen Arme liegt im theoretisch erwarteten Bereich von 0,2-0,3 nm. In der Nähe des Verzweigungspunktes zeigt die Struktur aufgrund der Verdrillung in etwa die doppelte Höhe.

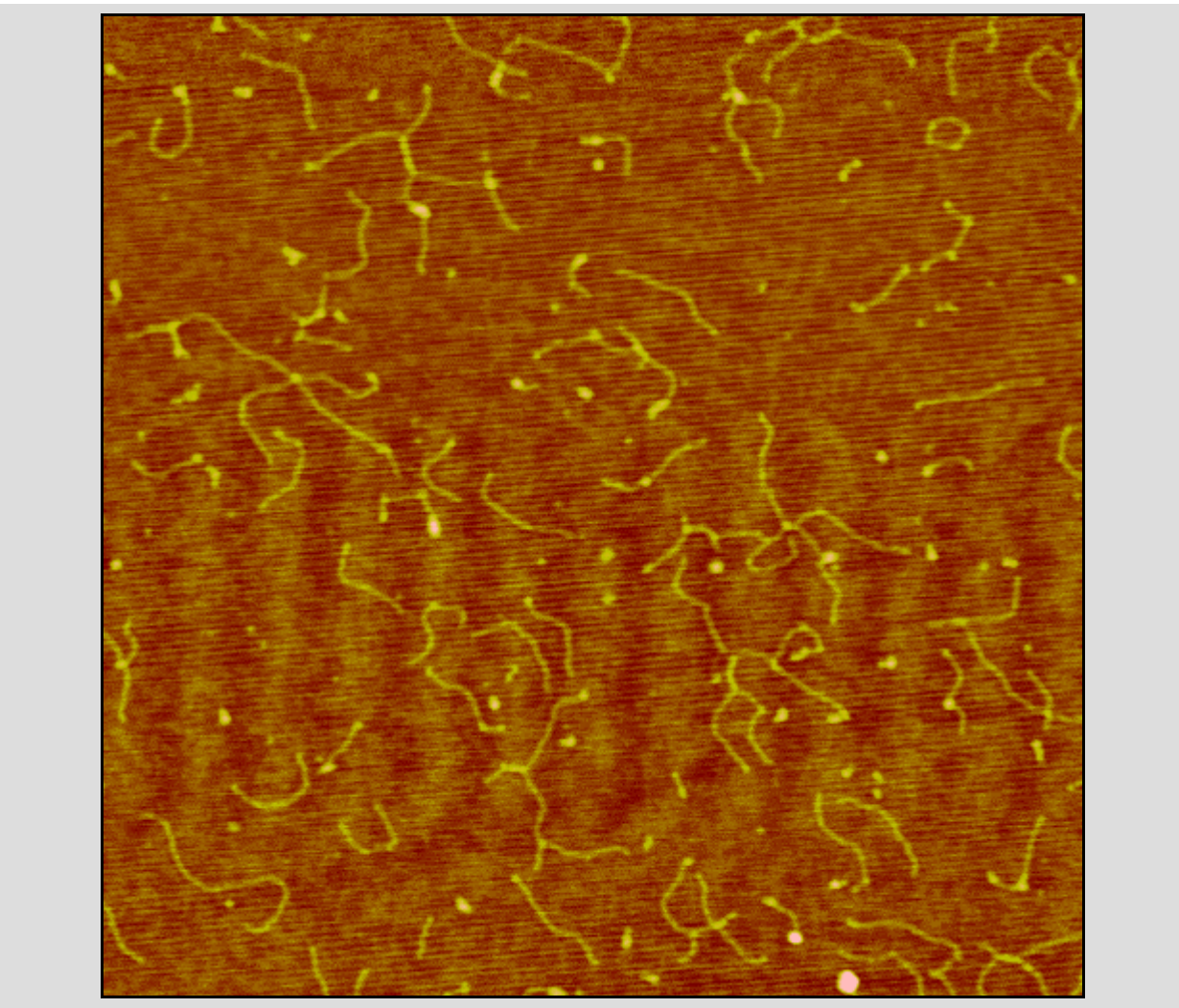


Abb. 139: Ein anderer Bereich der Probe aus Abb. 137 (Bildausschnitt: 1,5 µm) zeigt neben den erwarteten Strukturen auch noch andere Verknüpfungen von PCR-Produkten. Zum Teil können diese nicht durch die Verbrückung über Oligonukleotide erklärt werden. Die Doppelstränge scheinen eine generelle Tendenz zur Assoziation durch Verdrillung oder andersartige Wechselwirkungen zu haben.

3.6.3 Direkte Verknüpfung der Kreuzsequenzen mit PCR-Produkten

Im letzten Abschnitt wurde beschrieben, wie die vier Arme der oligomeren Kreuzstruktur durch die Anlagerung eines PCR-Produktes verlängert werden können. Eine alternative Vorgehensweise ist die Synthese von vier verschiedenen PCR-Produkten mit überstehenden Enden, die durch Hybridisierung zur Bildung der Verzweigungsstelle führen.

Verwendete Primer für die Bildung der Kreuzstruktur J1:

L1: Primer ohne sticky-end-Sequenz:

5'-GTC TAT TTC GTT CAT CC-3'

PK1: Primersequenz R1 (braun), Spacer18, sticky-end-Sequenz J1S1 (schwarz)

5'-C GCA ATC CTG AGC ACG - Sp18- AAG TTC TGC TAT GTG GC-3'

PK2: Primersequenz R1 (braun), Spacer18, sticky-end-Sequenz J1S2 (schwarz)

5'-C GTG CTC ACC GAA TGC - Sp18- AAG TTC TGC TAT GTG GC-3'

PK3: Primersequenz R1 (braun), Spacer18, sticky-end-Sequenz J1S3 (schwarz)

5'-G CAT TCG GAC TAT GGC - Sp18- AAG TTC TGC TAT GTG GC-3'

PK3: Primersequenz R1 (braun), Spacer18, sticky-end-Sequenz J1S3 (schwarz)

5'-G CCA TAG TGG ATT GCG - Sp18- AAG TTC TGC TAT GTG GC-3'

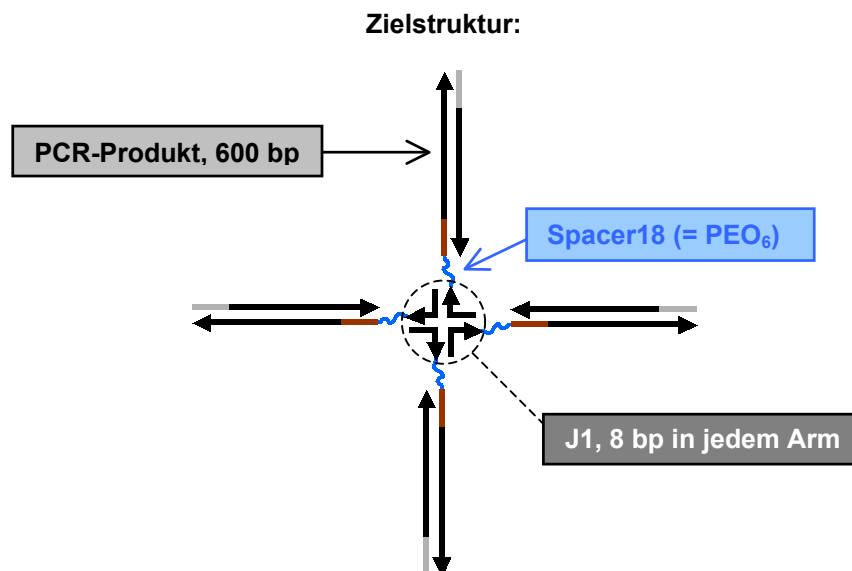


Abb. 140: Aufbau und Sequenzen der Kreuzstruktur aus PCR-Produkten mit PEG-modifizierten Primern, auf der Grundlage von J1.

Verwendete Primer für die Bildung der Kreuzstruktur K2:

L1: Primer ohne sticky-end-Sequenz:

5'- GTC TAT TTC GTT CAT CC-3'

PK31: Primersequenz R1 (braun), Spacer18, sticky-end-Sequenz PK31 (schwarz / orange)

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'

PK34: Primersequenz R1 (braun), Spacer18, sticky-end-Sequenz PK34 (schwarz / orange)

5'- CCA CGG AGT ATC GAA CGT GCT CAC CGA ATG CGT GTC GTA ACG ATC A - Sp18-
AAG TTC TGC TAT GTG GC-3'

PK33: Primersequenz R1 (braun), Spacer18, sticky-end-Sequenz PK33 (schwarz / orange)

5'- TGA TCG TTA CGA CAC GCA TTC GGA CTA TGG CAT ACC TGG TCA TCT C - Sp18-
AAG TTC TGC TAT GTG GC-3'

PK32: Primersequenz R1 (braun), Spacer18, sticky-end-Sequenz PK32 (schwarz / orange)

5'- GAG ATG ACC AGG TAT GCC ATA GTG GAT TGC GAG CGT TGT ACT ACC G - Sp18-
AAG TTC TGC TAT GTG GC-3'

Zielstruktur:

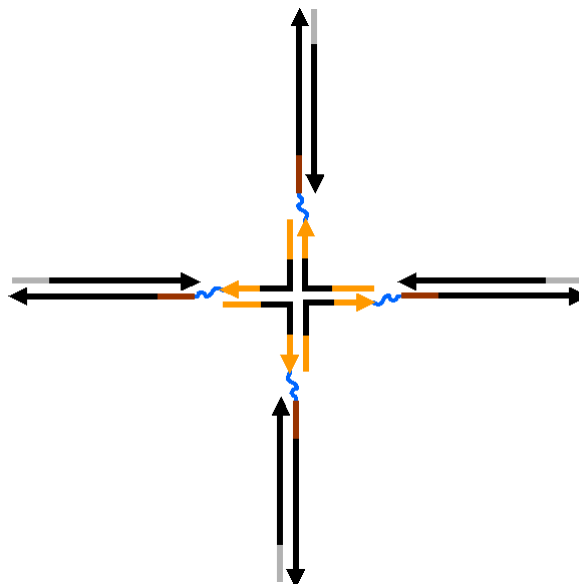


Abb. 141: Aufbau und Sequenzen der Kreuzstruktur aus PCR-Produkten mit PEG-modifizierten Primern, auf der Grundlage von K2.

Durch diese Herangehensweise wird die Zahl der Verknüpfungsstellen, im Vergleich zur Kombination der oligomeren Kreuzstruktur mit PCR-Produkten, von acht auf vier reduziert. Da die Dimerisierungsversuche mit PCR-Produkten gezeigt haben, dass die Verknüpfung von überstehenden Enden nicht quantitativ erfolgt, sollte eine kleinere Anzahl an Verknüpfungsstellen die Bildung der Zielstruktur begünstigen. Durch die Verwendung von PEG-modifizierten Primern kann außerdem der Syntheseaufwand verringert werden, so dass die erwünschte Zielstruktur sehr viel einfacher in ausreichend großen Mengen hergestellt werden kann, um eine Untersuchung der Struktur mit gängigen physikochemischen Methoden zu ermöglichen. Dieser Syntheseweg wurde zunächst im kleinen Maßstab getestet. Hierfür wurden acht verschiedene PCR-Produkte hergestellt. Die überstehenden Enden wurden so gewählt, dass sie den Oligonukleotiden J1S1-J1S4 und PK31-PK34 entsprechen. Die Kombination von jeweils vier PCR-Produkten sollte also zur Bildung der Kreuzstrukturen J1 (8 bp je Arm), bzw. K2 (23 bp je Arm) führen. Die verwendeten Primer wurden über denaturierende PAGE gereinigt. Die Aufreinigung der PCR-Lösungen erfolgte mit NucleoSpin. Für die Hybridisierung wurden stöchiometrische Mischungen von jeweils vier PCR-Produkten mit einer DNA Konzentration von $0,08 \mu\text{M}$ in $1 \times \text{TAE/Mg}$ Puffer hergestellt und 1,5 h bei 37°C inkubiert. Diese Temperatur sollte ausreichend niedrig sein, um eine Denaturierung der Doppelstrangfragmente zu vermeiden und ausreichend hoch, um eine vollständige Hybridisierung des Verzweigungspunktes zu gewährleisten. Die anschließende Gelelektrophorese wurde unter Kühlung mit Eiswasser durchgeführt. Dadurch kann die Temperatur in der Pufferkammer auf ca. 10°C gehalten werden. Auf der Grundlage von J1 wird nur die dimere Struktur gebildet. Die zu K2 analoge Verbindung zeigt das gleiche Bandenmuster wie die oben beschriebene Kombination der oligomeren Kreuzstruktur mit einem PCR-Produkt aus der USER-Reaktion (Abb. 142).

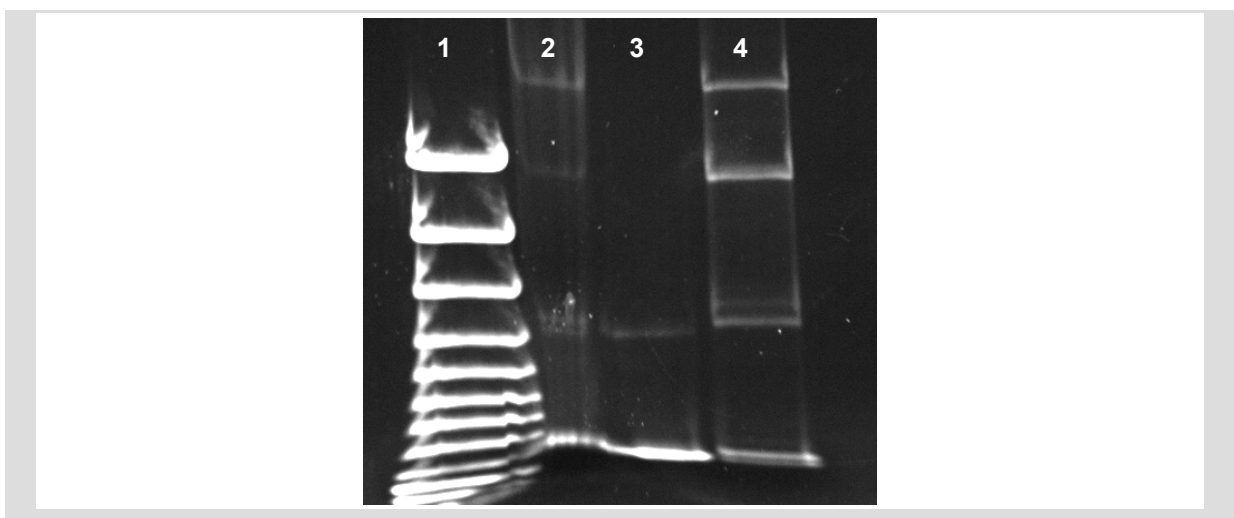


Abb. 142: (Gleiches Gel wie in Abb. 135, rechts), Spur 1: GeneRuler, Spur 2: Oligomere Kreuzstruktur K3 nach der Hybridisierung mit dem PCR-Produkt aus der USER-Reaktion, Spur 3 u. 4: Kombination von vier PCR-Produkten mit den Sequenzen von J1 bzw. K2 in den überstehenden Enden.

Die Bildung der Kreuzstruktur J1 wird also nicht nur durch die Anknüpfung von einzelsträngigen sticky-ends gestört, sondern auch durch die Anwesenheit eines Doppelstrangs am 3'-Ende der verwendeten Sequenzen. Die auf K2 basierende Verbindung ist deutlich stabiler. Hier sind gut 20 % der PCR-Produkte in der vollständigen Kreuzstruktur gebunden. Die Ausbeute liegt somit im gleichen Bereich wie im Fall der Verlängerung der oligomeren Kreuzstruktur durch die Hybridisierung mit dem PCR-Produkt in vierfachem Überschuss. Im Vergleich zu den entsprechenden stöchiometrischen Mischungen ist die Ausbeute deutlich besser. Hier wurden nur ca. 5 % der vollständigen Struktur gebildet. Insgesamt sind etwa 80 % der PCR-Produkte an der Bildung von di-, tri- und tetrameren Strukturen beteiligt. Dieser Wert liegt etwas höher als bei den Dimerisierungsversuchen. Der Anteil der gebildeten Zielstruktur liegt aber auch bei der Verknüpfung über 23 b in jedem Arm deutlich niedriger, als in dem oligomeren Systemen K2. Da der Doppelstrang während der Inkubation geschlossen bleiben sollte, können nur Sekundärstrukturen gebildet werden, die auch in dem oligomeren System auftreten. Sekundärstrukturen kommen daher nicht als Erklärung für die geringere Ausbeute in Frage. Die einzige mögliche Wechselwirkung in diesem System, die nicht in J1 bzw. K2 auftreten kann, ist eine Wechselwirkung zwischen den Sequenzen der sticky-ends und den doppelsträngigen PCR-Produkten. Hier wäre z.B. eine Rückfaltung der überstehenden Enden auf den Doppelstrang vorstellbar, wie sie bereits im Rahmen der Dimerisierungsexperimente diskutiert wurde. Ein weiterer Unterschied zwischen der Verknüpfung von PCR-Produkten und dem oligomeren System, ist die Tatsache, dass im Falle von PCR-Produkten zusätzliche Ladungen in die Nähe des Verzweigungspunktes gebracht werden müssen. Aufgrund der hohen Dielektrizitätskonstante von Wasser ist jedoch die Reichweite der dabei auftretenden Coulombkräfte so klein, dass man keine nennenswerten elektrostatischen Abstoßungen erwarten würde. Wie auch schon bei den verschiedenen Dimerisierungsversuchen von PCR-Produkten, ist eine quantitative Erzeugung der Zielstruktur offenbar nicht realisierbar. Es sollte aber prinzipiell möglich sein, den gebildeten Anteil der zu K2 analogen Struktur von den Nebenprodukten abzutrennen.

3.6.3.1 Synthese im großen Maßstab

Die Herstellung der PCR-Produkte im größeren Maßstab erfolgte durch die parallele Durchführung von jeweils fünfundzwanzig 100 µl-Ansätzen. Bei einer typischen Ausbeute von etwa 5 µg je Ansatz können auf diese Weise rund 125 µg des entsprechenden PCR-Produktes erzeugt werden. Es ist somit möglich in 200 PCR-Ansätzen ca. 1 mg der vier verschiedenen Doppelstrangfragmente herzustellen. Eine Erhöhung des Reaktionsvolumens wurde aufgrund der schlechten Erfahrungen mit der Wasserbad-PCR ($V = 500 \mu\text{l}$) vermieden. Nach der PCR

wurden jeweils 50 Ansätze, die das gleiche Produkt enthielten, vereinigt und über Ultrafiltration (Amicon Ultra, MWCO = 50 kDa) aufgereinigt. In einem Fall wurde versucht, die Ausbeute durch eine Erhöhung der Anzahl an Temperaturzyklen zu verbessern. Nach 99 Zyklen wurde jedoch nicht mehr das erwünschte Produkt erhalten. Die Gelelektrophorese zeigte lediglich eine hochmolekulare Bande, die nicht mehr in das Gel eindringt. Offenbar führt die Inkubation der Polymerase bei hohen Temperaturen über einen zu langen Zeitraum zu unerwünschten Enzymaktivitäten. Bei den anderen PCR-Ansätzen, die unter den gleichen Bedingungen und mit den gleichen Komponenten wie zuvor durchgeführt wurden, tritt eine zusätzliche Bande direkt unterhalb des PCR-Produktes auf, die zuvor nicht beobachtet wurde. Der Anteil dieses Nebenprodukts liegt bei einigen Ansätzen bei ca. 50 %. Durch eine Erhöhung der Annealingtemperatur nimmt der Anteil dieses Nebenproduktes ab. Eine vollständige Vermeidung ist auf diesem Weg jedoch nicht möglich (Abb. 143). Das plötzliche Auftreten dieses Nebenproduktes ist schwer zu verstehen, da bei allen bisher vorgestellten PCR-Produkten die gleichen Primersequenzen zum Einsatz kamen. Lediglich die Sequenzen der sticky-ends wurden variiert. Eine unspezifische Bindung der Primer an die Templat DNA hätte daher schon viel früher bemerkt werden müssen. Die Sequenzen der verschiedenen sticky-ends sind so weit vom 3'-Ende der Primersequenzen entfernt, dass sie keinen Einfluss auf die Selektivität der Primeranlagerung ausüben sollten. Es wäre außerdem ein großer Zufall, dass ein Mispriming ausgerechnet so erfolgen würde, dass ein Nebenprodukt mit annähernd gleicher Größe gebildet wird. Eine mögliche Erklärung kann evtl. im Auflösungsvermögen der verwendeten Agarose Gele zu finden sein. Die Versuche mit den kleinen Modellsystemen in der PCR mit PEG-modifizierten Primern haben gezeigt, dass sich etwa 10 % eines Nebenprodukts bilden, dessen Laufeigenschaften im Gel mit denen des PCR-Produkts ohne sticky-end übereinstimmen. Bisher hatten die verwendeten PCR-Produkte überstehende Enden mit einer Länge von 23 Basen. In den standardmäßig verwendeten analytischen Agarose Gelen ist es kaum möglich den Unterschied zwischen 600 bp und 600 bp + 23 b aufzulösen. Im Unterschied dazu haben die hier gezeigten Proben sticky-end-Sequenzen von 46 Basen. Dadurch wird der Größenunterschied zwischen den PCR-Produkten mit und ohne sticky-ends offenbar ausreichend groß, dass er in Standard Agarose Gelen detektiert werden kann. Für diese Erklärung spricht die Tatsache, dass auch die Gelelektrophorese in der großen vertikalen Apparatur (vgl. Abschnitt 3.5.1) für ein PCR-Produkt mit 23 Basen Überhang eine vergleichbare Nebenproduktbande zeigt. Die Auftrennung mit diesem Elektrophoresesystem wurde aber erst gegen Ende der Arbeit optimiert. Es wäre daher möglich, dass bereits in anderen Proben ein Nebenprodukt aufgetreten ist, dass bisher nicht detektiert werden konnte.

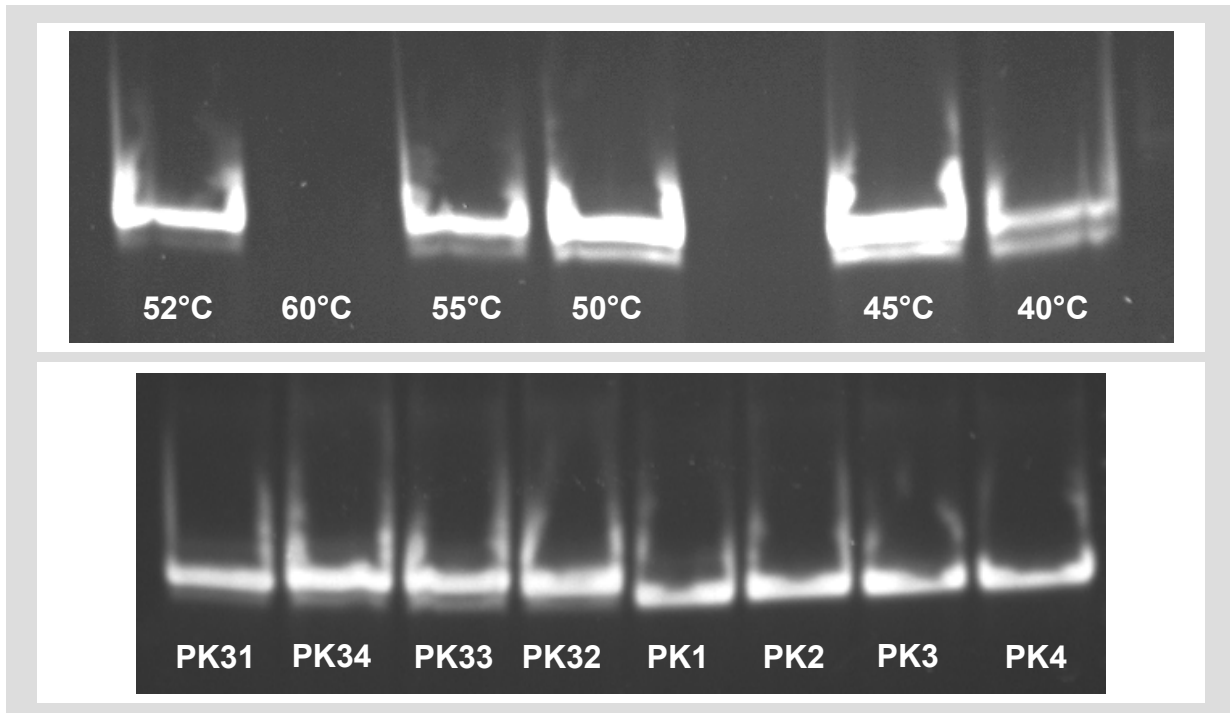


Abb. 143: Oben: PCR-Produkte aus den Ansätzen mit dem Primer PK34, bei verschiedenen Annealingtemperaturen. Ganz Links: Temperaturprogramm PCRPGEM2.CYC (Annealing bei 52 °C), die anderen Proben wurden unter Verwendung von PCR2.CYC erzeugt. Die Annealingtemperaturen sind auf der jeweiligen Spur vermerkt. Mit steigender Annealingtemperatur nimmt der Anteil des Nebenproduktes ab. Bei 60 °C wird kein Produkt mehr gebildet. Unten: PCR-Produkte aus den Probeansätzen mit den Primern PK31-PK34 (Kreuzung basierend auf K2) bzw. PK1-PK4 (Kreuzung basierend auf J1). Alle Proben wurden mit dem Programm PCR2.CYC bei einer Annealingtemperatur von 40 °C erzeugt. Die Probe mit PK34 zeigt hier deutlich weniger Nebenprodukt als die entsprechende Probe in der Abb. 143 oben.

Ein bekanntes Problem bei der Durchführung der PCR, das zur Bildung von unerwünschten Produkten führen kann, ist die Tatsache, dass Polymerasen in der Regel bereits bei RT eine gewisse Polymeraseaktivität zeigen. Bei Temperaturen weit unterhalb der Schmelztemperatur der Primer ist eine unspezifische Assoziation zwischen Primern und Templat sehr viel wahrscheinlicher als im Verlauf der PCR. Wenn unspezifisch gebundene Primer durch die Polymerase verlängert werden, entstehen neue Templatstränge, die in der PCR amplifiziert werden können. Durch die exponentielle Vervielfältigung in der PCR kann so, aus wenigen Molekülen, ein deutlicher Anteil an Nebenprodukt entstehen. Dieser Zusammenhang könnte erklären, warum das Nebenprodukt bei der parallelen Durchführung von 25 PCR-Ansätzen in deutlich größerem Maße gebildet wird als bei den Probeansätzen. Bei der Synthese im großen Maßstab wurde ein Mastermix angesetzt, der alle Komponenten außer der Taq Polymerase enthält. Dieser wurde auf 25 Reaktionsgefäße aufgeteilt und anschließend mit der Polymerase versetzt. Dadurch ist die Inkubationszeit der Primer in Gegenwart des Templatstrangs und der Polymerase bei RT deutlich länger als es bei den Probeansätzen der Fall war. Dieses Problem könnte durch die sogenannte Hot-Start-PCR behoben werden [185]. Neben zwei Varianten der Hot-Start-PCR wurde auch die Verwendung von anderen Puffersystemen bzw. anderen Polymerasen getestet:

1. T-RT: PCR mit Taq nach 15 min Inkubation des kompletten PCR-Ansatz bei RT
2. T-HS: „Manuelle Hot-Start-PCR“ PCR mit Taq, die Polymerase wurde erst nach dem ersten Denaturierungsschritt des PCR-Programms bei 95 °C zugesetzt.
3. TT: Taq Polymerase in ThermoPol Puffer
4. TS: Taq Polymerase in Standard Taq Puffer
5. PHF: Phusion Polymerase in HF-Puffer
6. PGC: Phusion Polymerase in GC-Puffer
7. Accu: AccuPrime (Antikörper gesteuerte Hot-Start-Polymerase) in AccuPrime Puffer II

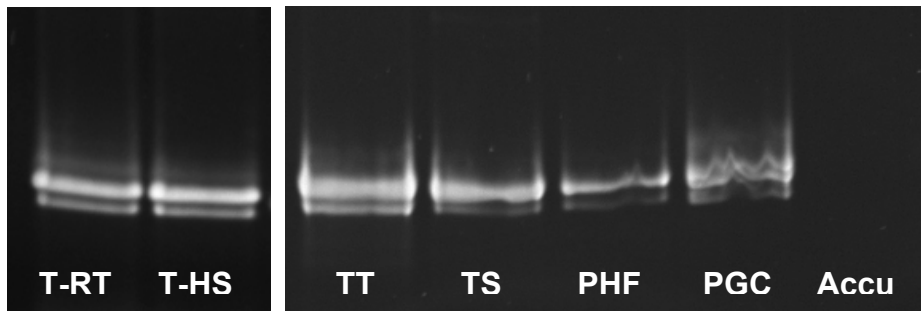


Abb. 144: Auswirkung verschiedener PCR-Bedingungen auf die Bildung des Nebenprodukts: Die Probenbezeichnungen beziehen sich auf die unter 1.-7. angegebenen Zusammensetzungen.

Zu einem gewissen Teil tritt das Nebenprodukt in allen Ansätzen auf. Die „Manuelle Hot-Start-PCR“ liefert genau das gleiche Ergebnis wie die PCR nach einer Inkubation des kompletten Ansatzes bei RT. Das oben beschriebene Problem der unspezifischen Primeranlagerung, kann also nicht die Ursache für die Bildung des Nebenprodukts darstellen. Die Verwendung der Hot-Start-Polymerase AccuPrim liefert überhaupt kein Produkt. Hier waren offensichtlich die PCR-Bedingungen nicht mit dem verwendeten Enzymsystem kompatibel. Da aber die „Manuelle Hot-Start-PCR“ keine verbesserte Selektivität lieferte wurde das Konzept der Hot-Start-PCR nicht weiter verfolgt.

3.6.3.2 Identifizierung von Nebenprodukten

Wenn das Nebenprodukt durch eine unspezifische Primeranlagerung gebildet wird, trägt es das gleiche überhängende Ende wie das Hauptprodukt. Die Zugabe eines komplementären Oligonukleotids sollte daher zu einer Verschiebung der beiden Bande führen. Das entsprechende Experiment zeigt aber, dass nur die Bande des Hauptprodukts auf die Zugabe der komplementären Sequenz reagiert (Abb. 145).

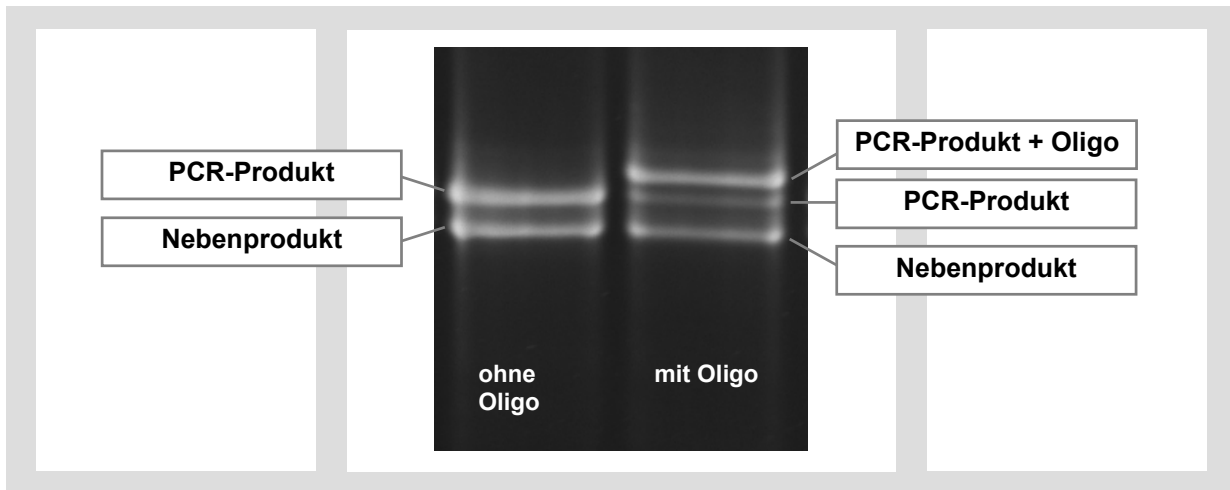


Abb. 145: PCR-Lösung vor und nach der Hybridisierung mit einem komplementären Oligonukleotid

Dieses Experiment zeigt ganz deutlich, dass im Nebenprodukt kein überstehendes Ende enthalten ist. Hierfür gibt es nur drei mögliche Erklärungen:

1. Ein gewisser Anteil des PEG-modifizierten Primers trägt von vornherein keine sticky-end-Sequenz: Diese Erklärung kann ausgeschlossen werden, da die PEG-Modifizierung in der Festphasensynthese eingeführt wird. Nach der Synthese erfolgte eine Aufarbeitung der Primer über die präparative PAGE. Bei diesem Reinigungsprozess werden die Fehlsequenzen annähernd quantitativ abgetrennt. Man kann sich daher sicher sein, dass die Primer keine Nebenprodukte enthalten, die kleiner sind als die eigentliche Zielsequenz.
2. Bei einem Teil der PEG-modifizierten Primer wird die sticky-end-Sequenz während der Lagerung oder während der PCR abgespalten: Prinzipiell kommen hier sowohl thermische als auch enzymatische Spaltungsmechanismen in Frage. Ein thermischer Abbau der DNA sollte weitgehend statistisch zur Spaltung der DNA an einer beliebigen Stelle führen. Das Nebenprodukt zeigt aber eine klar definierte Bande. Es gibt keinen Grund, warum die Anwesenheit des PEG-Spacers zu einer bevorzugten thermischen Spaltung im Bereich dieser Modifizierung führen sollte. Typische Mechanismen für die thermische Spaltung des Phosphatrückgrads basieren auf der Anwesenheit der 2'-OH Gruppe in RNA [186] oder auf der Spaltung an abasischen Stellen der DNA unter Öffnung des Riboserings [72, 187]. Keiner dieser Reaktionsmechanismen kann auf die PEG-Modifizierung übertragen werden.
3. Der modifizierte Primer wird nicht in das PCR-Produkt eingebaut: Da die PCR ohne die Anlagerung von Primern kein Produkt liefern kann, müsste in diesem Fall ein PCR-Produkt entstehen, in dem auf beiden Seiten der nicht modifizierte Primer eingebaut wird. Ein entsprechender PCR-Ansatz, dem nur der nicht modifizierte Primer in doppelter Menge zugesetzt wurde, lieferte jedoch kein Produkt.

Die einzige Erklärung, die nicht ausgeschlossen werden kann, ist demnach die Abspaltung der sticky-end-Sequenz in der Nähe der PEG-Modifizierung. Aus den oben genannten Gründen scheint eine enzymatische Spaltung am wahrscheinlichsten zu sein. Zur Überprüfung dieser Möglichkeit wurde einer der PEG-modifizierten Primer (PK34) in einem PCR-Ansatz ohne Templat-DNA dem Temperaturprogramm PCR2.CYC ausgesetzt und anschließend mittels denaturierender PAGE untersucht. Nach der Inkubation des Primers tritt ein Primer-Dimer mit einer Größe von 80 b auf (Abb. 146). Außerdem werden zwei zusätzliche schwache Banden gebildet. Die Mobilitäten dieser Banden stimmen gut mit den Mobilitäten der Produkte überein, die man bei einer Spaltung des Primers im Bereich der PEG-Modifizierung erwarten würde. Die Bande bei 46 b entspricht der Größe der sticky-end-Sequenz. Die Bande bei 21 b kann der Primersequenz von 17 b mit der angehängten PEG-Modifikation zugeordnet werden. Die Intensitäten dieser Banden sind zwar relativ schwach, wenn es sich aber tatsächlich um eine enzymatische Spaltung handelt, ist es durchaus denkbar, dass diese Enzymaktivität in Abwesenheit von dNTPs oder in einem anderen Puffer deutlich stärker auftritt. Da die verschiedenen Aktivitäten eines Enzyms generell bei verschiedenen Temperaturen unterschiedlich stark ausgeprägt sind, wäre auch der in Abb. 143 beobachtete Einfluss der Annealingtemperatur auf die Bildung des Nebenprodukts verständlich.

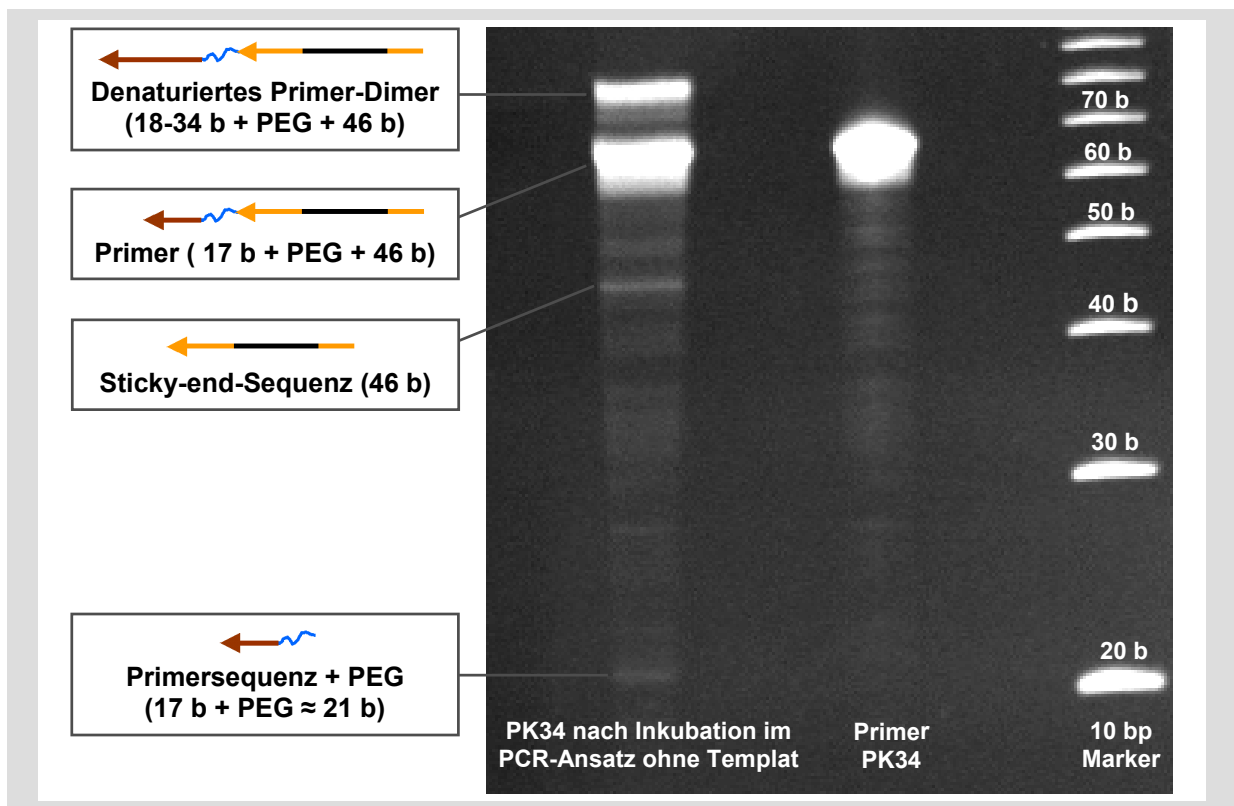


Abb. 146: Denaturierende PAGE eines PEG-modifizierten Primers vor und nach Inkubation in Gegenwart der Taq Polymerase: Der Primer PK34 (3'-Primersequenz[17 b]-Spacer18-sticky-end[46 b]-5') wurde in einem PCR-Ansatz ohne Templat dem PCR-Zyklus unterzogen. Nach der Inkubation zeigt sich ein Primer-Dimer mit einer Größe von ca. 80 Basen. Zusätzlich treten zwei schwache Banden bei 46 bzw. 21 Basen auf. Diese stimmen in ihren Größen gut mit der sticky-end-Sequenz (46 b) bzw. mit der Primer-Sequenz mit PEG-Modifizierung (17 b + PEG-Spacer) überein.

Prinzipiell sollte die Bildung der erwünschten Kreuzstruktur auch in Anwesenheit des Nebenprodukts ungestört ablaufen, da das Nebenprodukt nicht an der Hybridisierung teilnehmen kann. Bei der Konzentrationsbestimmung der einzelnen PCR-Produkte mittels UV-Absorption wird aber die gesamte DNA-Konzentration der Lösung detektiert. Wenn die verschiedenen PCR-Produkte unterschiedliche Anteile des Nebenproduktes enthalten, ist dadurch eine exakte Einstellung der Stöchiometrie nicht mehr möglich. Für die ersten Hybridisierungsexperimente wurden drei unterschiedliche Temperaturprogramme getestet. Die DNA-Konzentration lag im gleichen Bereich, wie bei den Probeansätzen (0,1 μM). Eine Probe wurde, wie zuvor, für ca. 2 h bei 37 °C inkubiert. Bei den beiden anderen Ansätzen wurde das Temperaturprogramm Hyb90.CYC bzw. 10 Zyklen zwischen 4 °C und 37 °C für die Hybridisierung eingesetzt. Durch die Warm-Kalt-Zyklen wurde versucht eine evtl. auftretende hydrophobe Wechselwirkung der sticky-ends mit dem Doppelstrang aufzubrechen. Als Vergleichsprobe wurde die Kreuzstruktur aus den Probeansätzen (Probe aus Abb. 142, Spur 3) auf dasselbe Gel aufgetragen. Die Proben aus der Synthese im großen Maßstab („KgM“, Abb. 147, Spuren 3-5) zeigen unabhängig vom verwendeten Temperaturprogramm eine deutlich schlechtere Strukturbildung als der Probeansatz („KklM“, Abb. 147, Spur 2). Außerdem treten oberhalb der monomeren und dimeren Strukturen zusätzliche Banden auf. Obwohl der Probeansatz lediglich bei -20 °C gelagert wurde, hat sich die relative Intensität der obersten Bande im Vergleich zu Abb. 142 annähernd verdoppelt (37 % statt 21 %). Des Weiteren treten auch hier zusätzliche Banden oberhalb der dimeren Struktur auf, die in Abb. 142 nicht beobachtet wurden. Bei -20°C sollte die Probe unverändert bestehen bleiben. Eine Veränderung der relativen Intensität könnte prinzipiell durch Fehler in der Auswertung erklärt werden, die Änderung um einen Faktor zwei ist aber hierfür deutlich zu groß. Das plötzliche Auftreten von zusätzlichen Banden in dieser Probe ist nicht zu verstehen.

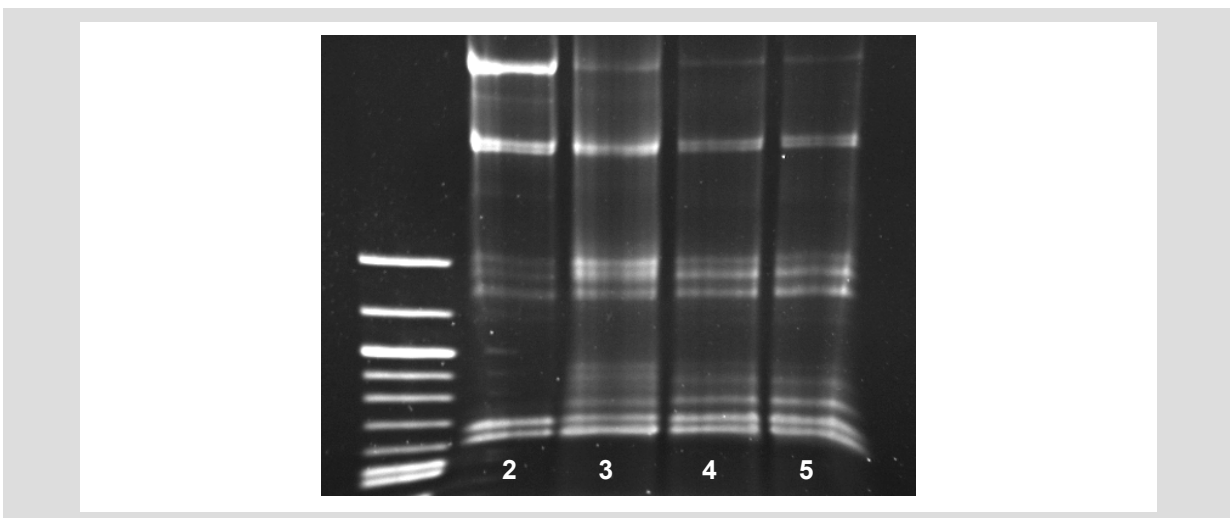


Abb. 147: Spur 1: 100 bp-Marker, Spur 2: Kreuzstruktur aus den Probeansätzen („KklM“, selbe Probe wie in Abb. 142, Spur 3), Spuren 3-5: Kreuzstrukturen aus der Synthese im großen Maßstab („KgM“), nach 2 h bei 37 °C, Hyb90.CYC bzw. nach 10 Zyklen zwischen 4 und 37 °C.

Bei der Verwendung eines Agarose Gels mit höherer Konzentration (1,7 % an Stelle von 1 %) wurde in den Proben von KgM eine Bande bei ca. 100 bp im Gel beobachtet, die in KklM nicht auftritt. Neben dem Synthesemaßstab unterscheiden sich die Proben in der Art der Aufarbeitung. Bei der Synthese im großen Maßstab wurde aufgrund des deutlich größeren Probenvolumens die Ultrafiltration (MWCO = 50 kDa) anstelle der Aufarbeitung über NucleoSpin eingesetzt. Die Banden bei ca. 100 bp liefern einen Hinweis auf eine unvollständige Abtrennung der Primer mittels Ultrafiltration. Da die Primer die Sequenzen der sticky-ends tragen, können diese mit den PCR-Produkten während der Hybridisierung in Konkurrenz treten und so die Bildung der Kreuzstruktur stören. Aufgrund der Molmasse der Primer von ca. 20 000 g/mol ist dieser Zusammenhang nicht unbedingt zu erwarten aber durchaus möglich.

Aufgrund der in Abb. 147 gezeigten Ergebnisse wurde zum einen versucht, die Hybridisierung der Kreuzstruktur aus den Probeansätzen (KklM) zu reproduzieren, zum anderen wurden jeweils 100 µl der vier PCR-Produkte aus der Synthese im großen Maßstab über NucleoSpin gereinigt, um eine vollständige Abtrennung der Primer zu erreichen. Als Vergleichsprobe wurde dieser Reinigungsschritt auch noch einmal mit den vier PCR-Produkten des Probeansatzes wiederholt. Durch die Aufreinigung der PCR-Produkte über NucleoSpin wird die Ausbeute der tetrameren Zielstruktur ein wenig verbessert, die Proben aus der Synthese im großen Maßstab zeigen aber immer noch eine bei weitem schlechtere Hybridisierungseffektivität (Abb. 148).

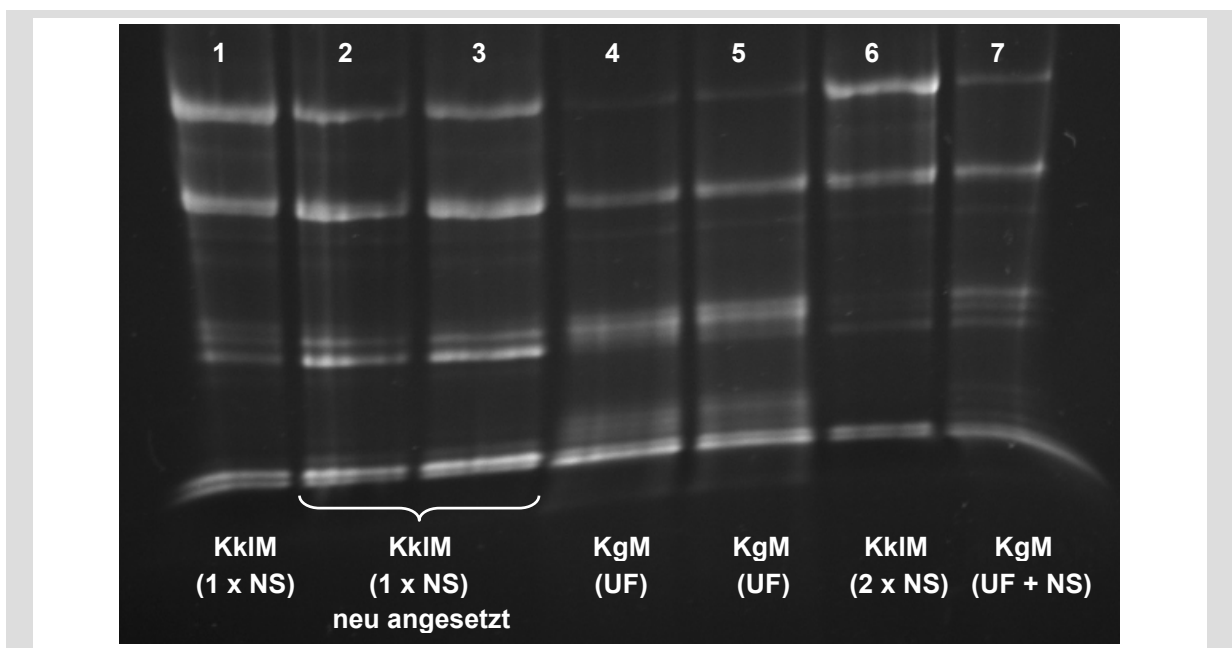


Abb. 148: Reproduzierbarkeit der Hybridisierung und Einfluss der Reinigungsmethode, 1 % Agarose: Spur 1: Probe von KklM aus Abb. 142 und Abb. 147, Spur 2 und 3: Kreuzstruktur KklM frisch angesetzt und erneut hybridisiert, Spur 4 und 5: Probe von KgM nach Reinigung über Ultrafiltration (UF), Spur 6: Probe von KklM nach zweifacher Reinigung über NucleoSpin (NS), Spur 7: Probe von KgM nach Reinigung über Ultrafiltration und NucleoSpin.

Die relativen Intensitäten der verschiedenen Kreuzstrukturen aus der Synthese im kleinen Maßstab sind in Tab. 11 zusammengefasst. Ein Vergleich der relativen Intensitäten der Proben KklM-1b mit KklM-1c (identische Proben in verschiedenen Gelen) bzw. KklM-2a mit KklM-2b (Identische Proben im gleichen Gel) zeigt, dass der Fehler der Auswertung bei diesen Gelen im Bereich von 3-5 % liegt. Die Ergebnisse der ersten Hybridisierung (KklM-1a, Probe aus Abb. 142, Spur 3) können nach einer erneuten Hybridisierung unter den gleichen Bedingungen nicht exakt reproduziert werden (KklM-2a/2b). Der Unterschied zwischen den Proben KklM-1a und KklM1b/1c liegt deutlich außerhalb des Fehlerbereichs. Die Probe hat also nach der Hybridisierung durch das erste Einfrieren und Auftauen einen anderen Zustand erreicht (KklM-1a vs. KklM-1b), der bei wiederholtem Einfrieren und Auftauen bestehen bleibt (KklM-1b vs. KklM-1c). Die wiederholte Aufreinigung über NucleoSpin (KklM-3) zeigt im Vergleich zu den parallel durchgeführten Hybridisierungen, bei denen keine wiederholte Aufreinigung durchgeführt wurde (KklM-2a/2b), einen deutlich größeren Anteil der tetrameren Struktur.

Tab. 11: Relative Intensitäten: Die Proben KklM-1a/1b/1c sind identisch, die Auswertung erfolgte aus verschiedenen Gelen. KklM-1a wurde direkt nach der Hybridisierung aufgetragen. Nach einer Lagerung bei -20°C wurde diese Probe in zwei verschiedenen Gelen als Vergleichsprobe genutzt (KklM-1b/1c). Dieselben PCR-Produkte wie in KklM-1a/1b/1c wurden erneut angesetzt und unter denselben Bedingungen wie zuvor hybridisiert (KklM-2a/2b). KklM-2a/2b sind identisch, hier wurden zwei Aliquots derselben Probe auf dasselbe Gel aufgetragen. Für die Bildung von KklM-3 wurden die PCR-Produkte aus KklM-1a/1b/1c noch einmal über NucleoSpin gereinigt und anschließend hybridisiert.

	Identische Proben in verschiedenen Gelen			Identische Proben im gleichen Gel		Gleiche Probe, 2 x NucleoSpin
Probe	KklM-1a	KklM-1b	KklM-1c	KklM-2a	KklM-2b	KklM-3
Tetramer	21 %	37 %	33 %	16 %	13 %	43 %
Trimer	34 %	25 %	25 %	26 %	26 %	25 %
Dimer	28 %	10 %	15 %	27 %	27 %	8 %
Monomer	18 %	28 %	27 %	31 %	34 %	24 %

Zur Klärung der Ursache für die extrem schlechte Hybridisierungseffektivität bei den PCR-Produkten aus der Synthese im großen Maßstab wurden, in analoger Weise zu den Experimenten mit oligomeren Kreuzstrukturen, alle möglichen Unterstrukturen parallel angesetzt und hybridisiert (Abb. 149). Hier zeigt sich, dass die Banden kurz oberhalb der Monomere nur in den Mischungen von PCR-Produkten mit komplementären überhängenden Enden auftritt. Das gleiche Phänomen wird auch auf Höhe der Dimeren beobachtet. In den Mischungen von zwei komplementären PCR-Produkten zeigt sich nur eine scharfe

Dimerbande. Durch die Zugabe eines weiteren komplementären PCR-Produktes kommt eine weitere Bande mit etwas geringerer Mobilität hinzu. Und auch die Trimerbande reagiert auf die Zugabe des vierten PCR-Produktes. In der vollständigen Mischung ist diese Bande etwas nach oben verschoben. Eine Aufspaltung in mehrere Banden ist aufgrund der schlechteren Auflösung des Gels in diesem Bereich nicht mehr erkennbar. Diese Ergebnisse sprechen für eine Verunreinigung der PCR-Produkte mit einer „niedermolekularen“ Verbindung, die das gleiche sticky-end wie das jeweilige PCR-Produkt trägt.

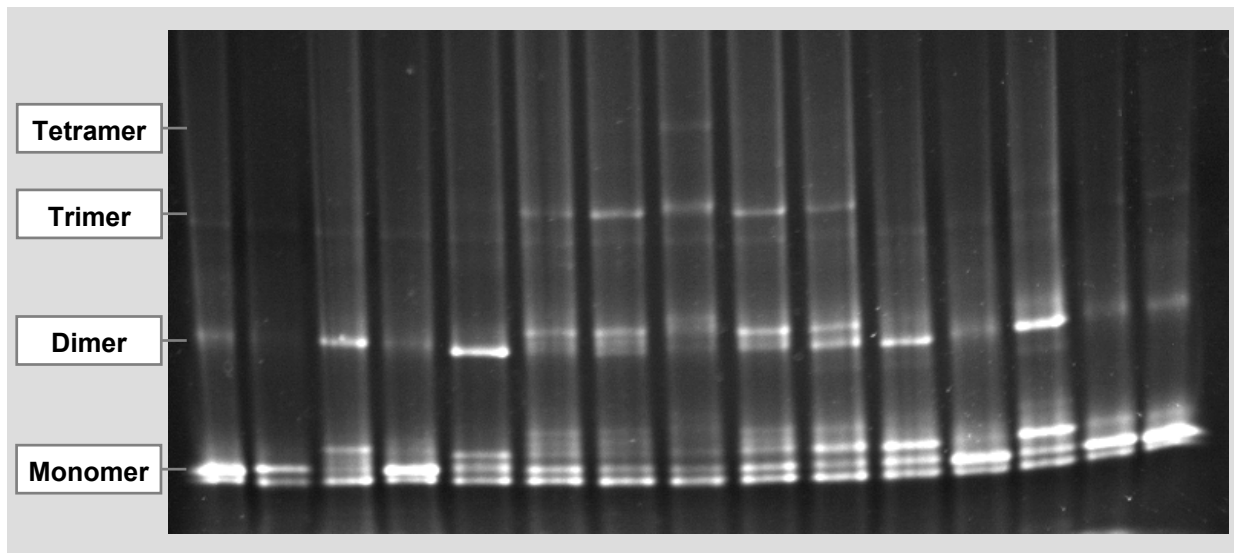


Abb. 149: Unterstrukturen aus verschiedenen Mischung der PCR-Produkte grM1-grM4: grM1, grM2, grM1+2, grM1+3, grM1+4, grM1+2+3, grM1+2+4, grM1+2+3+4, grM1+3+4, grM2+3+4, grM2+3, grM2+4, grM3+4, grM3, grM4.

Ob die Banden kurz oberhalb des PCR-Produkts in den Dimermischungen tatsächlich auf eine Hybridisierung mit dem entsprechenden Primer zurückzuführen ist, kann durch ein einfaches Experiment geklärt werden. Hierfür wurden zwei einzelne PCR-Produkte mit jeweils 2 Äq. des Primers versetzt, der die entsprechende komplementäre sticky-end-Sequenz trägt. Außerdem wurde eine Dimermischung dieser PCR-Produkte mit jeweils 2 Äq. der beiden Primer versetzt. Nach erfolgter Hybridisierung sollte ein Vergleich mit der Dimermischung ohne zugesetzte Primer zeigen, ob in den verschiedenen Ansätzen Banden mit gleicher Mobilität auftreten. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abb. 150 gezeigt.

Die Verschiebung der Monomerbanden aufgrund der Hybridisierung mit dem komplementären Primer ist in beiden Fällen gut zu erkennen (Spuren 2 und 3). Die elektrophoretische Mobilität stimmt aber nicht mit der entsprechenden Bande in den Dimermischungen ohne zugesetzte Primer überein (Spuren 1 und 5). Eine Hybridisierung mit nicht abgetrennten Primern kommt daher als Erklärung für die zusätzlichen Banden nicht in Frage. Interessanterweise wird die Dimerisierung der komplementären PCR-Produkte durch die Zugabe der Primer vollständig unterdrückt (Spur 4).

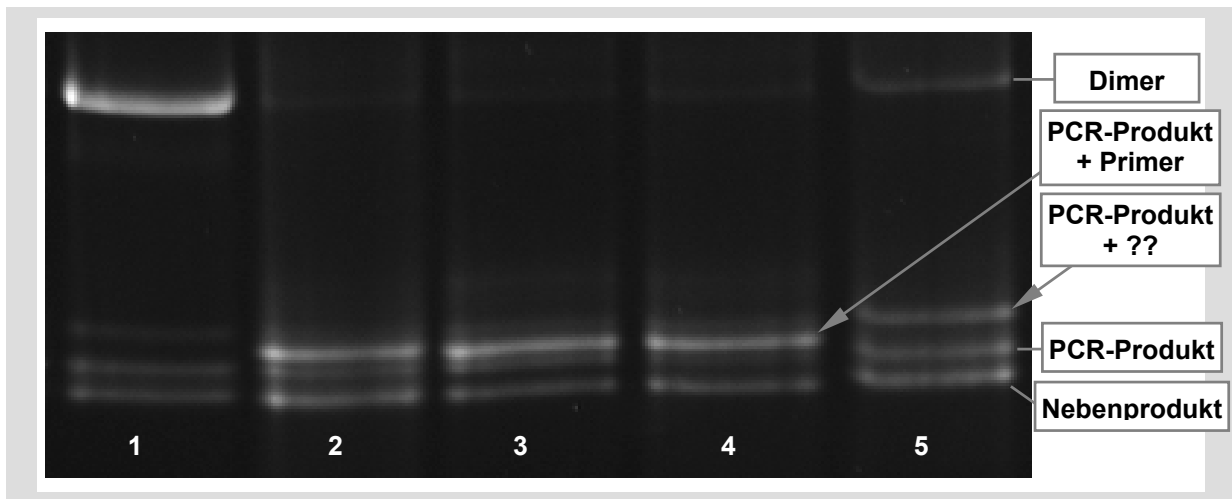


Abb. 150: Spur 1: Dimermischung ohne Primer (klM2+klM3), Spuren 2 u. 3: Mischungen der einzelnen PCR-Produkte mit den entsprechenden komplementären Primern, Spur 4: Mischung von zwei komplementären PCR-Produkten mit den beiden Primern, die zur Einführung der überstehenden Enden verwendet wurden, Spur 5: Dimermischung ohne Primer (grM2+grM3).

Die Bande kurz oberhalb des PCR-Produkts kann also nicht durch die Anlagerung eines komplementären Primers erklärt werden. Ein weiteres, ganz ähnliches Experiment, zeigt aber deutlich, dass diese Bande auf dem gleichen „Hybridisierungsmuster“ wie die erwünschten Kreuzstrukturen basieren muss. In diesem Fall wurde eine Dimermischung der PCR-Produkte, mit den sticky-end-Sequenzen von PK33 und PK34, mit einem zwanzigfachen Überschuss der Primern PK31 und PK32 versetzt. Die Hybridisierung von einem einzelnen PCR-Produkt mit einem komplementären Primer führt zu einer Bande kurz oberhalb des PCR-Produktes, wie sie nach der Zugabe von PK32 zu sehen ist (zwischen den Banden 2 und 3 in Abb. 151, Spur 3). Sowohl die Zugabe von PK31, als auch die Zugabe von PK32 führt zu einer Retardation der Bande 3 in der Dimermischung. Da PK31 nur mit PK34 hybridisieren kann und PK32 nur mit PK33 muss die Bande 3 in der Dimermischung sowohl die sticky-end-Sequenz von PK34, als auch die von PK33 enthalten. Die Verbindung in Bande 3 ist außerdem größer als ein einzelnes PCR-Produkt, aber deutlich kleiner als das entsprechende Dimer aus beiden PCR-Produkten der Dimermischung. Bei der Bande 3 der Dimermischung muss es sich also um eine Verbindung handeln, die aus einem PCR-Produkt und einem kleineren Fragment besteht, welches das komplementäre sticky-end trägt. Das kleine Fragment muss jedoch etwas größer

sein als ein Primer (ca. 50-100 bp). Die Zugabe von beiden Primern führt zu einer weiteren Bande mit noch geringerer Mobilität. (Aufgrund der schlechten Auflösung im linken Gel ist diese Probe in Abb. 151 zweimal gezeigt.) Hier wird eine Kreuzstruktur gebildet, an der ein PCR-Produkt, zwei Primer und eine zusätzliche Verbindung mit einer Größe zwischen 50 und 100 bp beteiligt sind.

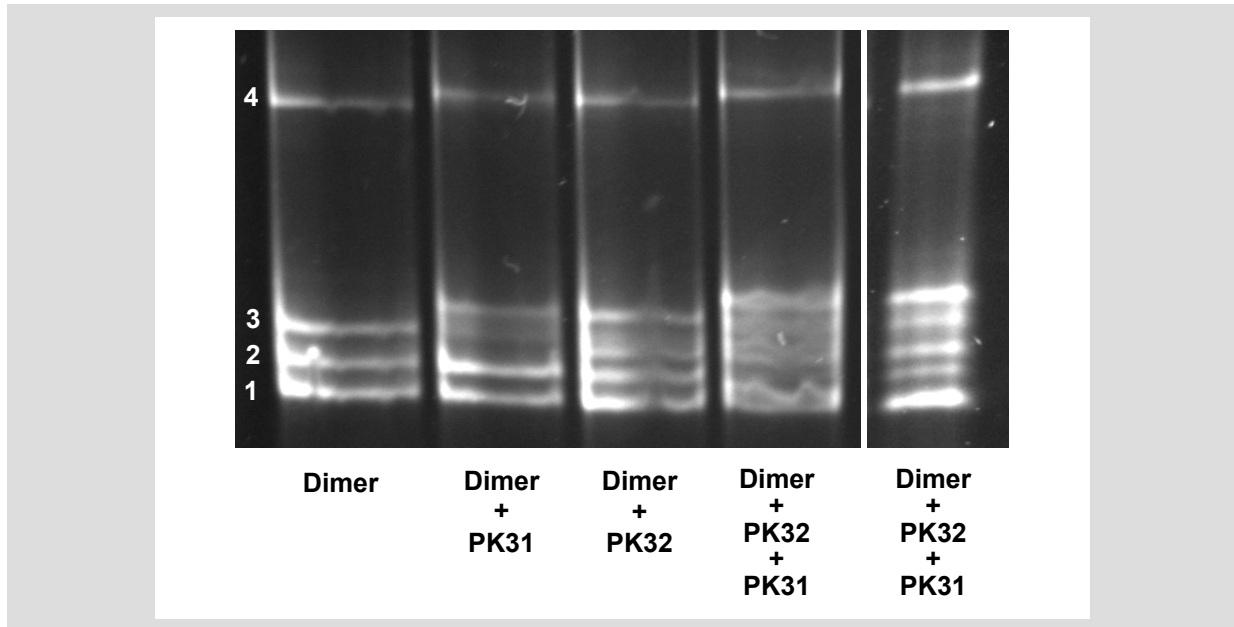


Abb. 151: Hybridisierungsversuche einer Dimermischung mit zwei verschiedenen Primern, 1 % Agarose: Die Dimermischung wurde aus den PCR-Produkten mit den sticky-end-Sequenzen von PK33 und PK34 hergestellt. Diese Mischung wurde mit einem zwanzigfachen Überschuss der Primer PK31, bzw. PK32 versetzt. Die Verschiebung der Bande 3 in der Dimermischung durch die Zugabe der verschiedenen Primer zeigt, dass die Bande 3 im Dimer die sticky-end-Sequenzen von PK33 und PK34 enthalten muss.

Entsprechende Nebenprodukte im Bereich von 50-100 bp konnten in der nativen PAGE des PCR-Produktes mit der sticky-end-Sequenz PK33 nachgewiesen werden. Hier treten zwei relativ breite Banden bei 70 bzw. 90 bp auf. Das sticky-end von 46 b führt in der nativen PAGE zu einer Verschiebung von ca. 50 bp*. Wenn die beiden Nebenprodukte im Bereich von 70 bzw. 90 bp jeweils ein sticky-end von 46 Basen tragen, sollten diese Verbindungen Doppelstrangabschnitte von ca. 20 bzw. 40 bp enthalten. Diese Größen fallen genau in den Bereich, in dem man Primer-Dimere erwarten würde [103, 188].

3.6.3.3 Optimierte Aufarbeitung der PCR-Produkte

Es wurden verschiedene Experimenten durchgeführt, um die „niedermolekularen“ Nebenprodukte abzutrennen oder ihre Entstehung von vornherein zu vermeiden. Bei den in Abb. 152 gezeigten Proben wurde zum einen die Inkubationszeit der beiden Primer bei RT in Anwesenheit der Polymerase variiert, zum anderen wurden zwei unterschiedliche

* Der Einfluss der sticky-ends kann aus dem Vergleich der Proben C1 (31 bp) und B1 (80 bp) mit der Probe C3 (31 bp + 46 b sticky-end) abgeschätzt werden (vgl. Abschnitt 3.5.1).

Reinigungsmethoden verwendet. Die Inkubation der beiden Primer in Anwesenheit der Polymerase kann schon vor Beginn der PCR zur Bildung von kleinen Mengen des Primer-Dimers führen. Diese werden dann im PCR-Zyklus exponentiell vervielfältigt. Bei acht Proben wurden beide Primer dem Mastermix zugesetzt (P1A-P4A bzw. P1N-P4N), bei acht weiteren Proben (L1A-L4A bzw. L1N-L4N) wurde der zweite Primer erst direkt vor Beginn der PCR zugegeben. Die Aufarbeitung der PCR-Lösungen erfolgte bei den Proben P1A-P4 bzw. L1A-L4A über Ultrafiltration (AmiconUltra, MWCO = 50 kDa), die Proben P1N-P4N bzw. L1N-L4N wurden durch Adsorption auf Silika (NucleoSpin Extrakt II) gereinigt. Als Vergleich wurden die PCR-Produkte aus den Probeansätzen (klM1-klM4, ein Primer im Mastermix, Reinigung über NucleoSpin) und aus der Synthese im großen Maßstab (grM1-grM4, beide Primer im Mastermix, Reinigung über Ultrafiltration) auf dasselbe Gel aufgetragen. Weder die unterschiedlichen Inkubationszeiten der Primer (vgl. P1N-P4N mit L1N-L4N) noch die verschiedenen Aufarbeitungsmethoden (vgl. P1A-P4A mit klM1-klM4) zeigen einen systematischen Zusammenhang mit dem Anteil des Nebenprodukts bei ca. 100 bp.

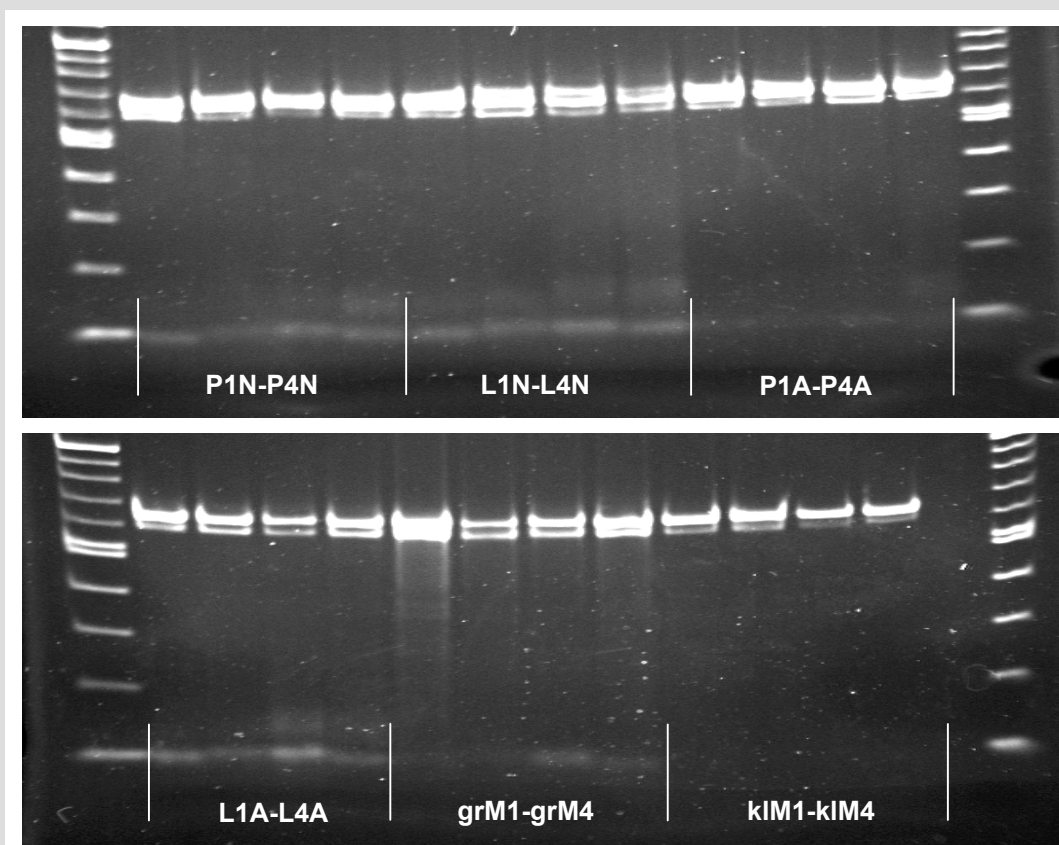


Abb. 152: Einfluss der Primer und der Reinigungsmethode auf den Anteil der „niedermolekularen“ Nebenprodukte mit etwa 100 bp. Bei den Proben P1N-P4N, P1A-P4A und grM1-grM4 waren beide Primer im Mastermix enthalten. Die Proben L1N-L4N, L1A-L4A und klM1-klM4 wurden erst direkt vor der PCR mit dem zweiten Primer versetzt. Die Aufarbeitung von P1N-P4N, L1N-L4N und klM1-klM4 erfolgte über NucleoSpin Extrakt II, bei P1A-P4A, L1A-L4A und grM1-grM4 wurde die Ultrafiltration (AmiconUltra, MWCO = 50 kDa) verwendet. Die Menge des gebildeten Nebenprodukts bei ca. 100 bp zeigt keine systematische Abhängigkeit von den gewählten Versuchsbedingungen.

Die Effektivität der Hybridisierung bei der Bildung der Kreuzstruktur zeigt eine gewisse Abhängigkeit von der Menge des Nebenproduktes. Die PCR-Produkte mit dem geringsten Anteil an Verunreinigungen (klM1-klM4 und P1A-P4A) zeigen die beste Hybridisierungseffektivität (KklM: 31 % Tetramer, KPA: 11 % Tetramer, vgl. Abb. 153). Die Unterschiede zwischen den Anteilen der gebildeten Kreuzstrukturen scheinen aber im Vergleich mit Abb. 152 zu groß zu sein. Im Gegenteil hierzu würde man aufgrund der Ergebnisse aus Abb. 152 einen größeren Unterschied zwischen den Proben KPA (PCR-Produkte P1A-P4A: 11 % Tetramer) und KPN (PCR-Produkte P1N-P4N 6 % Tetramer) erwarten.

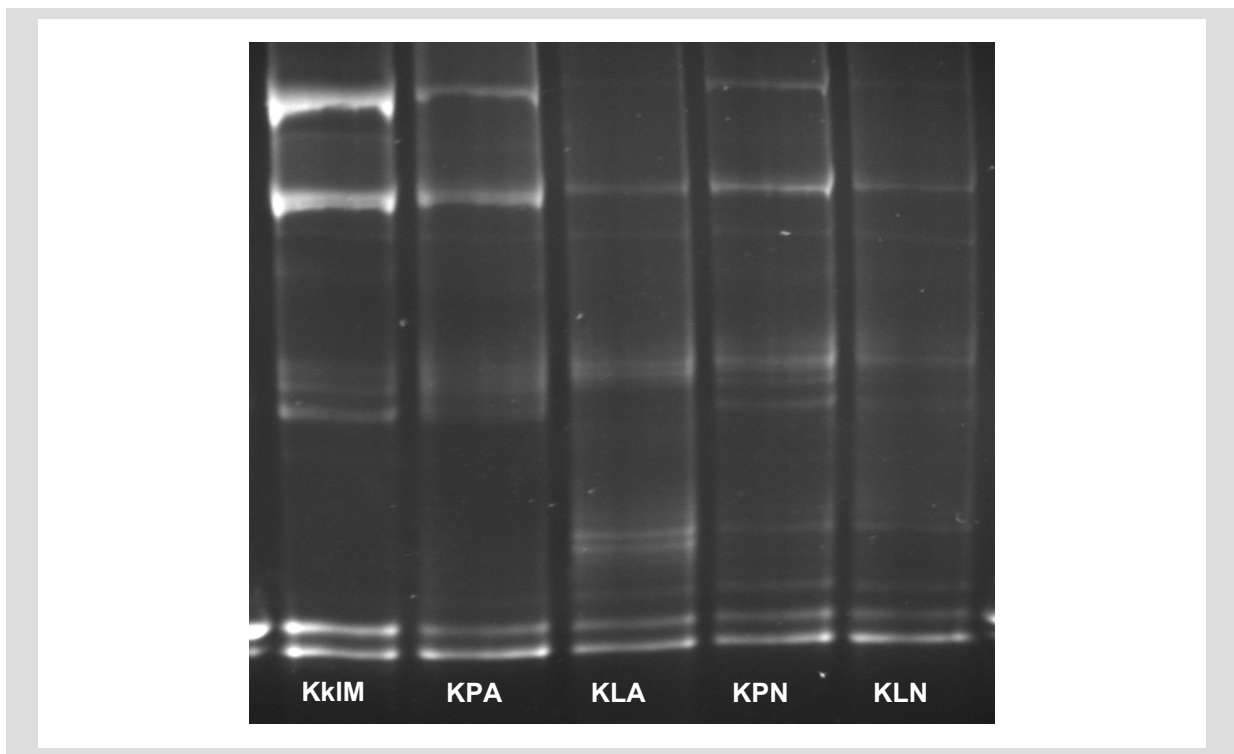


Abb. 153: Auswirkung der Menge des Nebenproduktes auf die Bildung der Kreuzstruktur: Die gezeigten Proben wurden durch die Hybridisierung der PCR-Produkte klM1-klM4 (KklM), P1A-P4A (KPA), L1A-L4A (KLA), P1N-P4N (KPN) bzw. L1N-L4N (KLN) erzeugt.

Eine weitere Möglichkeit, die zu einer verbesserten Abtrennung der Nebenprodukte bei ca. 100 bp führen sollte, ist die Verwendung von Ultrafiltrationseinheiten mit einem höheren „cut-off“. Aufarbeitungsversuche mit Ultrafiltrationseinheiten mit einem MWCO von 100 kDa führten jedoch zu sehr schlechten Ausbeuten. Hier können nur 3-30 % der aufgereinigten PCR-Produkte zurückgewonnen werden. Bei der Aufarbeitung über NucleoSpin Extrakt II nach dem Standardprotokoll werden laut Herstellerangaben alle DNA-Fragmente, die kleiner sind als 65 bp, vollständig abgetrennt. Dieser „cut-off“ der Silikamembran kann durch die Zusammensetzung des Ladepuffers verschoben werden. Eine Verdünnung des Ladepuffers mit Wasser führt zu einer Verschiebung zu höheren Molmassen. Die Vorgehensweise wurde an

zwei verschiedenen Mischungen des Ladepuffers ($v/v = 1/5$ bzw. $1/7$) mit zwei verschiedenen PCR-Produkten getestet. In den einzelnen PCR-Produkten kann man erkennen, dass die Mischung von $1/7$ zu einer Verschiebung des „cut-offs“ bis kurz unterhalb des PCR-Produktes führt (Abb. 154, links). Man sollte daher sicher davon ausgehen können, dass alle „niedermolekularen“ Verunreinigungen abgetrennt wurden. In den Dimermischungen, der so gereinigten Proben, ist die relative Intensität der zusätzlichen Bande direkt oberhalb der Monomere deutlich kleiner (Abb. 154, rechts). Die Dimerisierung ist aber trotzdem deutlich weniger effektiv als bei den PCR-Produkten aus den Probeansätzen (kIM2 + kIM3).

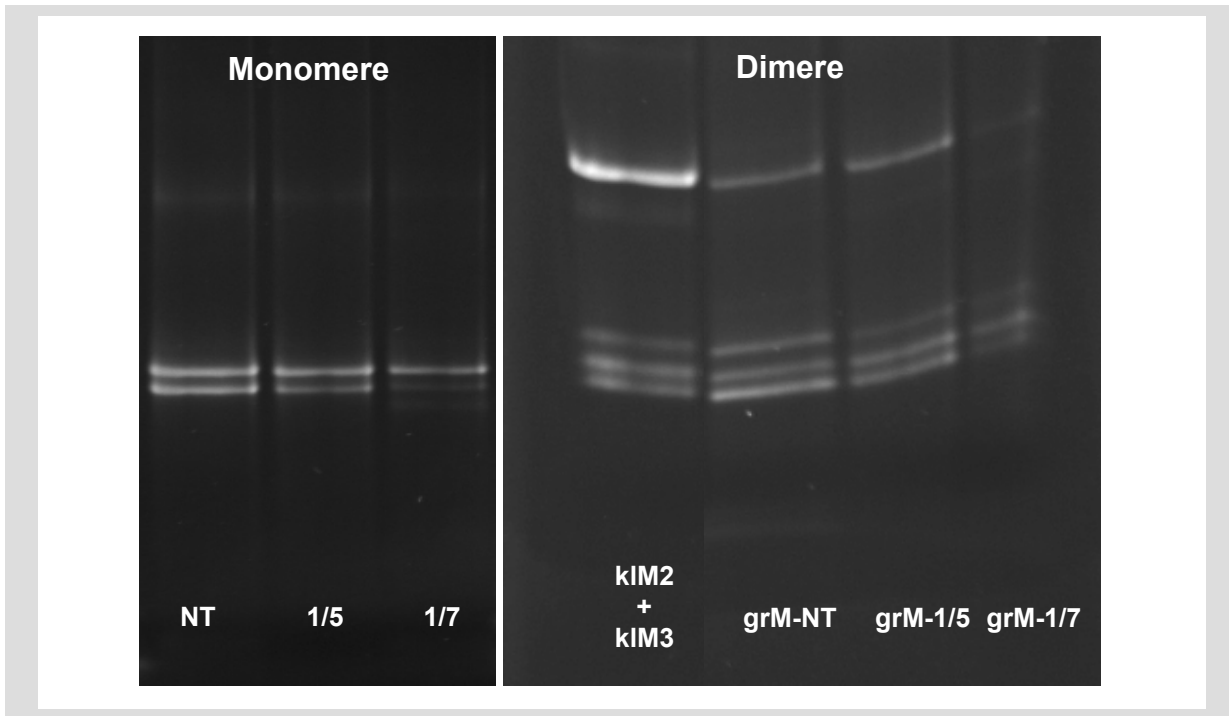


Abb. 154: Monomere und Dimere nach der Reinigung über NucleoSpin, bei verschiedenen Verdünnungen des Ladepuffers. Links: PCR-Produkte nach der Aufarbeitung mit unverdünntem Ladepuffer (Puffer NT) bzw. mit Mischungen von $1/5$ und $1/7$ (v/v). Der „cut-off“ der Methode wird durch die Verdünnung bis kurz unterhalb der PCR-Produktbande verschoben. Rechts: Dimerisierungsversuche mit PCR-Produkten aus den Probeansätzen, die nach dem Standardprotokoll über NucleoSpin gereinigt wurden (kIM2 + kIM3) bzw. mit PCR-Produkten aus der Synthese im großen Maßstab, die mit reinem Puffer-NT (grM-NT) bzw. mit den verschiedenen Verdünnungen (grM-1/5 bzw. grM-1/7) aufgearbeitet wurden.

In einem weiteren Experiment wurde getestet, ob eine mehrfache Reinigung der einzelnen PCR-Produkte über NucleoSpin zu einem sauberen Produkt führt. Hierzu wurden jeweils $100\ \mu\text{l}$ von jedem der vier PCR-Produkte (grM1-grM4) einmal, zweimal bzw. dreimal hintereinander über NucleoSpin, gemäß dem Standardprotokoll, gereinigt. Die Proben zeigen einen deutlichen Trend. Mit jeder Wiederholung der Aufarbeitung wird die Intensität der Banden kurz oberhalb der monomeren bzw. dimeren Strukturen kleiner. Nach der dritten Wiederholung sind auf Höhe der dimeren, trimeren und tetrameren Strukturen nur noch einzelne scharfe Banden zu sehen. Es kann aber kein positiver Einfluss auf die Ausbeute der vollständigen Zielstruktur festgestellt werden (Abb. 155). In allen Proben werden lediglich

5-10 % des Tetramers gebildet. Das gleiche gilt für die Aufarbeitung der PCR-Produkte über eine selektive Fällung mit Hilfe eines Fällungszusatzes (Roti®-PCR Clean, Roth). In Abb. 155 ist außerdem eine Probe aufgetragen, bei der die PCR-Produkte zunächst über Ultrafiltration und anschließend über NucleoSpin gereinigt wurde. Hier ist der Einfluss des PCR-Puffers auf die Effektivität der Aufarbeitung mittels NucleoSpin zu erkennen. Der verwendete ThermoPol-Puffer enthält ein Tensid, welches den „cut-off“ bei der Aufarbeitung über NucleoSpin zu höheren Molmassen verschiebt [189]. Dieses Tensid wird in der Ultrafiltration abgetrennt. Eine anschließende Aufarbeitung über NucleoSpin führt daher zu einer schlechteren Abtrennung der relativ großen Primer-Dimere.

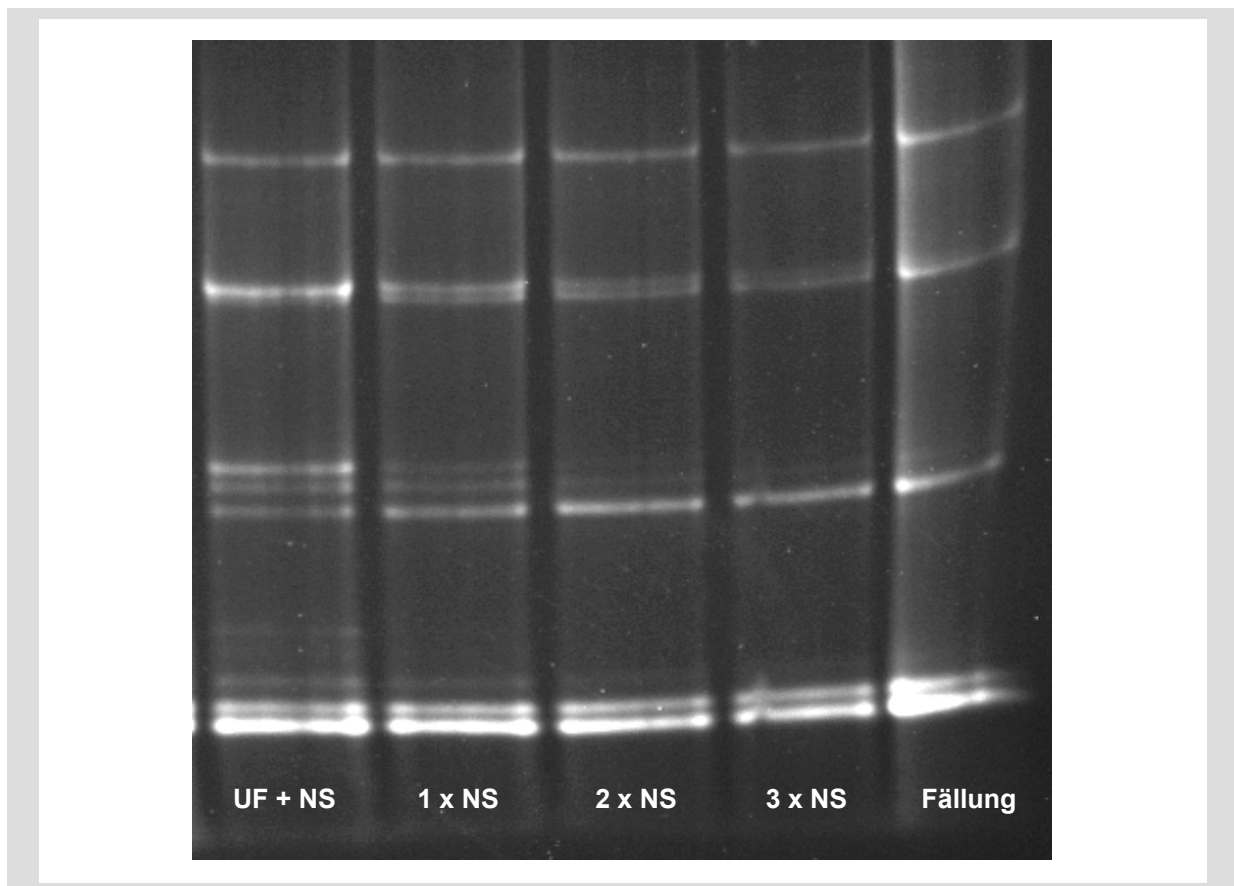


Abb. 155: Optimierung der Aufarbeitung: Ganz links ist eine Probe zu sehen, bei der die einzelnen PCR-Produkte zunächst über Ultrafiltration (UF) und anschließend über NucleoSpin (NS) gereinigt wurden. Die mehrfache Aufarbeitung der gleichen Proben über NucleoSpin (1xNS, 2xNS, 3xNS) führt zu sauberen Banden, die Ausbeute der vollständigen Kreuzstruktur bleibt aber weitgehend unverändert. Das gleiche gilt für die Aufarbeitung der PCR-Produkte durch eine selektive Fällung mit Hilfe eines Fällungszusatzes (Roti®-PCR Clean).

Die Primer-Dimere können offenbar durch eine wiederholte Aufarbeitung über NucleoSpin oder durch die selektive Fällung mit Roti®-PCR Clean annähernd quantitativ abgetrennt werden. Die Bildung der Kreuzstruktur ist bei diesen Proben aber immer noch deutlich schlechter als im Probeansatz mit kIM1-kIM4. Damit zusätzlich alle störenden Einflüsse des Nebenproduktes kurz unterhalb der Monomerbande ausgeschlossen werden können, wurden alle vier PCR-Produkte über eine präparative Gelelektrophorese gereinigt (vertikales Gel, 180 x

130 x 3 mm) und mit NucleoSpin aus der Agarosematrix zurückgewonnen. Bei Proben die über NucleoSpin gereinigt wurden tritt in manchen Fällen eine Störung in den UV-Spektren auf, die durch Pufferreste verursacht wird. Dadurch kann ein Fehler in der Konzentrationsbestimmung der PCR-Produkte verursacht werden. Um einer ungenauen Einstellung der Stöchiometrie vorzubeugen, wurden fünf verschiedene Mischungen für die Hybridisierung angesetzt. Eine dieser Mischungen sollte die PCR-Produkte im stöchiometrischen Verhältnis enthalten. In den anderen Ansätzen wurde von jeweils einem der vier PCR-Produkte ein Überschuss von 10 % zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 2,5 h bei 37 °C zeigen alle fünf Ansätze das gleiche Bandenverhältnis (Abb. 156). Unabhängig von der Stöchiometrie werden nur 10-13 % der tetrameren Struktur gebildet. Die Verlängerung der Inkubationszeit auf 17 h führt in der stöchiometrischen Mischung zur Bildung von 23 % der vollständigen Kreuzstruktur (Abb. 156, Spur 6). Eine weitere Verlängerung der Inkubationszeit auf 3 d hat keinen Einfluss mehr auf die Probe (Abb. 156, Spur 7).

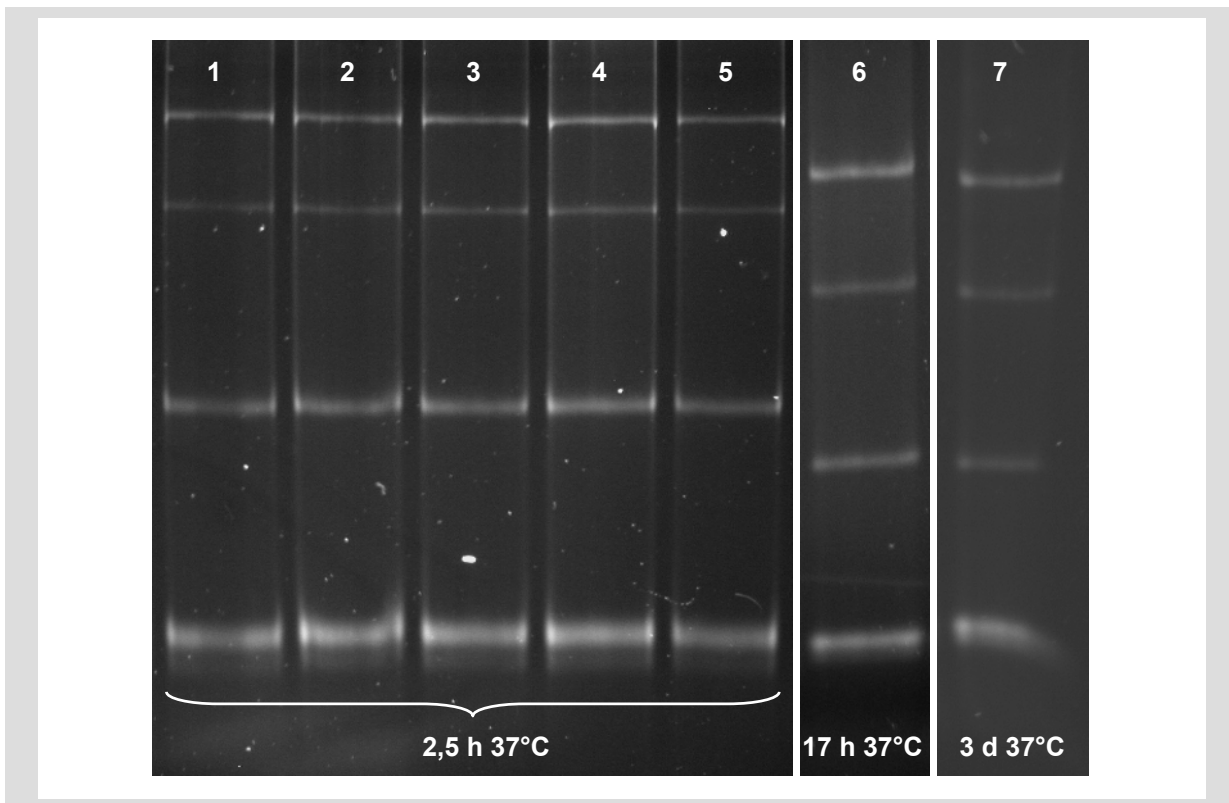


Abb. 156: Hybridisierung nach der Reinigung der PCR-Produkte über präparative Gelelektrophorese. Spur 1: Stöchiometrische Mischung nach 2,5 h bei 37 °C, Spuren 2-5: Mischungen mit 10 % Überschuss an Arm 1, 2, 3 bzw. Arm 4 nach 2,5 h bei 37 °C, Spur 6 u. 7: Stöchiometrische Mischung nach 17 h bzw. 3 d bei 37 °C.

Die Ergebnisse der Hybridisierung mit PCR-Produkten, die über die Gelelektrophorese gereinigt wurden, sind weitgehend identisch mit den Ergebnissen nach der mehrfachen Reinigung über NucleoSpin oder der selektive Fällung mit Roti[®]-PCR Clean. Der höhere Wert für den Anteil der vollständigen Kreuzstruktur wird in erster Linie dadurch verursacht, das in

Abb. 155 das Nebenprodukt kurz unterhalb der Monomerbande mit in die Auswertung eingeht. Die Banden der vier auftretenden Strukturen sind klar definiert, es treten keine weiteren Nebenprodukte mehr auf. Aus diesem Grund ist es absolut nicht zu verstehen, warum hier nur gut 20 % der PCR-Produkte an der Bildung der Kreuzstruktur beteiligt sind, während im Probeansatz 30-40 % der Zielstruktur gebildet wurden.

3.6.3.4 Präparative Trennung der Kreuzstruktur von Nebenprodukten

Eine präparative Abtrennung der vollständige Kreuzstruktur sollte prinzipiell mit Hilfe der CEE (Continuous Elution Electrophoresis, Prep Cell Model 491, BioRad) durchführbar sein. Zur Optimierung der Methode wurden Probeläufe durchgeführt, in denen versucht wurde die verschiedenen Konformeren eines pUC19-Plasmids zu trennen. Die Banden der supercoiled bzw. circular relaxed DNA zeigen elektrophoretische Mobilitäten, die mit der trimeren bzw. tetrameren Struktur vergleichbar sind. Die Trennung dieser Konformere bereitet in analytischen Agarosegelen (Standard Agarose, Sigma-Aldrich) keine Probleme. Bei Verwendung der gleichen Gelmatrix in der CEE ist die Trennleistung jedoch nicht ausreichend (Abb. 157). Durch das Auftragen von kleineren Probenmengen, eine Vergrößerung der Laufstrecke oder die Verwendung von verdünnten Acrylamidgelen sollte eine Optimierung der Methode möglich sein.

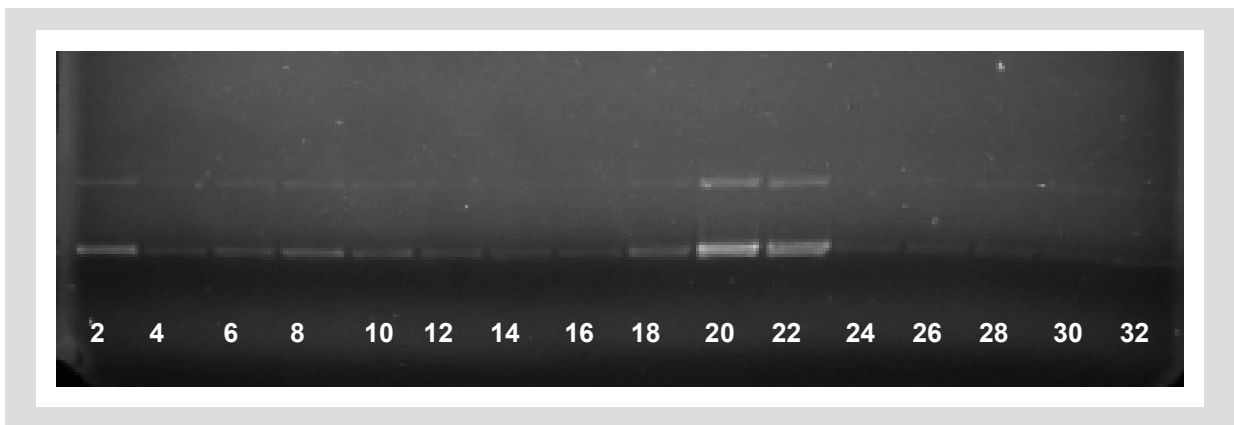


Abb. 157: Analytisches Agarosegel der Fraktionen 2-32 aus der CEE: 100 µl einer Lösung des pUC19 Plasmids (5 mg/ml) wurden mit 30 µl Ladepuffer versetzt und auf eine 4 cm hohe Gelsäule aufgebracht (Trenngel: 3 cm, 1 % Agarose, Sammelgel: 1 cm, 0,25 % Agarose, Elutionspuffer: 0,5 ml/min). Es wurden Fraktionen von jeweils 2 ml gesammelt. Von jeder 2. Fraktion wurden 35 µl auf das horizontale Agarosegel (1 % Standardagarose) aufgetragen.

Eine weitere Trennmethode, die für die Isolierung der Kreuzstruktur genutzt werden kann, ist die präparative Ultrazentrifugation im Saccharosegradienten. Für die Aufarbeitung der Kreuzstruktur aus den Probeansätzen (Abb. 142, Spur 3) wurde ein linearer Gradient von 5-30 % Saccharose eingesetzt ($V_{\text{ges.}} = 2 \text{ ml}$). Jeweils 50 µl Probenlösung (1,7 µg DNA) wurden auf den Gradienten aufgetragen und bei 55 000 rpm (259 000 x g, 4 °C) zentrifugiert. Nach 4 h

wurde eine Probe entnommen und mit Hilfe einer Pipette in 20 Fraktionen von je 100 μ l aufgeteilt. Von jeder 2. Fraktion wurden 9 μ l auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen. In allen Fraktionen treten zusätzliche Banden kurz unterhalb der trimeren Struktur und auf Höhe des Tetramers auf. Diese sind auf Verunreinigungen im Ladepuffer zurückzuführen, mit dem die Proben vor der Gelelektrophorese versetzt wurden (Abb. 158). Die Trennung ist noch nicht vollständig, die Hauptanteile der unterschiedlichen Strukturen sind aber bereits in verschiedenen Fraktionen zu finden.

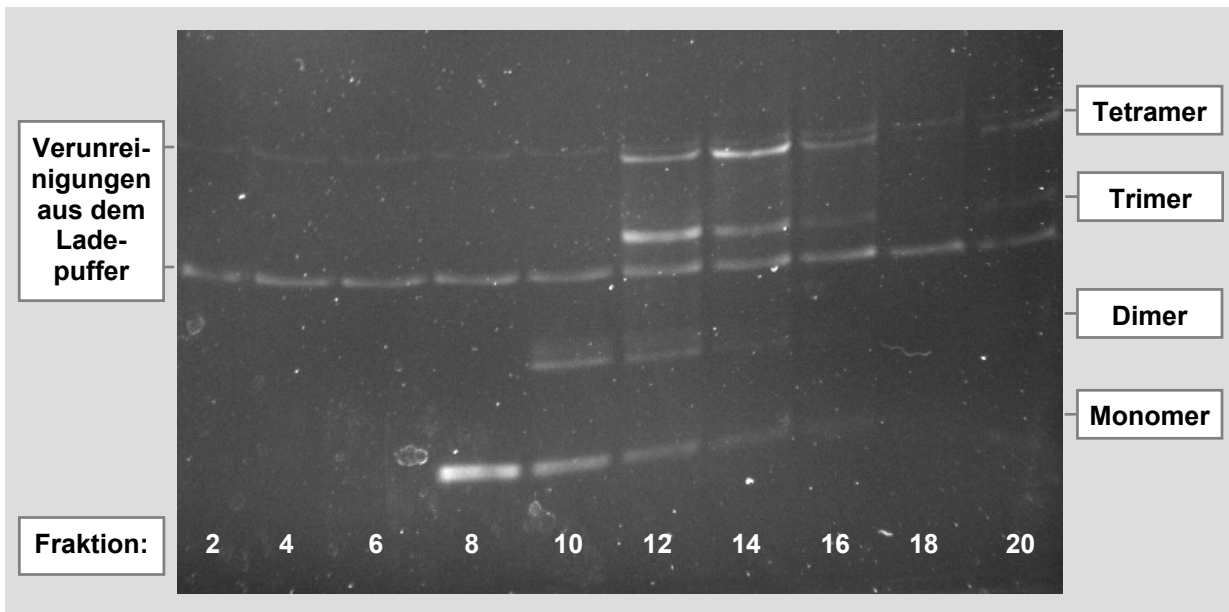


Abb. 158: Analytisches Agarosegel der Fraktionen 2-20 aus der präparativen Ultrazentrifugation im linearen Saccharosegradienten. Die Trennung ist noch nicht vollständig, die Hauptanteile der trimeren und tetrameren Strukturen sind aber bereits in verschiedenen Fraktionen zu finden.

Durch eine Verlängerung der Zentrifugationszeit auf 6 h konnte die Trennleistung nicht mehr verbessert werden. Hier haben die beiden größten Strukturen bereits den Boden des Zentrifugenröhrchens erreicht. Prinzipiell sollte auch bei dieser Methode eine Optimierung durch eine Vergrößerung der Trennstrecke möglich sein. Eine andere Alternative wäre die Verwendung von CsCl-Gradienten an Stelle von Saccharose.

3.6.4 Zusammenfassung und Ausblick

Ausgehend von der oligomeren Struktur J1 wurden verschiedene Kreuzstrukturen mit überstehenden Enden erzeugt. Obwohl die Sequenzen von J1 lediglich am 3'-Ende verlängert wurden, tritt durch die Einführung der sticky-ends eine deutliche Destabilisierung auf. Durch eine Verlängerung der Doppelstranganteile der vier Arme von jeweils 8 auf je 23 bp konnte eine stabile verzweigte Struktur mit überstehenden Enden erzeugt werden. Der destabilisierende Einfluss der überstehenden Enden wird nur noch in den Mischungen von drei Oligonukleotiden beobachtet. Die Sequenzanalyse der verwendeten Oligonukleotide zeigt

keinerlei Hinweise auf die Bildung von stabilen Sekundärstrukturen, die mit der erwünschten Zielstruktur in Konkurrenz treten könnten. Die Untersuchungen an linearen Modellsystemen mit unterschiedlich langen überstehenden Enden lieferten Hinweise darauf, dass die Destabilisierung durch sticky-ends nicht nur in verzweigten Systemen auftritt. Die Ursache für diesen Effekt konnte aber noch nicht geklärt werden.

Die modifizierte Kreuzstruktur aus vier Armen mit jeweils 23 bp und 3'-überhängenden Enden von 25 Basen wurde mit einem PCR-Produkt aus der USER-Reaktion kombiniert. Die erfolgreiche Strukturbildung konnte im AFM nachgewiesen werden. In Unterschied zu dem entsprechenden oligomeren System K3 ist die Bildung der Kreuzstruktur nicht mehr quantitativ. Durch den Aufbau der Struktur kann allerdings nicht unterschieden werden, ob die unvollständige Strukturbildung auf eine Störung der oligomeren Kreuzung oder auf einer unvollständigen Hybridisierung der PCR-Produkte mit den Oligonukleotiden beruht.

Für die Synthese einer Kreuzstruktur mit rund 200 nm langen Armen im Milligrammmaßstab wurden die Sequenzen der oligomeren Verbindung K2 mit Hilfe von PEG-modifizierten Primern in PCR-Produkte eingeführt. Die überstehenden Enden der vier erzeugten PCR-Produkte entsprechen dadurch exakt den Oligonukleotiden von K2. Trotzdem ist auch hier die Strukturbildung deutlich weniger effektiv als im oligomeren System mit identischen Sequenzen. Die Verwendung der ungewöhnlich großen Primer mit einer Gesamtlänge von 63 Basen führte zu Problemen bei der Aufarbeitung, die durch wiederholte Reinigung über NucleoSpin oder durch eine selektive Fällung bewältigt werden konnten. Um alle störenden Einflüsse ausschließen zu können, die durch Nebenprodukte oder eine unvollständige Abtrennung der Primer verursacht werden könnten, wurden alle vier verwendeten PCR-Produkte einzeln über eine präparative Gelelektrophorese gereinigt. Die anschließenden Hybridisierungsexperimente zeigen saubere klar definierte Banden, der Anteil der vollständigen Kreuzstruktur liegt aber bei lediglich 20 %. Dieses Ergebnis ist absolut nicht zu verstehen, da in einem Probeansatz mit den gleichen sticky-end-Sequenzen rund 30-40 % der Zielstruktur gebildet wurden, obwohl diese Proben durch ein Primer-Dimer verunreinigt war, das bei der Hybridisierung mit den PCR-Produkten in Konkurrenz treten kann.

Die quantitative Bildung der Kreuzstruktur, die bei der Verwendung von Oligonukleotiden problemlos erfolgt, konnte nicht auf die polymeren Systeme übertragen werden. Dieses Ergebnis entspricht den Erfahrungen aus den verschiedenen Dimerisierungsversuchen der PCR-Produkte mit überstehenden Enden. Bei perfekter Stöchiometrie und 100 % hybridisierungsfähigen überstehenden Enden werden 70 % der PCR-Produkte im Dimer

gebunden. Wenn man davon ausgeht, dass jede Verknüpfung innerhalb der Kreuzstruktur zu 70 % gebildet wird, würde man einen Anteil von 24-34 % für die vollständige Zielstruktur erwarten (je nach dem ob man von drei oder vier Verknüpfungsstellen ausgeht). Insofern zeigen die verschiedenen Systeme eine relativ gute Übereinstimmung.

Prinzipiell sollte eine präparative Abtrennung der erwünschten Zielstruktur über CEE bzw. Ultrazentrifugation möglich sein. Die verschiedenen Parameter der beiden Methoden müssen aber noch optimiert werden.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Synthese von zwei neuen Strukturelementen entwickelt, die durch die Selbstorganisation von Oligonukleotiden zum Aufbau supramolekularer Strukturen genutzt werden können. Als flexible Struktureinheiten wurden biosynthetische Triblockcopolymere auf der Grundlage von Polyethylenoxiden hergestellt, die mit zwei unterschiedlichen Oligonukleotiden funktionalisiert sind. Die Natur des erarbeiteten Syntheseweges lässt eine problemlose Übertragung auf andere synthetische Polymere zu. Somit wurden Grundlagen geschaffen, um die Selbsterkennung von Oligonukleotiden durch Kombination verschiedener Triblockcopolymere, zur Erzeugung von Multiblockcopolymeren zu nutzen, die mit klassischen Synthesetechniken nicht zugänglich sind. Semiflexible Strukturelemente konnten durch die Synthese von Doppelstrangfragmenten mit langen überstehenden Enden realisiert werden. Da es gelungen ist, diese mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion herzustellen, kann die Länge des Doppelstrangabschnitts über einen breiten Molmassenbereich sehr exakt eingestellt werden. Durch die Kombination derartiger Doppelstrangfragmente mit den biosynthetischen Triblockcopolymeren lassen sich Strukturen erzeugen, die als Modellsysteme zur Untersuchung verschiedener Biomoleküle genutzt werden können, die in Form eines mehrfach gebrochenen Stäbchens vorliegen. Im letzten Abschnitt wurde gezeigt, dass durch geeignete Wahl der überstehenden Enden bzw. durch Hybridisierung der Doppelstrangfragmente mit passenden Oligonukleotiden verzweigte DNA-Strukturen zugänglich sind.

Biosynthetische Blockcopolymere:

Durch eine festkörperunterstützte Blockkopplungsreaktion ist es gelungen, eine effektive Verknüpfung des ersten Oligonukleotids mit dem synthetischen Polymerblock zu erreichen. Bei dieser Herangehensweise lassen sich nicht umgesetzte Reaktanden durch einfaches Waschen des Trägermaterials entfernen, wodurch das typische Problem der Abtrennung von Homopolymeren weitgehend gelöst werden kann. Da die Kopplungsreaktion zwischen dem DNA-PEO-Diblockcopolymer und der zweiten DNA-Sequenz deutlich schlechtere Ausbeuten liefert, wurde für die Verknüpfung mit dem zweiten Oligonukleotid eine andere Strategie entwickelt. Anstelle eines asymmetrisch geschützten Diaminopolyethylenoxids wurde ein α -Amino- ω -hydroxypolyethylenoxid eingesetzt. Durch die selektive Umsetzung der Aminogruppe mit einem succinimidylfunktionalisierten Oligonukleotid wird ein festkörpergebundenes Diblockcopolymer erhalten, das eine terminale Hydroxygruppe trägt. Diese terminale Hydroxygruppe kann als Startpunkt für die Festphasensynthese des zweiten Oligonukleotids genutzt werden. Auf diesem Weg wurde eine quantitative Einführung der zweiten DNA-Sequenz erreicht. Die Längen und die Basenabfolgen der DNA-Abschnitte können unabhängig voneinander variiert werden. Die Verknüpfung des synthetischen Blocks mit den beiden Oligonukleotiden beruht auf der Umsetzung von sehr einfachen funktionellen Gruppen, die mit verschiedenen Polymerisationstechniken während der Synthese des Polymers eingeführt werden können. Polymeranaloge Umsetzungen am synthetischen Block, wie im Falle der Schutzgruppeninversion am einseitig geschützten α,ω -Diaminopolyethylenoxid, sind somit nicht mehr erforderlich. Durch den Einsatz der Phosphoramiditchemie, zur Synthese des zweiten Oligonukleotids, ist der Syntheseweg nicht mehr auf wässrige Medien beschränkt. Durch diese Rahmenbedingungen sollte eine problemlose Übertragung auf andere Polymere möglich sein.

Bei der Umsetzung von monodispersen Polyethylenoxiden ($n = 11$, $n = 12$ bzw. $n = 16$) verläuft die Synthese quantitativ. Auch bei der Verwendung eines größeren polydispersen Polyethylenoxids ($M_w = 3400$ g/mol) erfolgt die Kopplung annähernd vollständig und die Synthese des zweiten Oligos liefert Ergebnisse, die mit gewöhnlichen DNA-Synthesen vergleichbar sind. Es scheint aber relativ klar zu sein, dass der entwickelte Syntheseweg nicht auf beliebig große Polymere übertragen werden kann. Naturgemäß werden die Ausbeuten von polymeranalogen Kopplungsreaktionen mit zunehmender Molmasse niedriger. Bei hohen Molmassen wird außerdem eine saubere Abtrennung der Fehlsequenzen des zweiten Oligonukleotids nicht mehr möglich sein. Dieses Problem kann evtl. umgangen werden, wenn man deutlich kürzere Oligonukleotide (4-6 Basen) an das Polymer bindet. In diesem Fall ist

eine Abtrennung der Fehlsequenzen nicht mehr erforderlich. Unter Einsatz einer Hilfssequenz könnten solche Triblockcopolymere orientiert und durch Ligation oder andere DNA-templatgesteuerte Reaktionen kovalent miteinander verknüpft werden (vgl. Abschnitt 3.1.6).

Semiflexible Struktureinheiten:

Es wurden verschiedene Synthesestrategien und analytische Methoden entwickelt, die zur Erzeugung und Untersuchung von dsDNA-Fragmenten mit langen überstehenden Enden geeignet sind. Der einfachste Weg zur Bildung solcher DNA-Fragmente ist die Kombination von teilkomplementären Oligonukleotiden. Die chemische Synthese von DNA-Sequenzen ist jedoch auf den Bereich bis etwa 150 Basen beschränkt. Durch die Selbstorganisation von Oligonukleotiden wurde eine lineare Struktur erzeugt, in der drei Doppelstrangfragmente über Triblockcopolymere miteinander verknüpft sind. Bei diesem System hat sich gezeigt, dass die quantitative Abtrennung der Fehlsequenzen eine ganz entscheidende Rolle für den Erfolg der Strukturbildung spielt. Wenn die verwendeten Oligonukleotide über die denaturierende PAGE gereinigt werden erhält man die vollständige Zielstruktur mit einer Ausbeute von 75 % .

Größere Doppelstrangfragmente lassen sich mit Hilfe von molekulargenetischen Methoden erzeugen. In einem ersten Syntheseansatz wurde versucht, die kurzen überstehenden Enden, die bei der Restriktion einer gegebenen DNA-Sequenz mit geeigneten Endonukleasen gebildet werden, durch Ligation mit zwei unterschiedlichen Oligonukleotidsequenzen zu verlängern. Es hat sich aber gezeigt, dass die palindromische Struktur der sticky-ends, die typisch ist für Endonukleasen des Typs II, zu einer Dimerisierung der Doppelstrangfragmente führt. Obwohl das Restriktionsfragment dephosphoryliert und die Oligonukleotide im Überschuss eingesetzt wurden, konnte die unerwünschte Dimerisierung nicht vollständig unterdrückt werden. Außerdem ist die Länge des erzeugten Doppelstrangfragments bei dieser Vorgehensweise durch die Lage der verwendeten Restriktionsstellen vorgegeben.

Beide Probleme konnten durch die Verwendung von teilkomplementären Primern gelöst werden. Auf diesem Weg lassen sich neue Sequenzabschnitte in eine gegebene Templat-DNA einführen. Somit wäre es möglich, Restriktionsstellen von relativ exotischen Endonukleasen, die nicht palindromische Überhänge bilden, in beliebigem Abstand in eine DNA-Sequenz einzufügen. Mit dieser Methode könnten sowohl 3'- als auch 5'-Überhänge erzeugt werden und die Länge des Doppelstrangabschnittes lässt sich über einen breiten Molmassenbereich exakt einstellen. Die Erzeugung von langen überhängenden Enden konnte aber noch effektiver gestaltet werden, so dass eine Ligation von Oligonukleotiden nicht mehr notwendig ist: Anstelle eines gewöhnlichen Restriktionsenzymen, wurde eine Mischung von Enzymen

eingesetzt, die in der Lage ist eine dUMP-Einheit aus einer DNA-Sequenz herauszuschneiden. Die sticky-end-Sequenzen wurden durch uridinmodifizierte teilkomplementäre Primer in das PCR-Produkt eingeführt. Mit Hilfe des „Uracyl Specific Excision Reagent“ konnten dann gezielte Einzelstrangbrüche erzeugt und die gebildeten Einzelstrangfragmente unter denaturierenden Bedingungen vom PCR-Produkt abgetrennt werden. Verschiedene Analysemethoden haben gezeigt, dass nach einmaliger Durchführung der USER-Reaktion und der denaturierenden Aufarbeitung durch Ultrafiltration mit Harnstofflösung, 90 % der PCR-Produkte in der erwünschten Form vorliegen. Nach wiederholter Durchführung der USER-Reaktion ist die Ausbeute an sticky-ends annähernd quantitativ (95-98 %).

Neben der optimierten Vorgehensweise zur Erzeugung von überstehenden Enden mittels Restriktion wurde ein ganz neuer Weg zur Herstellung von PCR-Produkten mit überstehenden Enden entwickelt. Durch die Verwendung von Primern, bei denen die sticky-end-Sequenz über einen kurzen PEG-Spacer mit der eigentlichen Primer-Sequenz verknüpft sind, lassen sich die überstehenden Enden direkt in der PCR einführen. Enzymatische Modifikationen des PCR-Produkts oder zusätzliche Reinigungsschritte sind nicht mehr erforderlich. In der denaturierenden PAGE konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass die erzeugten PCR-Produkte aus zwei unterschiedlich langen Einzelsträngen aufgebaut sind. Die relativen Intensitäten der beiden Banden stimmen sehr gut mit den theoretischen Erwartungen überein. Die Restriktionsanalyse und die Sequenzierung sprechen ebenfalls für einen effektiven Abbruch der Polymerisation durch den PEG-Spacer. Durch den stark vereinfachten Syntheseweg und die hohe Flexibilität dieser Methode ist es deutlich einfacher, verschiedene molekulare Parameter, wie z.B. die Länge des dsDNA-Fragments oder die Länge bzw. die Sequenz der überstehenden Enden systematisch zu variieren und die erwünschten Produkte in größerem Maßstab herzustellen.

Verzweigte DNA-Strukturen:

Auf diesem Gebiet wurden zwei verschiedene Strategien zur Einführung von Verzweigungsstellen untersucht. Zum einen ist es möglich, durch geeignete Wahl der Sequenzen, synthetische Oligonukleotide zu verzweigten dsDNA-Strukturen mit überstehenden Enden anzuordnen, an die sich verschiedene molekulare Bausteine anlagern lassen. Die zweite Möglichkeit ist eine direkte Verknüpfung der kreuzbildenden Oligonukleotidsequenzen mit dem entsprechenden Strukturelement.

Bei der Verknüpfung von überstehenden Enden mit der verzweigten Struktur J1 (tetrafunktionelle DNA-Kreuzung mit 8 bp in jedem Arm) hat sich gezeigt, dass die Anbindung der sticky-ends zu einer deutlichen Destabilisierung der Struktur führt. Durch die Verlängerung der vier Arme von 8 auf 23 bp konnte jedoch eine stabile Kreuzstruktur mit überstehenden Enden erzeugt werden. Sowohl durch die Kombination der modifizierten Verzweigungsstelle mit überhängenden Enden, mit einem PCR-Produkt aus der USER-Reaktion als auch durch direkte Verknüpfung der kreuzbildenden Sequenzen mit vier verschiedenen PCR-Produkten, konnten deutlich größere verzweigte Strukturen hergestellt werden, die sich mit Hilfe des AFMs sehr schön abbilden lassen. (Jeder der vier Arme hat eine Konturlänge von ca. 200 nm.) Die Kombination von PCR-Produkten mit langen überstehenden Enden zu verzweigten DNA-Strukturen, hat im Vergleich zu den bisher veröffentlichten Methoden zwei Vorteile: Zum einen konnte der Synthesaufwand auf ein Minimum reduziert werden, da neben der PCR keine weiteren Manipulationen erforderlich sind. Zum anderen ist es auf diesem Weg möglich die Längen der einzelnen Arme, unabhängig voneinander, über einen breiten Molmassenbereich zu variieren.

5 Experimenteller Teil

5.1 Allgemeine Anmerkungen zum Arbeiten mit DNA

Chemisch gesehen ist die DNA ein recht stabiles Molekül, das erst durch relativ drastische Bedingungen, wie z.B. starke Säuren ($\text{pH} < 2$) oder hohe Temperaturen ($T > 90^\circ\text{C}$) über einen längeren Zeitraum abgebaut wird. Für Bakterien ist die DNA aber ein gefundenes Fressen, da sie alle lebensnotwendigen Elemente wie Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff und Phosphor enthält. In der Umwelt gibt es eine ganze Reihe von Enzymen die DNA abbauen, mit denen sich z.B. auch der menschliche Körper gegen das Eindringen fremder DNA schützt. Aus diesem Grund muss beim Umgang mit DNA ein gewisses Maß an Hygiene eingehalten werden. Bei der Handhabung von DNA sollten daher immer Handschuhe getragen werden, die zwar nicht steril sein müssen, aber zumindest einen direkten Kontakt der Gefäße mit der Haut verhindern. Man sollte sich außerdem angewöhnen die Öffnungen von Gefäßen, bzw. die Innenseiten von Deckeln nicht anzufassen. Ebenso sollten Vorratsbehälter von Reaktionsgefäßen oder Pipettenspitzen nicht unnötig lange offen stehen. Dies gilt in ganz besonderem Maße bei Arbeitsmitteln, die für die PCR eingesetzt werden, da hier bereits einzelne Moleküle durch den enorm hohen Vervielfältigungsfaktor ($0,5 - 1 \times 10^6$) zur Bildung von Nebenprodukten führen können. Proben, die über einen längeren Zeitraum gelagert werden, sollten gekühlt oder eingefroren werden, da so eventuelle Enzymreaktionen unterbunden oder zumindest stark verlangsamt werden. Dies gilt in besonderem Maße für Puffer und Lösungen die Magnesium enthalten, das in vielen enzymatischen Umsetzungen als Cofaktor dient. magnesium- oder phosphathaltige Puffer können bereits nach einigen Tagen bis Wochen bei Raumtemperatur deutliche Anzeichen von bakteriellem Wachstum zeigen. Die oft erwähnte Labilität von DNA gegenüber Scherkräften beim Pipettieren, Einfrieren oder Vortexen stellt erst bei hochmolekularen Sequenzen (ab einigen 1000 bp) ein Problem dar. Eine „genetische Bedrohung“ für Mensch oder Umwelt geht von *isolierter* DNA nicht aus. Wenn allerdings Fremd-DNA in Bakterienzellen eingebracht wird, erhält man lebensfähige gentechnisch veränderte Organismen, die vor der Entsorgung abgetötet werden müssen.

5.2 Synthese

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.

5.2.1 Reinigung von Reagenzien und Lösungsmitteln

Chloroform: 60 ml Chloroform werden 24 h bei RT über 0,6 g CaH_2 gerührt und anschließend unter Argon abdestilliert.

Trifluoressigsäureethylester: Um eine zu heftige Reaktion des CaH_2 zu vermeiden, wird ein inertes Lösungsmittel (Methylcyclohexan, 20 ml) vorgelegt, mit 0,4 g CaH_2 versetzt und anschließend 20 ml des Esters zugegeben. Nach 24 h bei RT wird der Ester unter Argon abdestilliert (Sdp.: 58-60 °C).

Formamid: Formamid kann aufgrund von hydrolytischer Zersetzung Spuren von Ammoniak enthalten. Da in den Kopplungsreaktionen selbst bei „großen“ Ansätzen nur etwa 1,4 μmol succinimidyl aktivierte DNA umgesetzt werden, können bereits Verunreinigungen im ppm-Bereich zu einer Deaktivierung des Aktivesters beitragen. (100 ppm = 5,8 μmol NH_3 / ml) Zum Entfernen von Wasser wird ein Molsieb (Aldrich, 3 Å, 8-12 mesh) im Vakuum ausgeheizt (24 h, 10^{-3} mbar, 180 °C) und nach dem Abkühlen das Lösungsmittel (HiDi™ Formamid, Applied Biosystems) unter Schutzgas zugegeben. Nach weiteren 24 h bei RT werden 5 ml des Formamids über einen Spritzenfilter (LG, 200 nm) filtriert und mit 1 g trägergebundenem Isocyanat (1 % DVB) versetzt. Durch eine Additionsreaktion wird der Ammoniak an den Träger gebunden. Zum Entfernen des Trägermaterials wird erneut filtriert.

5.2.2 Quantitative Einführung der Tfa-Schutzgruppe an 2-Methoxyethylamin

Eine Lösung von 46,3 μl 2-Methoxyethylamin (40 mg; 0,53 mmol) in 2 ml CDCl_3 wird mit 82,7 μl Trifluoressigsäureethylester (98,5 mg; 0,69 mmol; 1,3 Äq.) versetzt. Die Reaktion ist nach 8 d bei RT quantitativ. Der Umsatz wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie, aus dem Verhältnis der CH_3 -Signale von Produkt und Edukt bestimmt.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 1,95 ppm (s, -NH-, 1H), 3,33 ppm (s, -CH₃, 3H) 3,43-3,53 ppm (m, -CH₂CH₂-, 4H)

5.2.3 Schutzgruppeninversion an Boc-PEO11-NH₂

(Boc-PEO11-NH₂ = O-(2-Aminoethyl)-O'-[2-(Boc-amino)ethyl]decaethylenglycol)

5.2.3.1 Einführung der Tfa-Schutzgruppe

440 mg Boc-PEO-NH₂ (0,68 mmol) werden unter Argon in 10 ml trockenem Chloroform gelöst und mit 170 µl trockenem Trifluoressigsäureethylester (1,43 mmol; 2,1 Äq) versetzt. Nach 7 d bei RT unter Lichtausschluss, wird die Reaktionslösung aufkonzentriert (30 °C, 210 mbar, Endvolumen 1 ml).

Aufarbeitung:

Boc-PEO-Tfa(1.): Diese Probe wurde nach obiger Vorschrift in CDCl₃ synthetisiert, so dass direkt aus der Reaktionsmischung eine Probe für das ¹H-NMR entnommen werden konnte.

Der Ansatz wird bei -78 °C in n-Pentan gefällt. Nach dem Absitzenlassen des Niederschlags wird die überstehende Lösung abdekantiert und der Rückstand zunächst an der Membranpumpe (30 °C, bis 9 mbar) und anschließend über Nacht im Ölpumpenvakuum (10⁻³ mbar) getrocknet. Das ¹H-NMR-Spektrum bestätigt die Identität des doppelt geschützten Produktes. Eine Kontrolle mittels MALDI-TOF MS zeigt aber, dass die Umsetzung nicht quantitativ war.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1,41 ppm (s, (CH₃)₃C-O-, 9H), 3,28 ppm (q, Boc-NH-CH₂-, 2H), 3,35-3,91 ppm (m, PEG, 46H); 5,06 ppm (s, Boc-NH-, 1H), 7,48 ppm (s, -NH-Tfa, 1H)

MALDI-TOF MS (THF, Sinapinsäure):

Boc-PEO-Tfa (Na⁺); Berechnet: 763,79 Da; Gefunden: 764.0 Da

Boc-PEO-NH₂ (H⁺); Berechnet: 645,79 Da; Gefunden: 645.6 Da

H₂N-PEO-Tfa (H⁺); Berechnet: 641,70 Da; Gefunden: 641.8 Da

Boc-PEO-Tfa(2.): DC-Versuche auf Kieselgelfolien mit CHCl₃/MeOH (v/v = 5/1):

Edukt (Boc-PEO-NH₂): $r_f^1 = 0,68$ (Verunreinigung) / $r_f^2 = 0,15$ (Hauptanteil)

Reaktionslösung Boc-PEO-Tfa(2.): $r_f^1 = 0,73$ / $r_f^2 = 0,13$ / $r_f^3 = 0,02$

Färbelösung: Modifiziertes Dragendorff Reagenz

Das modifizierte Dragendorff Reagenz ist eine intensiv gefärbte gelbe Lösung, die in Gegenwart von PEO, bzw. PEO-Derivaten einen orangen Niederschlag bildet [190-195]. Prinzipiell ist das Reagenz auch für einen Nachweis von PEO-Derivaten in Lösung geeignet. Positivergebnisse müssen aber durch eine Negativkontrolle mit dem reinen Lösungsmittel bestätigt werden.

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.

Aufarbeitung der Reaktionslösung über Säulenchromatographie: 9 g Kieselgel 60 (Merck) werden im Eluenten dispergiert, in einer Säule ($\varnothing \approx 2$ cm) unter Gravitationsfluss gepackt und mit Seesand überschichtet. Nach dem Auftragen der Probe wird mit Chloroform/Methanol ($v/v = 5/1$) eluiert. Es wird ein Vorlauf (Fraktion 1) von 10 ml genommen und anschließend Fraktionen von jeweils 5 ml gesammelt. Die Trennung wird durch DC auf Kieselgelfolien im gleichen Laufmittel überprüft. Fraktionen 1 bis 3 enthalten das gereinigte Produkt, 4 bis 7 sind Mischfraktionen, alle restlichen Fraktionen enthalten nur noch Verunreinigungen. Die Fraktionen 1-3 werden vereinigt, eingeeengt, und anschließend im Vakuum (30 °C, 9 mbar) getrocknet. Ausbeute: 213 mg

MALDI-TOF MS (THF, Sinapinsäure, Na⁺):

Boc-PEO-Tfa (Na⁺); Berechnet: 763,79 Da; Gefunden: 764.1 Da

H₂N-PEO-Tfa (H⁺); Berechnet: 641,70 Da; Gefunden: 641.7 Da

5.2.3.2 Abspalten der Boc-Schutzgruppe

213 mg O-[2-(Tfa-amino)ethyl]-O'-[2-(Boc-amino)ethyl]decaethylenglycol werden unter Argon mit 2,4 ml einer eisgekühlten Lösung von Trifluoressigsäure in Dichlormethan ($v/v = 1/1$) versetzt. Nach 1,5 h bei 0 °C und 1,5 h bei RT wird der Ansatz eingeeengt (30 °C, 30 mbar) und das Produkt im Vakuum getrocknet (RT, 10⁻³ mbar). Ausbeute: 180 mg

Die Schutzgruppenabspaltung ist quantitativ, was durch die Abwesenheit des CH₃-Signals im ¹H-NMR-Spektrum bestätigt wird. Das ¹H-NMR-Spektrum der gefällten Probe [H₂N-PEO-Tfa(1.)] in CDCl₃ zeigt sehr breite Peaks, die eine Interpretation der Signalaufspaltungen nicht zulassen. Die über Säulenchromatographie gereinigte Probe [H₂N-PEO-Tfa(2.)] zeigt in CDCl₃ nur Lösungsmittelpeaks, es können aber Spektren in CD₂Cl₂, bzw. CD₃OD gemessen werden.

¹H-NMR (300 MHz, CD₂Cl₂) δ 3,12 ppm (m, H₃N⁺-CH₂-, 2H), 3,48-3,82 ppm (m, PEG, 46H)

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 3,23 ppm (t, H₃N⁺-CH₂-, 2H), 3,51 ppm (t, CH₂, 2H), 3,57-3,88 ppm (m, PEG, 44H)

MALDI-TOF MS (THF, Sinapinsäure, Na⁺):

H₂N-PEO-Tfa (Na⁺); Berechnet: 663,68 Da; Gefunden: 663,3 Da

5.2.4 Kopplung von Polyethylenoxiden an Oligonukleotide

5.2.4.1 Kopplung an succinimidylfunktionalisierte Oligonukleotide

2-100 mg CPG (Porengröße: 500 Å; ca. 0,028-1,4 μmol succinimidylfunktionalisiertes Oligonukleotid) werden in einem kleinen Schraubdeckelgläschen dreimal mit trockenem Acetonitril und anschließend einmal mit dem entsprechenden Lösungsmittel gewaschen. Durch leichtes Klopfen gegen die Gefäßwand setzt sich das Trägermaterial schnell ab, so dass sich das Lösungsmittel gut mit einer Spritze abziehen lässt. Hierbei ist es günstig das verwendete Gefäß vollständig mit Lösungsmittel zu füllen, da so ein Anhaften des Trägers an der Gefäßwand vermieden wird. Der gewaschene Träger wird mit 0,1-0,5 ml der PEG-Lösung versetzt. Für die Durchmischung der Reaktionslösung ist ein Magnetrührer ungeeignet, weil sonst ein erheblicher Abrieb des Trägermaterials entsteht, der die Aufarbeitung der Reaktionslösung deutlich erschwert. Schütteln der Reaktionslösung ist besonders bei kleinen Reaktionsvolumina ungünstig, da das feuchte CPG an der Gefäßwand haften bleibt und somit nur schlecht mit der Polymerlösung benetzt wird. Eine optimale Durchmischung des CPG lässt sich durch die Verwendung eines Drehmotors erreichen, an den eine flexible Achse angebracht ist. Durch diese Anordnung wird eine Überlagerung von Dreh- und Kippbewegungen erzeugt, die auf das jeweiligen Reaktionsvolumen optimiert werden kann. Nach 17 h bei RT (bzw. bei 10 °C im Falle von wässrigen Reaktionsmedien) wird die Reaktionslösung abgenommen und der Träger drei bis fünfmal mit dem verwendeten Lösungsmittel gewaschen. Anschließend wäscht man noch einmal mit Acetonitril und gibt eine Lösung von 10 % Diethylamin in Acetonitril zu. Nach 5-10 min unter gelegentlichem Schütteln wird so eine selektive Abspaltung der Phosphatschutzgruppen erreicht. Das gebildete Acrylonitril wird durch drei weitere

Waschschritte mit Acetonitril entfernt. Auf diese Weise wird eine Additionsreaktion des Acrylonitrils an die endständige Aminogruppe des Diblockcopolymers verhindert. Das Trägermaterial wird anschließend mit ca. 1 ml 28 %iger Ammoniaklösung versetzt. Nach 16 h bei 47 °C ist das Oligo vollständig vom Trägermaterial abgespalten und entschützt. Die Lösung wird abgenommen, der Träger noch dreimal mit Wasser gewaschen, und das Waschwasser mit der abgenommenen Lösung vereinigt. Anschließend wird die DNA-Lösung entsalzt.

Prinzipiell ist eine Abtrennung der Schutzgruppen („Entsalzen“) durch Dialyse möglich. Zum Entfernen des Ammoniaks wurde die Reaktionslösung der Kopplungsreaktion in Dichlormethan bei RT im Konzentrator eingeeengt. (Celluloseester-Membranen sind gegen 28 %ige Ammoniaklösung nicht stabil, Membranen aus regenerierter Cellulose haben eine bessere chemische Beständigkeit, sind aber nicht mit ausreichend niedrigem MWCO erhältlich.) Der so erhaltene Rückstand ließ sich in Wasser nicht mehr vollständig in Lösung bringen. Das gleiche Problem trat auch bei einer Probe von S. Flügel auf. Hier bildete sich bereits während des Aufkonzentrierens der ammoniakalischen Lösung ein farbloser Niederschlag. Die Ausbeute an Oligonukleotid nach Abtrennung des unlöslichen Feststoffes aus der Kopplung in Dichlormethan war um etwa 50 % verringert. Aus diesem Grund sollte das Aufkonzentrieren einer Oligonukleotidlösung vor dem Entsalzen auf jeden Fall vermieden werden. Ein IR-Spektrum des unlöslichen Feststoffes spricht dafür, dass es sich um Benzamid, die Schutzgruppen der exozyklischen Aminogruppen an Adenin und Cytosin, handelt. Der Feststoff ließ sich aber nicht in Lösungsmitteln wie Ethanol, Tetrachlorkohlenstoff, Chloroform oder Benzol lösen.

Entsalzen der Oligonukleotidlösung über Gelfiltration:

Die Gelsäule (NAP-25, GE Healthcare) wird mit 25-30 ml Elutionspuffer gespült. Sobald der Elutionspuffer vollständig in das Gelbett eingedrungen, ist können maximal 2,5 ml Probe aufgetragen werden. Nach dem vollständigen Einsinken der Probe wird mit Puffer eluiert und mit der Fraktionierung begonnen. Es werden zunächst drei Fraktionen von je 1 ml und anschließend vier weitere Fraktionen von je 0,5 ml genommen. Das gereinigte Oligonukleotid befindet sich in den ersten vier Fraktionen. Die Ausbeute der Gelfiltration liegt deutlich oberhalb von 90 %.

Als Elutionspuffer wurden 10 mM Natriumcarbonatlösung (pH 11), 10 mM Kochsalzlösung und reines Wasser getestet. Obwohl eine stark basische Probenlösung auf die Säule gegeben wird, sind Trennleistung und Ausbeute der Gelfiltration weitgehend unabhängig vom verwendeten Elutionspuffer. Die Möglichkeit der Verwendung von reinem Wasser bietet den großen Vorteil, dass eine völlig salzfreie Lösung in einem Reinigungsschritt erhalten werden kann. Eine zusätzliche, zeitaufwändige Reinigung über Dialyse ist somit in der Regel nicht erforderlich. (Die Verunreinigung durch Salz oder andere niedermolekulare Verbindungen liegt laut Hersteller unter 3 %.) Die Verwendung neutraler Elutionspuffer liefert außerdem eine sehr einfache Kontrollmöglichkeit der Trennung über den pH-Wert. Typischer pH-Wert-Verlauf: Fraktion 1-4: pH 6-7, Fraktion 5: pH 7-8, Fraktion 6: pH 11

5.2.4.2 Kopplung nach Aktivierung mit Carbonyldiimidazol

Die Aktivierung mit CDI wurde sowohl an 5'-amino-, als auch an 5'-hydroxyfunktionalisierten Oligonukleotiden in zwei verschiedenen Lösungsmitteln getestet. Alle Arbeitsschritte wurden unter Inertgasatmosphäre durchgeführt, um eine Hydrolyse der aktivierten Verbindungen auszuschließen.

Aktivierungslösungen:

1. 400 mg CDI (2,5 mmol) werden in 5 ml wasserfreiem DMF (Acros, $H_2O < 50$ ppm über Molsieb) gelöst.
2. 400 mg CDI (2,5 mmol) werden mit 5 ml THF (Riedel-de Haën, $H_2O < 0,005$ %) versetzt und die unlöslichen Anteile über einen Spritzenfilter abfiltriert.

2-3 mg CPG (Porengröße: 2000 Å) werden zweimal mit trockenem THF gewaschen und anschließend mit 2 ml der CDI Lösung versetzt. Die Aktivierung der Aminogruppe erfolgt bei RT, die der Hydroxygruppe bei 40 °C. Nach 30 min wird die Aktivierungslösung abgenommen und der Träger mit trockenem THF gewaschen. Nun versetzt man das Trägermaterial mit 0,5 ml einer 70 mM Lösung von H_2N -PEG12-OMe (m-dPEG₁₂TM amine, Quanta BioDesign) in trockenem THF. Nach ca. 16 h wird die Reaktionslösung abgenommen und das CPG dreimal mit THF und einmal mit Wasser gewaschen. Anschließend versetzt man mit ca. 0,5 ml 28 %igem Ammoniak. Nach 16 h bei 47 °C wird die ammoniakalische Lösung abgenommen und der Träger noch zweimal mit 0,5 ml Wasser gewaschen. Durch Aufkonzentrieren der Lösung bei 60 °C im Konzentrator lässt sich der größte Teil des Ammoniaks entfernen. Die Lösung wird anschließend mit Wasser auf 1 ml aufgefüllt. Die so erhaltene Lösung liefert bei einer Verdünnung von 1/5 eine vernünftige UV-Absorption zur

Bestimmung der DNA-Konzentration bei ausreichendem Volumen für die Verwendung von Standard-Küvetten. Gleichzeitig ist die Lösung noch ausreichend konzentriert, so dass relativ kleine Volumina (typischer Weise 10 – 30 μl) für die Untersuchung mittels Gelelektrophorese ausreichen. Bei diesem Vorgehen zeigen die abgespaltenen Schutzgruppen des Oligos keinen störenden Einfluss und müssen daher nicht abgetrennt werden. Die denaturierende PAGE zeigt eine Produktbande mit etwas weniger als 50 % der Intensität der nicht umgesetzten DNA und einige zusätzliche Banden mit geringerer Mobilität. (vgl. Abschnitt 3.1.4, Abb. 38).

5.2.4.3 Kopplung nach Aktivierung mit EDC

100 mg CPG (Porengröße: 500 Å; ca. 1,4 μmol succinimidylfunktionalisiertes Oligonukleotid) werden mit 4 ml Wasser versetzt und für 3 d bei RT hydrolysiert. Anschließend wird dreimal mit Wasser, einmal mit Methanol und einmal mit Diethylether gewaschen und der Träger an der Luft getrocknet. Für die Aktivierung der so erhaltenen Säuregruppe am 5'-Ende des trägergebundenen Oligonukleotids werden 23,6 mg ($\approx 0,3 \mu\text{mol}$ DNA) abgenommen. 0,1 M MES wird mit NaOH auf pH 4,7 eingestellt. 450 μl dieser Lösung werden mit 12,5 mg $\text{NH}_2\text{-PEO-Tfa(2.)}$ (20 μmol) versetzt und auf die trägergebundene DNA gegeben. 21,5 mg EDC werden in 1,7 ml Wasser gelöst und direkt 50 μl dieser Lösung zum Reaktionsansatz gegeben. Nach 16 h bei RT wird die Reaktionslösung abgenommen und der Träger dreimal mit Wasser, einmal mit Methanol und einmal mit Diethylether gewaschen. Nach dem Trocknen des Trägers werden 6 mg abgenommen und die DNA mit 28 %igem Ammoniak bei 47 °C vom Träger abgespalten. Die denaturierende PAGE zeigt lediglich eine Bande auf Höhe der eingesetzten DNA.

5.2.5 Kopplung von DNA-PEO-NH₂ an succinimidylfunktionalisierte Oligos

Die ammoniakalische Lösung aus der 1. Kopplungsreaktion wird über Gelfiltration in 10 mM Kochsalzlösung entsalzt, gegen Wasser dialysiert (Spectra/Por, Float-A-lyser, V = 5 ml, MWCO 0,5 kD) und anschließend in $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer (0,2 M, pH 7,2) + 20 % DMF gebracht.

Zum Einstellen der Pufferkonzentration einer wässrigen Lösung bieten sich verschiedene Möglichkeiten: Die Probe kann mit der berechneten Menge des Puffers versetzt und anschließend auf das erwünschte Volumen eingengt werden. Die Einstellung des Volumens und somit auch die Pufferkonzentration ist bei diesem Vorgehen nicht exakt. Eine exakte Einstellung der Konzentrationen von Puffer und Probe kann erreicht werden, wenn es möglich

ist die Probe vollständig einzuengen und anschließend im entsprechenden Medium aufzunehmen. In vielen Fällen ist es aber günstiger ein definiertes Volumen der Probe mit einer konzentrierten Pufferlösung zu versetzen (typischer Weise 10 x Puffer).

Die abgewogene Menge an CPG wird mit dem gekühlten Reaktionsmedium gewaschen und anschließend mit der vorgekühlten Lösung des aminofunktionalisierten Diblockcopolymeren versetzt. Nach 6 d bei 10 °C wird die Reaktionslösung abgenommen, das Trägermaterial dreimal mit Wasser gewaschen und anschließend mit ca. 1 ml 28 %iger Ammoniaklösung versetzt. Die weitere Vorgehensweise ist wie in 5.2.4.1 beschrieben.

5.3 Vervielfältigung von DNA

5.3.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Das grundlegende Prinzip der PCR ist die Steuerung der einzelnen Reaktionsschritte über definierte Temperaturänderungen. Die einzelnen Inkubationszeiten liegen zwischen 15 sec und 1 min. Ein schneller Wärmeaustausch vom Heizblock auf die Reaktionslösung ist daher von entscheidender Bedeutung. Aus diesem Grund kann das Reaktionsvolumen einer PCR nicht beliebig erhöht werden. Die Erzeugung besonders großer Mengen des Amplifikats ist nur durch eine große Anzahl von Einzelansätzen möglich. Typische Ausbeuten einer PCR liegen im Bereich von 3-5 µg je Ansatz. Üblicherweise werden PCRs in einem Gesamtvolumen von 50-200 µl durchgeführt. Bei größeren Ansätzen (500 µl) müssen die Inkubationszeiten bereits auf 1,5-3 min verlängert werden. Außerdem empfiehlt sich hier der Einsatz eines Wasserbadthermocyclers (Autogene II, Grant).

Wenn mehrere PCRs parallel gefahren werden sollen, wird zunächst einen Mastermix hergestellt, der alle Komponenten außer der Polymerase enthält. Beim Berechnen der notwendigen Volumina wird für je 25 Reaktionen ein zusätzlicher Ansatz eingeplant, d.h. für 2-25 Reaktionen: Ein zusätzlicher Ansatz, für 26-50 Reaktionen: Zwei zusätzliche Ansätze, usw. Kleine Ungenauigkeiten beim Aufteilen führen sonst schnell dazu, dass nicht mehr das erforderliche Volumen für den letzten Ansatz zur Verfügung steht. Nach dem Aufteilen des Mastermix in dünnwandige PCR-Tubes wird die Polymerase zugegeben, die Lösung durch leichtes Klopfen an die Gefäßwand vorsichtig durchmischt und das Temperaturprogramm gestartet.

Große Ansätze (500 µl) im Wasserbad-Thermocycler:

50 µl 10 x PCR-Puffer

20 µl dNTPs (10 mM)

10 µl Template DNA (pDmirAmyRelXba0,6; Originallösung 1:1000 verdünnt)

10 µl Primer M13 reverse

10 µl Primer universal

20 µl Taq DNA Polymerase („Haus-Taq“)

380 µl HPLC-Wasser

$V_{\text{ges}} = 500 \mu\text{l}$

Temperaturprogramm: Autogene II.CYC

Bei diesem Vorgehen erhält man aus einem 500 µl-Ansatz ca. 3,7 µg DNA (600 bp).

Kleine Ansätze (bis 200 µl) im Heizblock-Thermocycler:

Die PCR-Ansätze werden mit den folgenden Stammlösungen hergestellt:

- Template-DNA (pNEB206A): Verdünnung 1:1000, $c = 20 \mu\text{g/ml}$.
- Primer: Je nach erhaltener Menge werden die Primer in einem sinnvollen Volumen gelöst (1-10 nmol/µl) und durch Verdünnung eine Stammlösung von 10 pmol/µl hergestellt.
- dNTPs (ROTIMIX-PCR1, 2 mM, Roth), Polymerasen und PCR-Puffer werden eingesetzt wie vom Hersteller erhalten.

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

$V_{\text{ges}} = 100 \mu\text{l}$

Temperaturprogramme: PCR2.CYC, PCRPGEM2.CYC

Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (50 µl-Ansatz):

10 µl 5 x Phusion HF-Puffer

5 µl dNTPs (je 20 nmol dATP, dTTP, dCTP und dGTP)

5 µl Template DNA (0,05 ng pNEB206A)

2,5 µl Primer 1 (25 pmol)

2,5 µl Primer 2 (25 pmol)

0,5 µl Phusion DNA Polymerase (?? Units)

24,5 µl Milli-Q-Wasser

$V_{\text{ges}} = 50 \mu\text{l}$

Temperaturprogramm: Phusion.CYC

Nach dem Abtrennen der Primer wird die DNA-Konzentration durch UV-Absorption bestimmt. In beiden Fällen erhält man typischer Weise 5 µg DNA (600 bp) aus 100 µl PCR-Lösung.

5.3.2 Aufarbeitung von PCR-Produkten

Da die Anforderungen an die Reinheit von PCR-Produkten stark von der anschließenden Verwendung abhängt, wurden eine ganze Reihe von Aufarbeitungsmethoden durchgeführt.

5.3.2.1 Fällungsreaktionen

Bei Fällungsreaktionen von Doppelstrang-DNA müssen die erforderlichen Komponenten in der angegebenen Reihenfolge zusammen gegeben werden. DNA-Pellets sind nicht immer mit bloßem Auge erkennbar. Aus diesem Grund sollte man sich angewöhnen die Reaktionsgefäße immer mit der gleichen Orientierung im Rotor zu platzieren, so dass die Position des erhaltenen Pellets im Reaktionsgefäß auf jeden Fall nachvollziehbar ist. Wenn synthetische Oligonukleotide gefällt werden sollen, muss lediglich das Verhältnis der eingesetzten Volumina beibehalten werden: Maximal 1 Teil wässrige Lösung auf 2 Teile Ethanol. Bei Lösungen mit besonders niedriger DNA-Konzentration empfiehlt es sich entweder die Lösung vor der Fällung einzunengen oder die Zentrifugationszeiten zu erhöhen.

Fällung mit Ethanol: Mit diesem Ansatz wird sowohl dsDNA, als auch ssDNA unabhängig von der jeweiligen Größe ausgefällt. Enzyme, dNTPs und Salze bleiben in Lösung.

Ansatz: 500 µl PCR-Lösung
50 µl 10 x Dialysepuffer
1100 µl Ethanol (100 %, unvergällt)
 $V_{\text{ges}} = 1650 \mu\text{l}$

Nach kurzem Mischen auf dem Vortexer wird der Ansatz mindestens 1 h auf Trockeneis oder über Nacht bei $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 ($-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$) 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.

Fällung mit Isopropanol: Durch eine Verringerung des eingesetzten Volumens an Isopropanol ist es prinzipiell möglich einen Größenausschluss zu erreichen, so dass kleine DNA-Fragmente in Lösung bleiben. Die Volumenverhältnisse müssen aber empirisch für das jeweilige System optimiert werden. Eine solche Optimierung wurde nicht durchgeführt, da bereits etablierte Systeme für die selektive Fällung im Handel erhältlich sind.

Ansatz: 500 µl PCR-Lösung
50 µl Natriumacetatlösung (3 M)
550 µl Isopropanol
 $V_{\text{ges}} = 1100 \mu\text{l}$

Die Fällungs- und Zentrifugationsschritte werden wie bei der Fällung in Ethanol durchgeführt.

Selektive Fällung mit Roti[®]-PCR Clean: Diese Methode ist für DNA-Fragmente $\geq 100 \text{ bp}$ 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 %.

Ansatz: 100 µl PCR-Lösung
100 µl Roti-PCR Clean
 $V_{\text{ges}} = 200 \mu\text{l}$

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.

5.3.2.2 Selektive Adsorption an Silika

Bei Standard-PCR-Ansätzen wird weitgehend nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen (NucleoSpin[®] Extract II, Macherey-Nagel). Die Elution der Probe ist aber in der Regel günstiger in zwei Schritten mit jeweils halbem Elutionsvolumen durchzuführen. Die getesteten Elutionsmittel (Milli-Q-Wasser, 1 x TAE-Puffer, bzw. NE-Puffer) zeigen keine deutlichen Unterschiede. Bei der Elution bleibt aber immer ein gewisser Rest des Elutionsmittels (ca. 2-10 µl) in der Silikamembran zurück. Das vollständige Entfernen von Ethanolresten (Puffer NT3) wird mit Hilfe der Exsiccatorfunktion des Konzentrators bei 45 °C erreicht. Rückgewinnungsraten liegen in der Regel bei ca. 85-95 %. Die Kapazität der Silikasäulen liegt laut Hersteller bei 15 µg. Bei PCR-Ansätzen mit besonders großen Primern wurden einige Modifikationen getestet (vgl. Abschnitt 3.6.3.3). In einigen Fällen enthielten die gereinigten Proben Rückstände, die zu einer starken UV-Absorption bei Wellenlängen < 240 nm führt. Hierbei wird es sich sehr wahrscheinlich um Pufferreste (wahrscheinlich Puffer NT) oder kleine Silikapartikel handelt, die sich während der Zentrifugation von der Membran ablösen.

5.3.2.3 Ultrafiltration

Die Aufreinigung besonders großer Volumina von PCR-Lösungen wird mit Ultrafiltrationseinheiten (Amicon-Ultra, 4 ml bzw. 15 ml Maximalvolumen, MWCO = 50 kD) in der Zentrifuge durchgeführt. Bei jedem Filtrationsschritt wird 3 min bei 2500 x g zentrifugiert:

- Zweimal: Filtrationseinheit mit 10 ml Wasser spülen.
- Einmal: Probe in 10 ml Gesamtvolumen aufgeben.
- Drei- bis Fünfmal: Mit Wasser auf 10 ml auffüllen und filtrieren.

Sobald die Membranen einmal angefeuchtet sind dürfen sie nicht mehr trockenlaufen. Aus diesem Grund ist es wichtig die Filtrationseinheiten nach jedem Zentrifugationsschritt direkt wieder zu befüllen. Konzentrierte Lösungen sollten möglichst kurz in Kontakt mit der Membran bleiben. Das Endvolumen der filtrierte Lösung liegt typischerweise bei ca. 200 µl.

5.3.2.4 GPC

Ein erster Versuch mit dem PCR-Produkt PCR-PK33 hat gezeigt, dass eine Abtrennung von Primern und Primer-Dimeren mittels GPC möglich ist. Die Trennleistung in reinem Wasser scheint mit der in 5 mM Natriumphosphatpuffer weitgehend identisch zu sein.

5.3.3 Bakterielle Amplifikation von DNA

5.3.3.1 Transformation mit elektrokompetenten Zellen

Die Küvetten für die Elektroporation müssen frisch sterilisiert sein. Das L-Medium wird bei 37 °C vortemperiert. Man lässt ein 20 µl-Aliquot der elektrokompetenten Zellen auf Eis auftauen und versetzt dieses anschließend mit 1 µl DNA-Lösung (pDmirAmyRelXba0,6). Als Vergleichsprobe dient eine Lösung des unveränderten Plasmids (pUC18). Der Ansatz wird vorsichtig durchmischt und für 1 min auf Eis inkubiert. Die Initiierung der Transformation erfolgt durch einen kurzen Spannungsimpuls (2,5 kV). Direkt nach der Elektroporation gibt man 1000 µl des temperierten L-Mediums zu, überführt die Lösung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß und inkubiert den Ansatz 1 h bei 37 °C. 100 µl dieser Lösung werden auf einen Agar-Nährboden (Ampicillin, X-Gal) ausplattiert. Die anschließende Kultivierung erfolgt bei 37 °C im Brutschrank. Die erwünschten rekombinanten Zellen lassen sich durch „blau-weiß-Selektion“ erkennen. Für die Kultivierung der selektierten Zellen werden 100 mg Ampicillin in 1 ml HPLC-Wasser gelöst und 10 µl dieser Lösung mit 10 ml L-Medium versetzt. Mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers wird eine „weiße“ Bakterienkolonie vom Agar-Nährboden in diese Ampicillin-Lösung überführt und unter Schütteln über Nacht bei 37 °C kultiviert. Die restliche Ampicillin-Lösung wird auf 2 x 500 ml L-Medium verteilt und im Kühlschrank gelagert. Ein erfolgreiches Wachstum zeigt sich durch eine deutliche Trübung der Lösung. Für die Herstellung besonders großer Mengen der Bakterienkultur lässt man die beiden 500 ml-Ansätze des ampicillinhaltigen L-Mediums auf RT kommen, setzt jeweils 5 ml der Zellkulturlösung hinzu und inkubiert erneut unter Schütteln bei 37 °C für etwa 24 h bis 48 h.

5.3.3.2 Rückgewinnung von Plasmiden aus Zelllösungen

Es wurden zwei unterschiedliche Verfahren zur Plasmid Isolierung eingesetzt. Die klassische Methode ist die alkalische Lyse der Zellen. Diese Methode ermöglicht die Aufarbeitung sehr großer Volumina, ist aber relativ zeitaufwändig. Neben dieser klassischen Methode gibt es eine ganze Reihe von Reinigungs-Kits, die auf einem vergleichbaren Prinzip beruhen aber, eine sehr viel schnellere Aufarbeitung ermöglichen. Diese Kits sind allerdings deutlich teurer und nur für kleinere Probenmengen einsetzbar.

5.3.3.2.1 Alkalische Lyse (Whitehead-Protokoll)

Die verschiedenen Inkubationszeiten sollten möglichst genau eingehalten und das Protokoll nur an den ausgewiesenen Stellen unterbrochen werden. Aus diesem Grund müssen die notwendigen Lösungen vor Beginn des Protokolls angesetzt und bereitgestellt werden.

Benötigte Lösungen für 500 ml L-Medium:

10 ml Lösung I: 10 mM EDTA in Wasser (pH 8) autoklavieren und bei 4 °C lagern.

20 ml Lösung II: 10 ml 0,2 M Natronlauge mit 10 ml 1% SDS in Wasser versetzen.
(Diese Lösung muss für jede Isolation frisch hergestellt werden!)

15 ml Lösung III: 2,21 g Kaliumacetat in 10,62 ml Wasser lösen, mit 1,38 ml Eisessig versetzen und bei 4 °C lagern.

6 ml TE-Puffer: 10 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 8 in Wasser

3 ml Kaliumacetat Lösung: 7,5 M in Wasser

700 µl 50T/50E: 50 mM Tris, 50 mM EDTA in Wasser

3 ml PCI-Lösung: Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol 25:24:1 (v:v:v)

Herstellung der PCI-Lösung: 50 ml einer 50 mM Lösung von Tris in Wasser wird mit Phenol versetzt bis sich zwei etwa gleich große Phasen gebildet haben. Im Zweifelsfall sollte die untere Phase eher zu klein als zu groß sei. Es ist außerdem darauf zu achten, dass nur farbloses Phenol eingesetzt werden kann. Durch teilweise Oxidation verfärbte Chargen sind nicht mehr geeignet. Die untere Phase wird abgetrennt und 1:1 (v:v) mit einer Lösung von Isoamylalkohol in Chloroform (v:v = 1:24) versetzen. Dabei bilden sich erneut zwei Phasen. Die untere Phase wird in der PCI-Extraktion eingesetzt. Die verwendete Lösung sollte klar und farblos sein.

Weitere Materialien: 31 ml Isopropanol, 20 ml Ethanol (100 %, unvergällt), 400 µl Ethanol (70 %, unvergällt), 20 µl RNase-Lösung (10 mg/ml), 700 µl Chloroform

Ein kleiner Teil der Kulturlösung wird in einer Mischung von 50 % Glycerin in Wasser (v/v) eingefroren. In dieser Form kann die Zellkultur über längere Zeit gelagert und bei Bedarf weiter vermehrt werden. Der Rest der Kulturlösung wird nach dem folgenden Protokoll aufgearbeitet.

5 Experimenteller Teil

- 1.) Kultur-Lösung in 250 ml Zentrifugengläser überführen und zentrifugieren: 5400 rpm bei 4 °C, 15 min. Überstand verwerfen, Restlösung vorsichtig mit der Pipette abziehen.
- 2.) Die beiden Pellets in jeweils 5 ml Lösung I resuspendieren, in einem geeigneten Zentrifugengefäß ($V \geq 50$ ml) vereinigen und 5 min bei RT inkubieren.
- 3.) 20 ml Lösung II zugeben, 3-4 mal invertieren und 10 min bei RT inkubieren.
- 4.) 15 ml gekühlte Lösung III zugeben, invertieren und für 10 min auf Eis stellen. Anschließend zentrifugieren: 13000 rpm bei 4°C, 20 min
- 5.) Überstand in neue Zentrifugengefäße überführen und erneut zentrifugieren: 13000 rpm bei 4°C, 20 min

Der Überstand sollte jetzt klar sein, ansonsten muss dieser Schritt noch ein weiteres Mal wiederholt werden.

- 6.) Überstehende Lösung auf zwei 50 ml Falcons verteilen und jeweils 15 ml Isopropanol zugeben, invertieren, zentrifugieren (5000 rpm bei RT, 20 min) und den Überstand verwerfen.
- 7.) Pellets in jeweils 3 ml TE-Puffer (10 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 8) resuspendieren, mit jeweils 1,5 ml 7,5 M Kaliumacetat-Lösung versetzen, die Lösungen in einem Falcon vereinen und bei -80 °C für mindestens 45 min stehen lassen.

An dieser Stelle besteht die Möglichkeit das Protokoll zu unterbrechen und die Probe über Nacht bei -80 °C zu lagern.

- 8.) Ansatz bei RT auftauen lassen und zentrifugieren (5000 rpm bei RT, 15 min).
- 9.) Überstand in ein neues 50 ml Falcon überführen, mit 20 ml 100 % Ethanol (unvergällt) versetzen, invertieren und mindestens 20 min bei -20 °C stehen lassen.

Alternativ kann die Probe bei -20 °C über Nacht gelagert werden.

- 10.) Zentrifugieren (5000 rpm bei 4 °C, 15 min), den Überstand verwerfen und das Pellet in 700 µl 50T/50E resuspendieren.
- 11.) 20 µl RNase (10 mg/ml) zugeben und die Lösung in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführen, anschließend 45 min bei 37°C im Wasserbad inkubieren.

- 12.) Von der unteren Phase der PCI-Lösung werden 700 µl zugegeben, gut invertiert und anschließend zentrifugiert (14000 rpm bei RT, 10 min)
- 13.) Die obere, wässrige Phase muss jetzt noch 2-3 mal mit PCI extrahiert werden. Um Verluste zu minimieren, sollte die jeweils auftretende „Zwischenphase“ erst im letzten Extraktionsschritt abgetrennt werden.
- 14.) Die wässrige Phase in ein neues Eppie überführen, 700 µl Chloroform zugeben, gut invertieren und zentrifugieren (14000 rpm bei RT, 10 min)
- 15.) Die obere Phase in ein neues 1,5 ml Eppie überführen, 700 µl Isopropanol zugeben, invertieren und zentrifugieren (14000 rpm bei RT, 20 min).

Diese Fällung kann man auch bei 4 °C über Nacht durchführen und die Probe am nächsten Tag zentrifugieren.

- 16.) Der Überstand wird verworfen und vorsichtig 400 µl 70 % EtOH (unvergällt) zugegeben. Hierbei soll das Pellet nicht aufgeschüttelt werden. Anschließend zentrifugieren (14000 rpm bei RT, 20 min)
- 17.) Den Überstand vorsichtig abgießen (Pellet kann instabil sein!) und mit der Exsiccatorfunktion des Konzentrators trocknen.
- 18.) Nach dem Trocknen nimmt man das Pellet in 300 µl HPLC-Wasser auf. Hierfür wird das Wasser zugegeben und mehrfach mit der Pipette vorsichtig auf und ab gezogen. (Schnelles Pipettieren kann unter Umständen zu Scherkräfte führen die Einzelstrangbrüche im Plasmid erzeugen.) Nach 10-15 min bei RT wird diese Prozedur noch einmal wiederholt, um eine quantitative Aufnahme der DNA zu garantieren.

Auf diese Weise wurden aus 1 L Nährmedium, nach dem Doppelverdau mit EcoRI und HindIII, insgesamt 2580 µg DNA erhalten.

5.3.3.2.2 GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas)

1,5 ml der Zellkultur werden im Standardrotor für 1,5 ml Reaktionsgefäße für 2 min zentrifugiert (Eppendorf 5417c, 8000 rpm, RT). Zelllösungen sollten nicht zu stark bzw. zu lange zentrifugiert werden, da sich das Pellet sonst nur sehr schwer resuspendieren lässt. Die überstehende Lösung wird abgenommen und anschließend nach den Angaben des Herstellers verfahren. Die Zentrifugationsschritte wurden in einer Tischzentrifuge (Eppendorf 5417c) bei RT und 14000 rpm durchgeführt.

5.4 Enzymatische Umsetzungen

5.4.1 Sequenzspezifische Erzeugung von Doppelstrangbrüchen

Die verwendeten Endonukleasen (HinfI, BsaHI, BcgI, EcoRI und HindIII) führen alle zur Bildung von überhängenden Enden. Die genauen Erkennungssequenzen und Schnittstellen, sowie die Art der resultierenden Überhänge ist im Anhang E angegeben. Die PCR-Lösungen wurden zuvor über Ultrafiltration (AmiconUltra, Millipore) bzw. durch Adsorption an Silika (NucleoSpin Extract II, Macherey-Nagel) gereinigt, in Milli-Q-Wasser aufgenommen und die DNA-Konzentration mittels UV-Absorption bestimmt. Das angegebene Volumen der PCR-Lösung entspricht jeweils 1 µg dsDNA (ca. 600 bp). Wenn andere Volumina eingesetzt werden sollen, muss das Gesamtvolumen mit der entsprechenden Menge an Wasser auf 100 µl eingestellt werden. Die Erkennungssequenz der verschiedenen Endonukleasen ist jeweils nur einmal im eingesetzten PCR-Produkt vorhanden.

HinfI: 47,7 µl Milli-Q-Wasser
 41,3 µl PCR-Lösung
 10,0 µl 10 x NEBuffer
1,0 µl HinfI (10 Units)
 $V_{\text{ges}} = 100 \mu\text{l}$

BsaHI: 46,7 µl Milli-Q-Wasser
 41,3 µl PCR-Lösung
 210,0 µl 10 x NEBuffer 4
 1,0 µl BSA
1,0 µl BsaHI (10 Units)
 $V_{\text{ges}} = 100 \mu\text{l}$

BcgI: 36,7 µl Milli-Q-Wasser
 41,3 µl PCR-Lösung
 10,0 µl NEBuffer 3
 10,0 µl SAM (Originallösung 1:160 verdünnt)
2,0 µl BcgI (4U)
 $V_{\text{ges}} = 100 \mu\text{l}$

Die verschiedenen Ansätze werden 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgt die Deaktivierung der Enzyme durch eine Hitzebehandlung von 20 min bei 80 °C. Die Schnittstellen der verwendeten Enzyme liegen alle in der Nähe der Enden des eingesetzten PCR-Produktes. Dadurch entsteht jeweils ein Fragment mit einer relativ kurzen Sequenz. Die Längen der erhaltenen Fragmente kann daher mittels denaturierender PAGE (20 %) überprüft werden.

Doppelverdau mit EcoRI und HindIII: Die Restriktion eines DNA Substrates mit zwei verschiedenen Enzymen im gleichen Ansatz ist eine gängige Methode. Es müssen jedoch einige Details beachtet werden. Die Erkennungssequenzen der beiden Enzyme dürfen natürlich nicht identisch sein und sollten sich auch nicht überschneiden. Des Weiteren sollten die Schnittstellen nur jeweils einmal in der gesamten Sequenz auftreten. Diese Informationen lassen sich leicht aus der entsprechenden Restriktionskarte des verwendeten DNA-Substrats entnehmen. Für nicht kartierte Sequenzen gibt es verschiedene Online Tools die eine entsprechende Sequenzanalyse durchführen [196]. Restriktionsenzyme reagieren außerdem, wie die meisten Enzyme, relativ sensibel auf die Art und die Konzentration des verwendeten Reaktionspuffers. Die Hersteller bieten für jedes Enzym einen individuell optimierten Puffer an. Bei einem Doppelverdau muss deshalb ein Puffer verwendet werden, in dem beide Enzyme eine möglichst hohe Aktivität zeigen. Bei einigen Enzymen muss zusätzlich die Möglichkeit einer unspezifischen Restriktion, der sogenannten „Star Activity“ berücksichtigt werden. Gerade die Star Activity von EcoRI ist aber weitgehend untersucht und leicht zu vermeiden [197, 198]. Eine gute Einführung zum Thema Star Activity findet sich auf der Internetseite von New England Biolabs [199].

Die hier angegebene Versuchsbeschreibung bezieht sich auf den Doppelverdau nach der Amplifizierung von pDmirAmyRelXba0,6 mittels PCR und anschließender Fällung in Ethanol. Die eingesetzten 100 µl DNA-Lösung enthielten ca. 3-4 µg DNA. Der Ansatz sollte aber in der Regel auf andere DNA-Lösungen übertragbar sein. Enzymatische Umsetzungen reagieren in erster Linie sensibel auf die Zusammensetzung und Konzentration des verwendeten Puffers. Art und Konzentration der DNA spielen nur eine untergeordnete Rolle.

100 µl DNA-Lösung

30 µl Puffer B (Roche, vormals Boehringer Mannheim)

2 µl EcoRI

2 µl HindIII

166 µl HPLC-Wasser

$V_{\text{ges}} = 300 \mu\text{l}$

Der Ansatz wird bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Für das untersuchte System ist die Restriktion nach 3,5 h quantitativ, im Zweifelsfall kann aber auch über Nacht inkubiert werden. Die Reaktion lässt sich durch Einfrieren stoppen. Eine vollständige Deaktivierung der Enzyme wird durch eine Inkubation von 15 min bei 65 °C erreicht. Der Erfolg der Restriktion wurde nach Fällung in Ethanol durch Gelelektrophorese auf einem Combigel (1 % Agarose, 4 % Polyacrylamid) überprüft.

5.4.2 Sequenzspezifische Erzeugung von Einzelstrangbrüchen

Restriktion mit Nt.BstNBI

Im Unterschied zu den oben verwendeten Endonukleasen wird bei der Restriktion mit Nt.BstNBI nur ein Strang einer dsDNA gespalten. Genaue Angaben zur Erkennungssequenz und der Lage der Schnittstelle finden sich im Anhang E. Für die verwendeten PCR-Lösung gelten die am Anfang von Abschnitt 5.4.1 aufgeführten Anmerkungen.

47,7 µl Milli-Q-Wasser

41,3 µl PCR-Lösung

10 µl NEBuffer 3

1 µl Nt.BstNBI

$V_{\text{ges}} = 100 \mu\text{l}$

Inkubation: 1,5 h bei 55°C

Deaktivierung des Enzyms: 20 min bei 80°C

Da auch hier die Schnittstellen des Enzyms sehr nah am Ende des eingesetzten PCR-Produktes liegen, kann das erhaltene Einzelstrangfragment auf einem denaturierenden Polyacrylamid Gel (20 %) nachgewiesen werden.

USER Reaktion

Das USER™ Enzym (Uracil-Specific excision reagent) ist eine Mischung von Uracyl DNA glycosylase und DNA glycosylase-lyase Endo VII. Diese Mischung wird benutzt, um selektiv die modifizierte Base 2'-Desoxyuridin aus einer DNA-Sequenz herauszuschneiden. Die neu gebildeten DNA-Enden erhalten beide ihre „biologisch intakte“ Form, d.h. es wird eine 3'-OH-Gruppe und eine 5'-Phosphatgruppe gebildet. Diese Base lässt sich durch 2'-Desoxyuridin-modifizierte Primer an einer genau definierten Stellen in ein PCR-Produkt einführen. Es wurden zwei verschiedene Ansätze getestet.

Ansatz laut Standard-Protokoll des Herstellers:

Dieser Ansatz ist so ausgelegt, dass die PCR-Lösung direkt, ohne vorherige Reinigung, in der USER-Reaktion eingesetzt werden kann.

10 µl PCR-Lösung

1 µl USER Enzym

$V_{\text{ges}} = 11 \mu\text{l}$

Ansatz laut Unit-Definition des USER-Enzyms:

Für diesen Ansatz müssen die uracilhaltigen Primer vor der USER-Reaktion abgetrennt und die Konzentration der Lösung mittels UV-Absorption bestimmt werden. Im Vergleich zur Unit-Definition wird die doppelte Menge an Enzym verwendet. Obwohl dieser Überschuss eingesetzt wird lassen sich 75 % des Enzyms im Vergleich zum Standard-Protokoll einsparen

500 µl PCR-Lösung (11,75 µg, ca. 30 pmol DNA) werden bei RT im Konzentrator vollständig eingeeengt und anschließend mit den folgenden Komponenten versetzt.

44 µl Milli-Q-Wasser

5,5 µl 10 x ThermoPol Puffer

5,5 µl USER-Enzym

$V_{\text{ges}} = 55 \mu\text{l}$

Höher konzentrierte DNA-Lösungen können natürlich auch ohne vorheriges Eindampfen verwendet werden. Wichtig ist nur, dass die Puffer- und Enzym-Konzentrationen richtig eingestellt werden. Die USER Reaktion ist aber auch mit vielen anderen Puffersystemen kompatibel (Vergl.: Instruction Manual, USER Friendly Cloning Kit, Appendix III, NEB).

5.4.3 Ligation

In dieser Arbeit wurden ausschließlich DNA-Fragmente mit überhängenden Ende ligiert. Für die Ligation von stumpfen Enden müssen die Angaben des Herstellers beachtet werden. Die Zusammensetzung der Reaktionslösung ist abhängig von der Art des zu ligierenden Systems.

Ligation von supramolekularen Strukturen aus Oligonukleotiden

Für einen Ansatz von 300 µl Gesamtvolumen wird eine stöchiometrische Mischung der DNA-Fragmente (300 pmol von jedem Fragment) mit 30 µl 10 x Ligase Puffer versetzt und mit Milli-Q-Wasser auf 296 µl aufgefüllt. Nach gründlichem Durchmischen erfolgt die Hybridisierung (Temperaturprogramm: Hyb90.CYC). Anschließend wird die Lösung im Kühlschrank (ca. 4-10 °C) vorgekühlt, mit 4 µl T4 DNA Ligase (Roche) versetzt und über Nacht bei 4-10 °C inkubiert. Der Erfolg der Ligation wird auf einem denaturierenden Polyacrylamid Gel kontrolliert.

Ligation von Restriktionsfragmenten mit Oligonukleotiden

Bei der Ligation von Oligos an dsDNA mit kurzen überhängenden Enden, können die Oligomere im Überschuss eingesetzt werden. Auf Grund der kurzen überhängenden Sequenzen (typischer Weise 4-6 Basen) ist für die Hybridisierung kein Temperaturprogramm erforderlich.

In einem 30 µl Ansatz wird 1 µg dsDNA (ca. 600 bp, ca. 2,8 pmol) mit jeweils 3-5 Äquivalenten der beiden Oligos und 3 µl 10 x Ligase Puffer versetzt. Nach gründlichem Durchmischen gibt man 2-5 µl (2-5 Units) T4 DNA Ligase zu. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 4-10 °C, bzw. bei RT. Nicht ligierte Oligonukleotide können durch Adsorption an Silika (NucleoSpin[®] Extract II, Macherey-Nagel), selektive Fällung, Ultrafiltration oder GPC abgetrennt werden. Der Erfolg der Ligation kann auf einem Agarosegel überprüft werden. Auf Grund der geringen Massendifferenzen zwischen Ausgangsmaterial und ligiertem Produkt erfordert die Auftrennung eine deutlich größere Laufstrecke als bei den gängigen analytischen Agarosegelen. Am günstigsten ist ein vertikales Gelelektrophoresesystem (Geldimensionen: 180 x 130 x 3 mm, Eigenbau AK Prof. E. R. Schmidt)

5.4.4 Enzymatische Phosphorylierung von Oligonukleotiden

Oligonukleotide, die noch keine 5'-Phosphatgruppen tragen können bei Bedarf enzymatisch phosphoryliert werden (Polynukleotid Kinase, Roche, bzw. Antarctic Phosphatase, NEB). Eine chemische Phosphorylierung von Oligonukleotiden in der Festphasensynthese ist aber in der Regel effektiver. Alle Komponenten sollten auf Eis angesetzt, vorsichtig durchgemischt und anschließend für 30 min bei 37 °C inkubiert werden.

1 µl Oligonukleotid-Lösung (167 ng = 20 pmol 5'-OH-Gruppen)

2 µl 10 x Phosphorylierungs Puffer

1 µl ATP-Lösung (10 mM)

14 µl HPLC-Wasser

2 µl Polynukleotid Kinase (20 Units)

$V_{\text{ges}} = 20 \mu\text{l}$

Die Reaktion lässt sich durch Kühlen im Eisbad stoppen. Der Umsatz (die Herstellergarantie liegt bei 30 %) kann durch Fällung mit Trichloressigsäure bestimmt werden [200]. Anschließend wird das phosphorylierte Oligo durch Fällung von den restlichen Komponenten abgetrennt. Die Aufreinigung erfolgte durch Fällung mit Isopropanol, wie unter 5.3.2.1 beschrieben. Diese Methode ist aber eigentlich nur für dsDNA erforderlich. Bei der Phosphorylierung von Oligonukleotiden kann die Fällung ebensogut ohne Salzzugabe erfolgen.

5.4.5 Dephosphorylierung

In einigen Fällen ist es erwünscht die Ligation bestimmter DNA-Fragmente zu unterbinden. Dies lässt sich durch das Entfernen der 5'-Phosphatgruppe mittels Phosphatasen erreichen. Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt:

2 µg DNA-Fragment (ca. 600 bp) mit 5'-Überhang

2 µl 10 x Antarctic Phosphatase Reaction Buffer (NEB)

2 µl Antarctic Phosphatase (10 Units, NEB)

x µl HPLC-Wasser

$$V_{\text{ges}} = 20 \mu\text{l}$$

Inkubation: 90 min bei 37°C

Deaktivierung des Enzyms: 20 min bei 80°C

Bei der Wahl der Inkubationszeit spielt die Art des dsDNA-Endes eine Rolle. Bei glatten Enden oder 5'-Überhängen ist im Vergleich zu 3'-Überhängen eine deutlich kürzere Inkubationszeit ausreichend. Bezogen auf die DNA-Konzentration und den verwendeten Puffer ist die Phosphatase sehr variabel einsetzbar (vgl. Angaben des Herstellers im Beipackzettel).

5.5 Analysen- und Trennmethoden

5.5.1 Gelelektrophorese

Für **Acrylamidgele** 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. Für analytische **Agarosegele** wurde standardmäßig das vertikale System GENTERphorese™ der Firma GENTERprise Genomics eingesetzt. Bei speziellen Trennproblemen, die eine höhere Auflösung erfordern, wurde ein größeres vertikales System verwendet (Geldimensionen: 180 x 130 x 3 mm, Eigenbau AK Prof. E. R. Schmidt, Institut für molekulare Genetik, Johannes Gutenberg Universität, Mainz). Die **Geldokumentation** 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 Scion Image (Scion Corporation) durchgeführt.

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 abgekühlt. 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.

Präparative PAGE:

Für die präparative PAGE können dieselben Bedingungen wie für analytische Gele eingesetzt werden. Bei einem Kamm mit 15 Zähnen liegt die maximale Probenmenge bei 280 µg pro Gel. Für größere Probenmengen wäre prinzipiell die Verwendung eines dickeren Spacersatzes möglich, die Auflösung wird aber mit zunehmender Geldicke schlechter. 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 Exsiccatorfunktion des Konzentrators oder durch kurzes Erwärmen auf 50-60 °C von Ethanolresten befreit werden.

Analytische Agarose- und Kombigele:

Die Agarose wird mit TBE-Puffer angesetzt und in der Mikrowelle durch mehrfaches Aufkochen in Lösung gebracht. Bei Kombigelten wird die Agaroselösung nach dem Aufkochen mit der entsprechenden Menge Acrylamid / Bisacrylamid versetzt. Erst wenn die Lösung auf ca. 35-40 °C abgekühlt ist, können APS und TEMED zugesetzt werden, da bei höheren Temperaturen die Polymerisation zu schnell einsetzt. Bei zu tiefen Temperaturen beginnt die Agarose zu gelieren.

Rückgewinnung von DNA aus Agarosegelen:

Es wurden zwei verschiedene Methoden eingesetzt: Elektroelution bzw. Solubilisierung der Agarose und anschließende Aufarbeitung über NucleoSpin Extract II. Bei der Elektroelution wurden die Gelstücke in einem Dialyseschlauch mit Puffer versetzt und in ein Spannungsfeld gebracht. Die eluierte DNA wurde durch PCI-Extraktion und Fällung in Ethanol gereinigt. Nach den praktischen Erfahrungen in dieser Arbeit, ist diese Methode nicht zu empfehlen, da sie extrem schlechte Ausbeuten lieferte. Es gibt aber verschiedenste kommerziell erhältliche Systeme zur Elektroelution, die evtl. zu besseren Ausbeuten führen. Die Solubilisierung und Aufarbeitung über NucleoSpin (NucleoSpin[®] Extract II, Macherey-Nagel) lieferte deutlich bessere Ergebnisse. Hier wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen.

5.5.2 CEE (Continuous Elution Electrophoresis)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, die es ermöglicht deutlich größere Mengen an Oligonukleotiden von den Fehlsequenzen abzutrennen. Die CEE wird in der Regel zur präparativen Trennung von Proteinen über Acrylamidgele eingesetzt. Der schematische Aufbau des verwendeten Systems (Model 491 PrepCell, Bio-Rad) ist in Abb. 159 dargestellt.

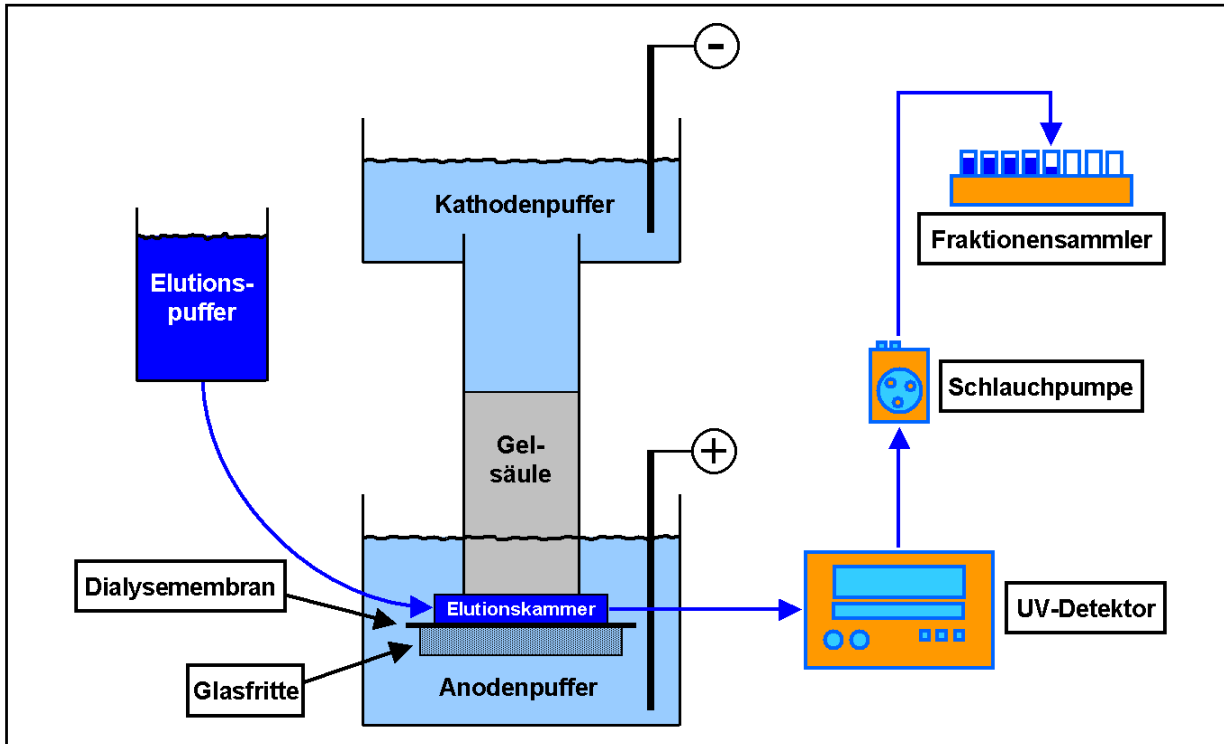


Abb. 159: Schematischer Aufbau der CEE (Continuous Elution Electrophoresis). Bei der CEE wird die Gellösung nicht zwischen zwei Glasplatten, sondern in eine Glasröhre gegossen, so dass eine Gelsäule gebildet wird, die eine deutlich größere Oberfläche aufweist als die typischerweise eingesetzten analytischen Gele. Die Probe wird auf die Oberfläche der Gelsäule aufgetragen. Die angelegte Spannung wird so lange aufrechterhalten, bis die DNA am unteren Ende aus der Säule eluiert. Direkt unter der Gelsäule befindet sich die Elutionskammer, die durch eine Dialysemembran und eine Glasfritte vom Anodenpuffer getrennt ist. Dadurch wird eine Vermischung von Elutionspuffer und Anodenpuffer verhindert, ohne den elektrischen Kontakt zwischen Anode und Katode zu unterbrechen. Durch die Elutionskammer wird ein kontinuierlicher Pufferstrom geleitet, der die aufgetrennten Moleküle durch einen Detektor in den Fraktionensammler transportiert.

Bei Verwendung der dünneren Gelröhre (i.d. = 28 mm) werden knapp 20 ml Gellösung für eine 5 cm hohe Gelsäule benötigt. Zur Erzeugung einer einheitlichen Gelmatrix darf sich die Lösung während der Polymerisation nicht zu stark erhitzen. Aus diesem Grund wird eine deutlich kleinere Menge an Initiator zugegeben (0,2 Vol% 10 %ige (w/v) APS-Lösung, 0,02 Vol% TEMED). Ansonsten wird die Gellösung wie in der analytischen PAGE angesetzt. Während der Polymerisation wird der Kühlfinger, im Zentrum der Gelsäule (in Abb. 159 nicht dargestellt), auf 22 °C temperiert. Nach dem Gießen des Gels (5 cm Gelsäule) wird die Lösung vorsichtig 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. Vor der Trennung wird der interne „Kühlkreislauf“ über eine thermostatisierte Glaswendel auf

49 °C temperiert (Durchfluss: ca. 80-100 ml/min). Zusätzlich wird die untere Pufferkammer in ein Wasserbad gestellt, das an den externen Kreislauf des gleichen Thermostaten angeschlossen ist. Nach dem Auftragen der Probe werden die maximal zulässigen Werte an der Spannungsquelle eingestellt (500 V, 40 mA, 20 W). Die Elektrophorese erfolgt dadurch bei einem konstantem 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 aufkonzentriert.

Mit dieser Methode konnten 500 µg eines Oligonukleotids (62 Basen), in einem Trennungsschritt von den Fehlsequenzen abgetrennt werden. Das Auflösungsvermögen der CEE erreicht annähernd das der analytischen PAGE. Nach drei Mischfraktionen, die noch einen gewissen Anteil an Fehlsequenzen enthalten, eluiert das reine Oligonukleotid (vgl. Abschnitt ...). Die Rückgewinnungsrate der Methode liegt bei etwa 80-90 %. Die Ausbeute an gereinigtem Oligo liegt mit 36 % etwas höher, als bei der Rückgewinnung aus analytischen Gelen durch Extraktion. Die Gesamtmenge an gereinigter DNA, die in einem Trennungsschritt gewonnen werden kann, wurde im Vergleich zur herkömmlichen Methode um das Drei- bis Fünffache erhöht. Auch bei Trennversuche mit 1000 µg DNA wurden keine Anzeichen einer Überladung festgestellt. Die maximal einsetzbare Probenmenge konnte bisher noch nicht bestimmt werden.

5.5.3 NMR-Spektroskopie

NMR-Spektren wurden auf einem 300 MHz-Spektrometer (Bruker 300 UltraShield) gemessen. Die Probenkonzentration betrug ca. 10 mg/ml. DNA-Proben wurden durch mehrfaches Lösen und Einengen in D₂O überführt. Zur Bestimmung der chemischen Verschiebung wurde das Restsignal des deuterierten Lösungsmittels, als interner Standard verwendet.

5.5.4 AFM

Die Untersuchungen der DNA-Strukturen erfolgten im tappingTM-Modus an Luft, mit einem MultiModeTM Scanning Probe Microscope (Nanoscope IIIa-Controller, Digital Instruments). Die verwendeten Siliciumcantilever 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.

5.5.5 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: Sinapinsäure, Salz: Natriumtrifluoracetat.) Oligonukleotide bzw. DNA-PEO-Hybridstrukturen konnten nur an einem Spektrometer der Firma biomers.net GmbH in Ulm zufriedenstellend gemessen werden. (Shimadzu, Matrix: 3-Hydroxypicolinsäure + 15 % Diammoniumcitrat + 10 % Picolinsäure) Mit den drei verschiedenen Spektrometern, die an der Universität Mainz zur Verfügung standen, war es nicht möglich saubere Spektren aufzunehmen.

6 Anhang

A: Abkürzungsverzeichnis

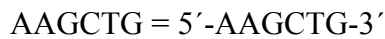
AFM:	Atomic Force Microscopy
Amp:	Ampicillin (Antibiotikum)
Äq.:	Äquivalente
ATP:	Adenosintriphosphat
Ac:	Acetyl
Boc:	<i>tert</i> -Butyl-oxycarbonyl
CDI:	Carbonyldiimidazol
CEE:	Continous Elution Electrophoresis
CPG:	Controlled Porouse Glass
DC:	Dünnschichtchromatographie
dNTPs:	Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
dNMPs:	Desoxyribonukleosidmonophosphate (dAMP, dGMP, dCMP, dTMP, dUMP)
EDC:	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide
EDTA:	Ethylendiamintetraacetat
Et:	Ethyl
FRET:	Fluorescens Resonance Energy Transfer ("Förster Transfer")
GPC:	Gelpermeationschromatographie
HEPES:	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperaziny)-ethansulfonsäure
l_p :	Persistenzlänge

MES:	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MWCO:	Molecular Weight CutOff
MALDI-TOF MS:	MatrixAssisted LaserDesorbtionIonisation Time of Flight MassSpectrometry
NMR:	Nuclear Magnetic Resonance
NEB:	New England Biolabs
PAA:	Polyacrylamid
PAGE:	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCI-Extraktion:	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion
PNAs:	Peptide Nucleic Acids
PD:	Polydispersität
RT:	Raumtemperatur
Sdp.:	Siedepunkt
SAM:	S-Adenosylmethionin
TAE:	Tris-Acetat-EDTA
THF:	Tetrahydrofuran
Tfa:	Trifluoracetat
TXR:	Texas Red
T _m :	Schmelzpunkt (Im Bezug auf DNA gibt der Schmelzpunkt die Temperatur an, bei der 50 % der Einzelstränge im Doppelstrang gebunden sind.)
Tris:	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol Synonyme: Tris base, Trizma [®] oder Trizma [®] -Base, Tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tromethamin, Trometamol, THAM
X-Gal:	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid

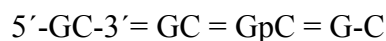
B: Nomenklatur

Konventionen zur Notation von DNA-Sequenzen:

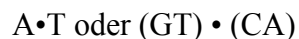
Eine Sequenz wird immer vom 5'-Ende zum 3'-Ende geschrieben:



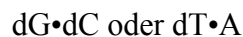
Bei kurzen Basenabfolgen wird teilweise die Phosphatgruppe durch ein p explizit vermerkt oder die Basen werden durch eine Strich voneinander getrennt:



Basenpaarungen werden durch eine Punkt symbolisiert:



In manchen Fällen wird für Desoxyribose ein d vor die jeweilige Base gestellt. Auf diese Weise kann, beispielsweise bei gemischten Doppelsträngen, explizit zwischen DNA und RNA unterschieden werden:



Wiederholt auftretende Sequenzen, Basen oder Basenpaarungen werden in der Regel in Klammern, mit der Vorsilbe poly oder mit einer tiefgestellten Zahlenangabe dargestellt:

Einzelstrang: poly(A), poly(GAT) oder (CGT)₄ bzw. poly(AT) = poly(dA-dT)

Doppelstrang: poly(A) • poly(T) oder poly(GAT) • poly(ATC)

In vielen Schemata werden DNA-Sequenzen als Pfeile symbolisiert. Hier gilt die Konvention, dass die Pfeilspitze das 3'-Ende der Sequenz symbolisiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wird Komplementarität durch ein c markiert, d.h. die Sequenzen S2 und S2c oder M2 und M2c sind zueinander komplementär.

C: Verwendete Fachausdrücke

Archaeen (früher auch als Archaeobakterien oder Urbakterien bezeichnet) bilden neben den Bakterien und den Eukaryoten eine der drei Domänen, in die alle zellulären Lebewesen eingeteilt werden. Archaeen sind Mikroorganismen mit ähnlichen äußeren Merkmalen wie die Bakterien (einfache Zellen ohne Kern oder Organellen) und zählen daher zu den Prokaryoten. Die Gene für zentrale Bereiche (wie die Produktion von Proteinen) ähneln aber eher denen der Eukaryoten, als denen der Bakterien. Lange Zeit sah man in den Archaeen den Vorläufer von Prokaryoten und Eukaryoten, daher der Name „Urbakterien“. Erst seit 1990 werden die Archaeen als eigenständige Domänen (*Archaea*) neben den Domänen der Bakterien (*Bacteria*) und Eukaryoten (*Eukarya*) eingeordnet.

Antigene (engl. für **Antibody generating**) bilden keine einheitliche Stoffklasse, sondern die Bezeichnung bezieht sich auf ihre Wirkungsweise: Antigene sind demnach alle Stoffe, gegen die das Immunsystem Antikörper bilden kann.

Antikörper (im internationalen Sprachgebrauch auch Immunglobulin) sind Proteine aus der Klasse der Globuline, die als Reaktion auf bestimmte Stoffe (s.g. Antigene) gebildet werden und somit einen zentralen Bestandteil des Immunsystems höherer Wirbeltiere darstellen. Die Bindung der Antikörper an Antigene führt entweder direkt zur Blockierung des Antigens oder zur Aktivierung verschiedener Mechanismen, die zur Zerstörung des Antigens führen.

Aptamere sind kurze einzelsträngige DNA- oder RNA-Oligonukleotide (25–70 Basen), die sehr spezifisch an Proteine, Aminosäuren, Antibiotika oder auch an Viruspartikel binden [201]. Die Bindung an ihre Zielmoleküle führt zu Dissoziationskonstanten, die im gleichen Bereich liegen wie bei Antikörpern. Aptamere vereinen dabei die günstigen Eigenschaften von kleinen Molekülen (chemische Stabilität, niedrige Immunogenität) und Antikörpern (hohe Spezifität und Affinität, Fähigkeit der gezielten Beeinflussung von Protein-Protein-Interaktionen). Durch ihre Fähigkeit, die Funktion einzelner Proteine in der Zelle gezielt auszuschalten, können Aptamere als Therapeutika, in der medizinischen Diagnostik und der Umweltanalytik eingesetzt werden.

Antisense-Oligonukleotide sind, ebenso wie Aptamere, oligomere DNA-Sequenzen, die selektiv an ein bestimmtes Zielmolekül binden. Während der Wirkmechanismus von Aptameren oder Antikörpern auf der direkten Hemmung von Proteinen beruht, treten Antisense-Oligonukleotide bereits mit der mRNA in Wechselwirkung und verhindern somit, durch Blockieren der Translation, die Biosynthese des entsprechenden Proteins.

Autoreplikativ bezeichnet die Fähigkeit eines Systems, unter Beanspruchung äußerer Hilfe, eine Kopie von sich selbst anzufertigen. Die Selbstreplikation dagegen bezeichnet eine vollständig autonome Vervielfältigung ohne äußere Hilfe. Plasmide sind also autoreplikative Systeme, da sie zwar auf die enzymatische Maschinerie der Zelle angewiesen sind, aber mit deren Hilfe in der Lage sind, sich unabhängig von der genomischen DNA oder der Zellteilung zu replizieren.

Bakteriophagen (oder kurz Phagen) sind eine Gruppe von Viren, die auf Bakterien und Archaeen als Wirtszellen spezialisiert sind.

blau-weiß Selektion: vgl. Abschnitt 2.5

Denaturierung: Von Denaturierung spricht man in erster Linie bei DNA, und Proteinen. Gemeint ist die Zerstörung der natürlich auftretenden Konformation, d.h. im Falle von DNA ist die Denaturierung der Übergang von der Doppelhelix in die beiden Einzelstränge.

Direct Repeats: Direkte Wiederholung gleicher Sequenzabschnitte (AGCCAGCC). Neben „Direct Repeats“ gibt es die Begriffe des „Inverted Repeat“ (AGCCGGCT, entspricht einer palindromischen Sequenz) und des „Mirror Repeats“ (AGCCCCGA). Diese drei Symmetrieelemente können zu unterschiedlichen Fehlpaarungen führen: Direct Repeats ermöglichen eine Verschiebung von komplementären Strängen, Inverted Repeats sind selbstkomplementär und können in supercoiled-DNA zur Bildung von Kreuzstrukturen führen (wenn die selbstkomplementären Sequenzen durch einen Abschnitt von einigen Basen getrennt sind kann es auch zur Bildung von Hairpins kommen) und Mirror Repeats neigen in einigen Fällen zur Bildung von Tripelhelices.

Doppelverdau: Gleichzeitige Restriktion mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen im selben Ansatz.

Elektroelution: Die Elektroelution ist eine Methode zur Rückgewinnung von DNA im Anschluss an die Gelelektrophorese. Bei dieser Methode wird die DNA nicht aus dem Gel extrahiert, sondern die DNA-Moleküle wandern unter dem Einfluss einer elektrischen Spannung aus dem Gel heraus (vgl. Abschnitt 5.5.1).

Elektroporation: Bei der Elektroporation wird die Zellmembran elektrokompenter Zellen durch einen kurzen Spannungspuls permeabel gemacht, um DNA aus freier Lösung in Zellen einzuschleusen.

Entsalzen: Bei synthetischen Oligonukleotiden wird das Abtrennen der Schutzgruppen auch als Entsalzen bezeichnet.

Erkennungssequenz: Bei Restriktionsenzymen muss zwischen der Erkennungssequenz und der Schnittstelle unterschieden werden. Die Erkennungssequenz führt zur sequenzspezifischen Bindung des Enzyms an die DNA bzw. RNA. Die Schnittstelle gibt an, an welcher Stelle das Polymerrückgrad gespalten wird. Je nach Enzym liegt die Schnittstelle innerhalb oder außerhalb der Erkennungssequenz.

Eukaryoten: Unter Eukaryoten (bzw. Eukaryonten) werden alle Lebewesen mit Zellkern und Zellmembran zusammengefasst. Alle anderen zellulären Lebewesen, die keinen echten Zellkern besitzen (Archaeen und Bakterien), werden als Prokaryoten (bzw. Prokaryonten) bezeichnet. Eukaryoten sind in der Regel um ein Vielfaches größer als Prokaryoten (ca. 10-100 mal). Der Zellraum ist in verschiedene Kompartimente, die Zellorganellen, unterteilt. Struktur und Form wird der eukaryotischen Zelle durch ein Cytoskelett verliehen.

Endonukleasen sind Nukleasen, die zu einer Spaltung des Polymerrückgrads von DNA bzw. RNA innerhalb der Sequenz führen.

Exonukleasen sind Nukleasen, die eine DNA- oder RNA-Sequenz vom Ende her abbauen.

Gene sind DNA-Abschnitte, in denen die Grundinformationen zur Herstellung eines bestimmten Proteins gespeichert sind. Die Sequenz eines Gens wird zunächst auf eine komplementäre RNA übertragen (Transskription), die anschließend als Templat für die eigentliche Proteinsynthese dient (Translation). Der Gesamtprozess der Proteinsynthese wird als Genexpression, Expression oder Exprimierung bezeichnet.

Genetische Chimären sind Gene, die aus verschiedenen Teilen, von zwei oder mehr Vorläufergenen zusammengesetzt sind.

Hairpin-Strukturen („Haarnadel-Strukturen“, teilweise auch als „Stem-loop“ bezeichnet) werden von DNA-Sequenzen mit selbstkomplementären (palindromischen) Abschnitten gebildet. Die Doppelstrangbildung der selbstkomplementären Bereiche führt zu einer Struktur, in der das 5'-Ende von einem Strang des gebildeten Doppelstrangabschnitts über einen Einzelstrang mit dem 3'-Ende des anderen Strangs verknüpft ist. Die thermische Stabilität von Hairpinstrukturen wird sowohl durch die Sequenz und Länge des Doppelstrangs als auch durch die Länge des Einzelstrangabschnitts beeinflusst. Die stabilsten Strukturen entstehen bei einem Einzelstrangabschnitt von 4-8 Basen.

Hybridisierung: Doppelstrangbildung zwischen komplementären Sequenzen.

Immunoglobulin: siehe Antikörper

Integrat: Ein Integrat (in vielen Fällen auch als „Insert“ bezeichnet) ist ein DNA-Abschnitt, der in einen Vektor eingebaut wird.

Inverted Repeats: Englischer Ausdruck für palindromische Sequenzen.

Klon: Für den Begriff des Klons gibt es zwei verschiedene Definitionen:

1. Die durch ungeschlechtliche Vermehrung entstandene Nachkommenschaft.
2. Eine Zellpopulation mit identischen Kopien einer DNA.

Im Rahmen von Klonierungsexperimenten sind Klone demnach die verschiedenen Bakterienkulturen, die durch Zellteilung der individuellen Zellen auf dem Nährmedium gebildet werden. Im weiteren Sinne werden aber auch die rekombinanten Plasmide als Klon bezeichnet.

Ligation: Unter Ligation versteht man die kovalente Verknüpfung von DNA- bzw. RNA-Fragmenten, durch enzymatische Veresterung der 5'-Phosphatgruppe des einen Fragments mit der 3'-OH-Gruppe des anderen.

Mutagenese: Zufällige oder gezielte Erzeugung von Mutationen.

Multiple Cloning Site: Die Multiple Cloning Site (MCS, im deutschen auch als „Polylinker“ bezeichnet) ist ein DNA-Abschnitt in einem Vektor, dessen Sequenz aus direkt hintereinander liegenden Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen besteht. Die Restriktionsstellen der MCS treten typischerweise nur einmal im gesamten Vektor auf. Dadurch kann im Rahmen eines Klonierungsexperiments, für das jeweilige Integrat eine passende Restriktionsstelle gewählt werden.

Nuklease: Der Begriff der Nuklease umfasst alle Enzyme, die in der Lage sind die Phosphorsäureesterbindung des Polymerrückgrats einer DNA oder RNA zu spalten. Die Spaltung erfolgt in der Art, dass die resultierenden Fragmente ihre „biologisch intakte Form“, d.h. eine 3'-OH- bzw. eine 5'-Phosphatgruppe erhalten. Zu den Nukleasen zählen sowohl die Endonukleasen als auch die Exonukleasen.

Pelletieren: Feinkörnige Stoffe durch besondere Verfahren zu kleinen kugel- oder walzenförmigen Stücken von einigen Millimetern Durchmesser (Pellets) zusammenfügen.

Palindromische Sequenzen sind selbstkomplementär, d.h. im Unterschied zur üblichen Definition des Palindroms (Anna, Otto, Ein Neger mit Gazelle zagt im Regen nie) muss also der komplementär Strang mit berücksichtigt werden. Beispielsweise ist ATTA im Bezug auf DNA kein Palindrom, AATT oder GCTAGC sind Palindrome, da diese Sequenzen zu sich selbst komplementär sind. Aufgrund der Komplementarität und der gegensinnigen Orientierung der beiden Stränge in der Doppelhelix, bedarf es bei DNA einer gewissen Übung, bis Palindrome sofort ins Auge stechen. Palindrome werden im Englischen auch als „inverted repeats“ bezeichnet.

Pelletieren: Feinkörnige Stoffe durch besondere Verfahren zu kleinen kugel- oder walzenförmigen Stücken von einigen Millimetern Durchmesser (Pellets) zusammenfügen.

PCI-Extraktion: Die PCI-Extraktion ist eine Standardmethode, mit der Enzyme aus einer DNA-Lösung abgetrennt werden können (vgl. Abschnitt 5.3.3.2).

Plasmide sind „kleine“ (1000-25000 bp), in der Regel zirkuläre, DNA-Moleküle, die in Bakterienzellen vorkommen, aber nicht zum Bakterienchromosom zählen. Jedes Plasmid enthält mindestens einen Replikationsursprung (vgl. Replikation). Je nach Art des Replikationsursprungs liegen in einer Bakterienzelle wenige (*low-copy*) oder sehr viele Kopien (*high-copy*) vor. Die meisten Plasmide tragen zusätzliche Gene, die vorteilhafte Eigenschaften wie z.B. Antibiotikaresistenzen kodieren. In Klonierungsexperimenten werden gentechnisch veränderte Plasmide eingesetzt.

Plasmid-Konformationen: Plasmide können in unterschiedlichen Konformationen auftreten:

- Supercoiled: Die Bildung einer supercoiled DNA kann man sich so vorstellen, dass die beiden Enden einer Doppelhelix vor dem Ringschluss stärker verdreht sind als in der regulären B-Helix. Dadurch tritt eine Torsionsspannung im Ring auf, durch die sich die Doppelhelix, wie eine verdrillte Telefonschnur, um sich selbst wickelt.
- single nicked relaxed: Wenn in einer supercoiled DNA ein Einzelstrangbruch erzeugt wird, kann die überschüssige Torsionsspannung durch Drehung um die Helixachse abgebaut werden. Die resultierende Konformation entspricht einer regulären B-DNA, die durch Verknüpfung der Enden zu einem Kreis geschlossen wurde.
- Linear: Wenn in einem Plasmid ein Doppelstrangbruch erzeugt wird, resultiert eine normale lineare B-DNA über.

Präbiotisch: Theorien zur „präbiotischen Welt“ beschäftigen sich mit den verschiedenen Möglichkeiten, in welcher Art die Entwicklung von chemischen Substanzen zu zellulären Lebensformen geführt haben könnte.

Primer: Ein Primer ist ein Oligonukleotid (in der Regel 15-30 Basen), das als Startpunkt der DNA-Synthese in der Polymerase Kettenreaktion eingesetzt wird. Der Primer lagert sich zunächst an einen komplementären Abschnitt auf dem Templatstrang. Anschließend wird das 3'-Ende des Primers anhand der Basenabfolge des Templatstrangs von der Polymerase verlängert.

Primer-Dimere treten fast immer als Nebenprodukt in der Polymerase Kettenreaktion auf. Bei Primerpaaren, die am 3'-Ende zueinander komplementäre Abschnitte tragen ist dieser Effekt leicht zu verstehen: An Stelle der Templat-DNA fungiert in diesem Fall der eine Primer als Matrize bei der Verlängerung des anderen Primers. Das gebildete Doppelstrangfragment entspricht daher ungefähr einem Heterodimer der beiden Primer. Erstaunlicher Weise werden Primer-Dimere aber auch gebildet, wenn die beiden Primer keine komplementären Abschnitte zeigen.

Prokaryoten: siehe Eukaryoten

Promutagene Veränderungen stellen an sich noch keine Mutation dar, führen jedoch beispielsweise bei der Replikation zu einer fehlerhaften Vervielfältigung.

proofreading Polymerasen sind Polymerasen, die in der Lage sind während der Polymerisation die neu synthetisierte Sequenz zu überprüfen, ein falsch eingebautes Nukleotid herauszuschneiden und stattdessen ein richtiges einzubauen.

Rekombinant: Unter rekombinater DNA versteht man ganz allgemein DNA-Sequenzen, die durch die Kombination verschiedener Sequenzabschnitte gebildet wurden. Von rekombinanten Plasmiden spricht man beispielsweise, wenn in einem Klonierungsexperiment nur die Plasmide gemeint sind, bei denen die Einführung des Integrats erfolgreich war.

Replikation: Unter Replikation (oder Reduplikation) versteht man die Vervielfältigung von DNA in einer Zelle.

Restriktionsfragment: Ein Restriktionsfragment ist ein DNA-Fragment, das durch eine Restriktion mit Endonukleasen aus einer DNA herausgeschnitten wurde.

Restriktion: Die Restriktion beschreibt die Einwirkung von Restriktionsendonukleasen (oft auch als Restriktionsenzyme bzw. Endonukleasen bezeichnet) auf DNA bzw. RNA, die zu einer Spaltung des Polymerrückgrats führt. Je nach Enzym ist die Spaltung sequenzspezifisch oder zufällig. An Stelle von „Restringieren“ wird oft vom „Schneiden“, „Verdauen“ oder der „Hydrolyse“ einer DNA gesprochen.

Restriktionsanalyse: Unter einer Restriktionsanalyse versteht man ganz allgemein die Charakterisierung einer DNA durch gezielte Spaltung in Fragmente definierter Größen unter Einsatz von Restriktionsendonukleasen. Aus der Größe der erhaltenen Fragmente lassen sich Rückschlüsse auf die restringierte Struktur ziehen. Durch geschickte Wahl der Enzyme können ganz unterschiedliche Fragestellungen geklärt werden.

Restriktionskarte: Eine Restriktionskarte ist eine schematische Darstellung einer DNA-Sequenz, in der die Lagen der verschiedenen Restriktionsstellen angegeben sind. Wenn für eine DNA-Sequenz keine Restriktionskarte zur Verfügung steht, kann diese mit einer geeigneten Software erzeugt werden [196].

Schmelzpunkt: Im Bezug auf DNA ist mit dem Schmelzpunkt in der Regel nicht der Übergang vom festen in den flüssigen Aggregatzustand gemeint, sondern der Übergang vom Doppelstrang in die beiden Einzelstränge. Der Schmelzpunkt ist definitionsgemäß die Temperatur, bei der 50 % der Einzelstränge in Doppelsträngen gebunden sind.

Schnittstelle: siehe Erkennungssequenz

Selbstkomplementäre Sequenzen: siehe Palindromische Sequenzen

single nicked relaxed: siehe Plasmid-Konformationen

Star Activity: Bei einigen Enzymen kann bei falscher Wahl des Puffers oder bei extrem langen Reaktionszeiten, eine unspezifische Restriktion, die sogenannten „*Star Activity*“ auftreten. Ein typisches Beispiel ist die Star Activity von EcoRI [197, 198]. Eine allgemeine Einführung zum Thema Star Activity findet sich auf der Internetseite von New England Biolabs [199].

Supercoiled: siehe Plasmid-Konformationen

Transformation: Die Transformation ist die Aufnahme von DNA aus freier Lösung in bakterielle Zellen. Im Gegensatz dazu wird die Aufnahme von DNA in eukaryotische Zellen als Transfektion bezeichnet.

Transskription: siehe Gene

Translation: siehe Gene

Vektoren: In der Gentechnik und der Biotechnologie versteht man unter einem Vektor ein genetisches Element, das eine Fremd-DNA in eine geeignete Wirtszelle einbringt und dafür sorgt, dass sie repliziert wird. Es gibt im Wesentlichen drei verschiedene Arten von Vektoren: Plasmidevektoren, Bakteriophagenvektoren und virale Vektoren.

Verdau: siehe Restriktion.

D: 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:

Einseitig geschütztes α,ω -Diaminopolyethylenoxid:

O-(2-Aminoethyl)-O'-[2-(Boc-amino)ethyl]decaethylenglycol (n = 11, Fluka)

α -Amino- ω -hydroxypolyethylenoxide:

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

PEG16 (n = 16), PEG32 (n = 32) Synthetisiert von Tina Kiefer [136]

α -Amino- ω -methoxypolyethylenoxid:

m-dPEG₁₂TM amine (n = 12, Quanta BioDesign)

Polydisperse Polymere:

α -Methoxy- ω -propionsäuresuccinimidylester-polyethylenglycol:

mPEG-SPA-2000 (Nektar Therapeutics, $M = 2000 \pm 500$ g/mol, $PD < 1,05$)

α -Amino- ω -hydroxypolyethylenoxid:

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

Puffer und Nährmedien:

PCR-Puffer:

10 x ThermoPol Puffer, 10 x Standard Taq Puffer, 5 x Phusion HF-Puffer,
5 x Phusion GC-Puffer (NEB)

10 x PCR-Puffer: 15 mM $MgCl_2$ / 100 mM TrisHCl / 500 mM KCl / pH 8,3

10 x AccuPrime Puffer II (Invitrogen Corporation)

Andere Puffer:

10 x Dialysepuffer: 3M NaCl / 0,25M Tris / 0,1M Na_2 EDTA / pH 7,6

Elutionspuffer: 500 mM NH_4Oac / 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)

Nährmedien:

L-Medium: 10 g Trypton / 5 g Hefe-Extrakt / 5 g NaCl / 1000 ml H_2O

Agarplatten mit Ampicillin: 500 ml L-Medium / 7,5 g Agar-Agar / autoklavieren, auf $50^\circ C$
abkühlen / 50 $\mu g/ml$ Ampicillin zugeben

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)

E: Enzyme und Desoxyribonukleinsäuren

Enzyme:

USER-Reagenz: Mischung von Uracil DNA-Glycosylase und DNA-Glycosylase-Lyase

Endonuclease VIII (NEB)

Restriktionsenzyme (alle von NEB):

BsaHI: 5'...G[▼]R[▼]CGYC...3'
 3'...CYGCR[▲]G...5'

HinfI: 5'...G[▼]ANTC...3'
 3'...CTN[▲]AG...5'

EcoRI: 5'...G[▼]AATTC...3'
 3'...CTTA[▲]AG...5'

HindIII: 5'...A[▼]AGCTT...3'
 3'...TTCGA[▲]A...5'

BcgI: 5'...[▼]₁₀(N)CGA(N)₆TGC(N)₁₂...3'
 3'...[▲]₁₂(N)GCT(N)₆ACG(N)₁₀...5'

Nt.BstNBI: 5'...GAGTCNNNN[▼]N...3'
 3'...CTCAGNNNN...5'

(N = A, G, C oder T; R = G oder A; Y = C oder T)

Polymerasen:

Taq DNA Polymerase („Haus-Taq“, Hergestellt im Arbeitskreis von Prof. E. R. Schmidt, Institut für molekulare Genetik, Johannes Gutenberg-Universität Mainz)

Taq DNA Polymerase (NEB)

Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes, vertrieben durch NEB)

AccuPrime™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen Corporation)

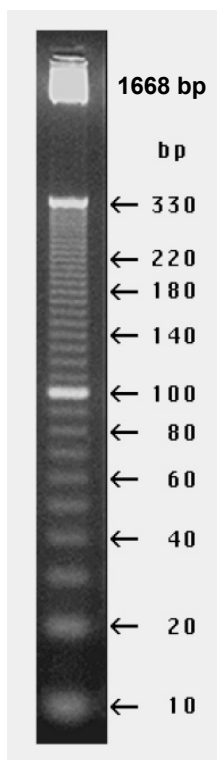
Modifikationsenzyme:

Antarctic Phosphatase (NEB)

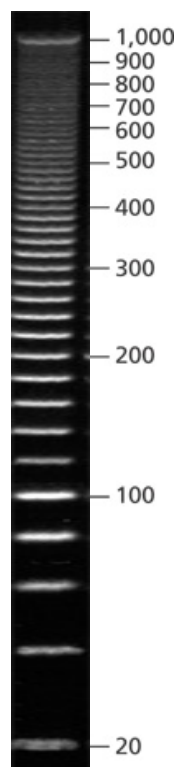
Polynukleotid Kinase, T4 DNA Ligase (Roche)

Desoxyribonukleinsäuren:

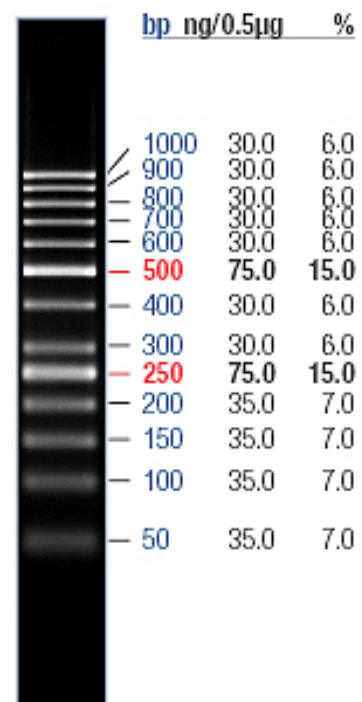
DNA-Marker:



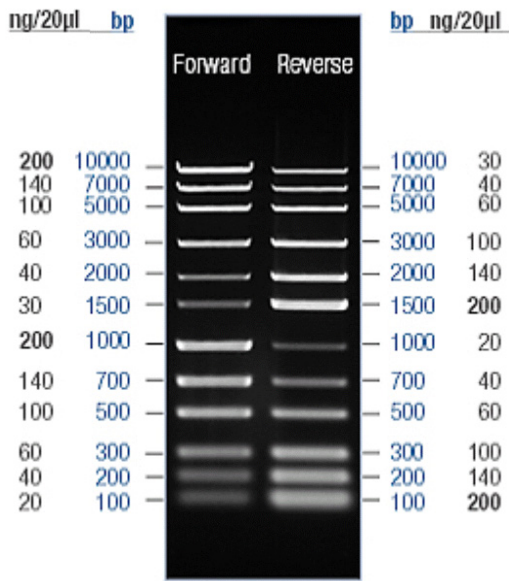
10 bp DNA Ladder
(Invitrogen)



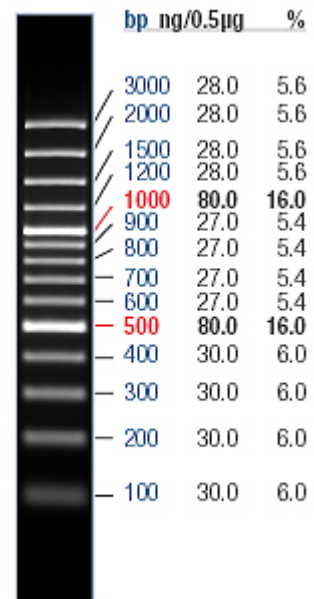
PCR 20 bp Low Ladder
(Sigma Aldrich)



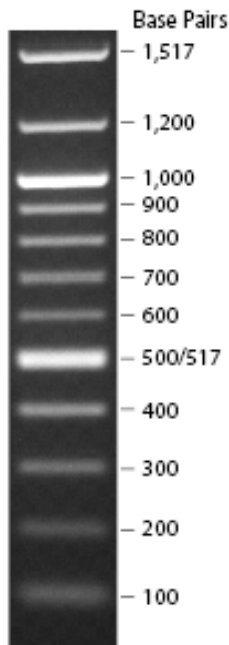
GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder
(Fermentas)



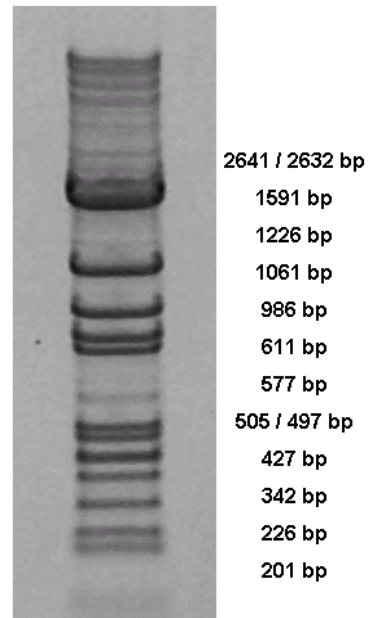
**MassRuler™ Express DNA Ladder Mix,
Forward / Reverse, ready-to-use (Fermentas)**



**GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus
(Fermentas)**



**100 bp DNA Ladder (New England Biolabs)
Massenangaben beziehen sich auf 0,5µg/Spur**



**pF-Marker: Hergestellt im Arbeitskreis von Prof. E. R.
Schmidt, Institut für molekulare Genetik,
Johannes Gutenberg-Universität Mainz**

Primer:

Nicht modifizierte Primer :

Amplifikation des pUC-Klons (pDmirAmyRelXba0,6):

M13/pUC universal sequencing primer (-20), 17-mer: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'

M13/pUC reverse sequencing primer (-26), 17-mer: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

Amplifikation von pNEB206A :

L1: 5'-GTC TAT TTC GTT CAT CC-3'

R1: 5'-AAG TTC TGC TAT GTG GC-3'

Modellsystem mit 80 bp:

PL5: 5'-CTG AGA ATA GTG TAT GCG G-3'

R1: 5'-AAG TTC TGC TAT GTG GC-3'

Modellsystem mit 31 bp:

PDL: 5'-CGGGATAATA CCGCGCCACA-3'

R3: 5'-AAG TTC TGC TAT GTG GC-3'

Uridinmodifizierte Primer:

8 b sticky-ends:

PL1: 5'-GGA GAC AUG TCT ATT TCG TTC ATC C-3'

PR1: 5'-GGG AAA GUA AGT TCT GCT ATG TGG C-3'

23 b sticky-ends

PL2a: 5'-TAG ATA GTT CTC GCA CGA CGC TAT GTC TAT TTC GTT CAT CC-3'

PL2b: 5'-TAG ATA GTT CTC GCA CGA CGC TAU GTC TAT TTC GTT CAT CC-3'

PR2: 5'-TTA CTG TGA CTT GTC CTA AGA CAU AAG TTC TGC TAT GTG GC-3'

23 b sticky-ends mit Texas Red-Markierung

PL2b-TXR: 5'-TXR-TAG ATA GTT CTC GCA CGA CGC TAU GTC TAT TTC GTT CAT CC-3'

PR2-TXR: 5'-TXR-TTA CTG TGA CTT GTC CTA AGA CAU AAG TTC TGC TAT GTG GC-3'

PR2c-TXR: 5'-TXR-TGT CTT AGG ACA AGT CAC AGT AAU AAG TTC TGC TAT GTG GC-3'

PEG-modifizierte Primer [Sp18 = Spacer18 (Glen Research Corp.)]:

16 b sticky-end (Kreuz mit 8 pb pro Arm):

PK1: 5'- C GCA ATC CTG AGC ACG Sp18 AAG TTC TGC TAT GTG GC-3'

PK2: 5'- C GTG CTC ACC GAA TGC Sp18 AAG TTC TGC TAT GTG GC-3'

PK3: 5'- G CAT TCG GAC TAT GGC Sp18 AAG TTC TGC TAT GTG GC-3'

PK4: 5'- G CCA TAG TGG ATT GCG Sp18 AAG TTC TGC TAT GTG GC-3'

23 b sticky-ends:

PL3Sp18: 5'-TAG ATA GTT CTC GCA CGA CGC TA Sp18 GTC TAT TTC GTT CAT CC-3'

PL3bSp18: 5'-TAG ATA GTT CTC GCA CGA CGC TA 3xSp18 GTC TAT TTC GTT CAT CC-3'

PR3Sp18c: 5'-TAG CGT CGT GCG AGA ACT ATC TA Sp18 AAG TTC TGC TAT GTG GC-3'

PR3bSp18c: 5'-TAG CGT CGT GCG AGA ACT ATC TA 3xSp18 AAG TTC TGC TAT GTG GC-3'

46 b sticky-end (Kreuz mit 23 bp pro Arm):

PK31: 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'

PK34: 5'-CCA CGG AGT ATC GAA CGT GCT CAC CGA ATG CGT GTC GTA ACG ATC A Sp18
AAG TTC TGC TAT GTG GC-3'

PK33: 5'-TGA TCG TTA CGA CAC GCA TTC GGA CTA TGG CAT ACC TGG TCA TCT C Sp18
AAG TTC TGC TAT GTG GC-3'

PK32: 5'-GAG ATG ACC AGG TAT GCC ATA GTG GAT TGC GAG CGT TGT ACT ACC G Sp18
AAG TTC TGC TAT GTG GC-3'

Oligonukleotide:

S1: 5'-NHS-CAG CCA AGA TTC TTT TAC CGC CG-3'

S2: 5'-NHS-GTC CTC GCC TAG TGT TTC ATT GA-3'

S3 (5'-AATT-S1c): 5'-AAT TCG GCG GTA AAA GAA TCT TGG CTG-3'

S4 (5'-AGCT-S2c): 5'-AGC TTC AAT GAA ACA CTA GGC GAG GAC-3'

Linker-Oligos:

L2a: 5'-TAG CAT GTG GCG ATT GTC GCC GGT TTA CTG TGA CTT GTC CTA AGA CA-3'

L2b: 5'-CCG GCG ACA ATC GCC ACA TGC TAT TTA CTG TGA CTT GTC CTA AGA CA-3'

Trimer:

Sp18: 5'-GTC CTC GCC TAG TGT TTC ATT GA Sp18 CAG CCA AGA TTC TTT TAC CGC CG-3'

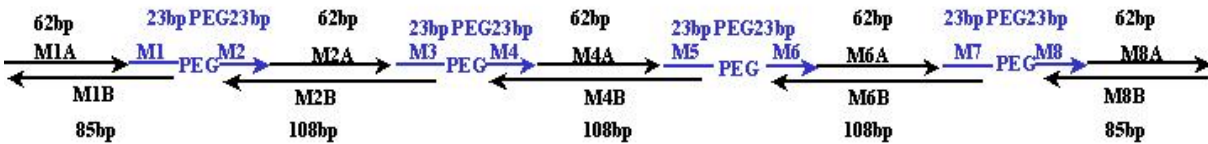
T1: 5'-HPO₄-AAG GTT ACT GTG ACC TCT CAT CAG ACA TCT GGT ATC C-3'

T1C: 5'-GGA TAC CAG ATG TCT GAT GAG AGG TCA CAG TAA CCT TCG GCG GTA AAA
GAA TCT TGG CTG-3'

T2CA: 5'-TCA ATG AAA CAC TAG GCG AGG ACG CAC AGA TCG CAG CAC GCT CTT GAT
AGA TGC TGT ATC-3'

T2CB: 5'-TCA ATG AAA CAC TAG GCG AGG ACG ATA CAG CAT CTA TCA AGA GCG TGC
TGC GAT CTG TGC-3'

Pentamer:



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'

M1: 5'-TAG CAT GTG GCG ATT GTC GCC GG-3'

M2 : 5'-NHS-TTA CTG TGA CTT GTC CTA AGA CA-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'

M3: 5'-TAG ATA GTT CTC GCA CGA CGC TA-3'

M4 : 5'-NHS-AAC ACG CTT CTA CCG CGT TGA GT-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'

M5: 5'-TCC AAT GGA ACG ACC GTA TTG CG-3'

M6 : 5'-NHS-CTG CTG AGT GTA TGT ACG GCT TG-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'

M7: 5'-ACC ACT GTA CCG TTG GCG TCT AA-3'

M8 : 5'-NHS-TCA GCG ACT AAT GAC GGA CTT AT-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'

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 L1 und R1 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 ATTCGCCATT
CAGGCTGCGC AACTGTTGGG AAGGGCGATC GGTGCGGGCC TCTTCGCTAT
TACGCCAGCT GCGGAAAGGG GGATGTGCTG CAAGGCGATT AAGTTGGGTA
ACGCCAGGGT TTTCCAGTC ACGACGTTGT AAAACGACGG CCAGTGAATT
CGAGCTCAGG CGCGCCTTAA TTAAGCTGAG GGAAAGTCTA GAGGATCCTC
TAGATGTCTC CTCAGCGTTT AAACCCTGCA GGAAGCTTGG CGTAATCATG
GTCATAGCTG TTTCCTGTGT GAAATTGTTA TCCGCTCACA ATTCCACACA
ACATACGAGC CGGAAGCATA AAGTGTAAG CCTGGGGTGC CTAATGAGTG
AGCTAACTCA CATTAAATTGC GTTGCGCTCA CTGCCCGCTT TCCAGTCGGG
AAACCTGTGC TGCCAGCTGC ATTAATGAAT CGGCCAACGC GCGGGGAGAG
GCGGTTTGGC TATTGGGCGC TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC TGACTCGCTG
CGCTCGGTCG TTCGGCTGCG GCGAGCGGTA TCAGCTCACT CAAAGGCGGT
AATACGGTTA TCCACAGAAT CAGGGGATAA CGCAGGAAAG AACATGTGAG
CAAAAGGCCA GCAAAGGCC AGGAACCGTA AAAAGGCCGC GTTGCTGGCG
TTTTTCCATA GGCTCCGCCC CCCTGACGAG CATCACAAAA ATCGACGCTC
AAGTCAGAGG TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC CAGGCGTTTC
```

CCCCTGGAAG CTCCCTCGTG CGCTCTCCTG TTCCGACCCT GCCGCTTACC
GGATACCTGT CCGCCTTTCT CCCTTCGGGA AGCGTGGCGC TTTCTCATAG
CTCACGCTGT AGGTATCTCA GTTCGGTGTA GGTCGTTCGC 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 GGTTTTTTTG
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 CGTTCATCC**A 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 TGCAAAAAG CGGTTAGCTC CTTCCGGTCT
CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA GTGTTATCAC TCATGGTTAT
GGCAGCACTG CATAATTCTC TTA CTGTCAT GCCATCCGTA AGATGCTTTT
CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATGCGG
CGACCGAGTT GCTCTTGCCC GCGCTCAATA CGGGATAATA CCGC**GCCACA**
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 CATTAACTA TAAAAATAGG
CGTATCACGA GGCCCTTTCG TC

pDmirAmyRelXba0,6 (AK Prof. E. R. Schmidt, Institut für molekulare Genetik, Johannes Gutenberg-Universität Mainz): Die angegebene Sequenz zeigt den Bereich des pUC18 Klon, der zwischen den Annealing Sites der Primern M13 universal und M13 reverse liegt. Die Erkennungssequenzen von **EcoRI** und **HindIII** sind farbig hervorgehoben.

GTAAAACGAC **GGCCAGT**GCC **AAGCTT**GCAT GCCTGCAGGT CGACTCTAGA
 CGGGCATATA AGAGAGTCGC ACAACTAAAG TTGTAGTCGG TAGTCTGTAG
 TCGAAGGAGG ATCGATAGGA AAAGACGGAA ACTACGCAGT AGAGTAGTCC
 GTTACTCTTT CGATTCGTAT TTGCAGAGCG AAAGAGAGTC GGCTCAGCCG
 AGTGCGGCGC GGTAGAGTTC GTGTCTGCGA GCGAGAAATA GCCGAGAGAG
 AGCAATGAGA GAGTACAGGC GCGACTTACT GTGCTCAAGG CACATCAAAA
 ATGGAGGAAG AAGAAGAGGT AGAGCAGCCC TGCTATCTGC CCCTGACAAA
 GCATTATATT ACACGCTTCT GCAAGGGTAT CTGAATCTTC GACCACCTTG
 GCTAGCCCTC CTTGGTCCTT TCACTCTGCC TGACAGATTT TCGCCACATG
 TGTGTATATG TACAGATGTG CGTGCGGTTA GCTCTGCCAA GAAGGAAAAT
 CCATCTACAT AAAGGGCAGA AAATCAGAAT TCACATCAAA AATGATATGT
 AGATACCCAC GCACAGACAC ACGAACGACA ACGAGCTGAA AGTCAAAGCT
 GAACATGTCT AGAGGATCCC CGGGTACCGA GCTCGAATTC GTAATCATG**G**
TCATAGCTGT TTCCTG

F: Temperaturprogramme

Temperaturprogramme für die PCR:

Autogene II.CYC:	
(Wasserbad-Thermocycler)	
94 °C	2'30''
40 Zyklen: 55 °C	2'
72 °C	3'
94 °C	1'20''
55 °C	2'
72 °C	15'
STORE AT 18 °C	

PCR1.CYC:	
LIDHT: 110 °C	
94 °C	2 min
94 °C	20 s
40 °C	20 s
72 °C	45 s
25 Zyklen: 94 °C	20 s
57 °C	20 s
72 °C	45 s
72 °C	5 min
LIDHT OFF	
RAMP 4 °C: 1,5 °C/s	
STORE AT 8 °C	

PCR2.CYC:	PCRPGEM2.CYC:	PCR-Phus.CYC:
LIDHT: 110 °C	LIDHT: 110 °C	LIDHT: 110 °C
94 °C 1 min	96 °C 2 min	98 °C 3 min
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	40 °C 20 s
72 °C 45 s	72 °C 1 min	72 °C 15 s
72 °C 5 min	72 °C 4 min	72 °C 4 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	Hyb70.CYC	Hyb70F.CYC	Hyb90ds.CYC
LIDHT: 110 °C	LIDHT: 70 °C	LIDHT: 70 °C	LIDHT: 110 °C
90 °C 5 min	70 °C 5 min	70 °C 5 min	90 °C 10 min
65 °C 20 min	60 °C 10 min	60 °C 10 min	75 °C 3 h
LIDHT OFF	LIDHT OFF	LIDHT OFF	70 °C 3 h
55 °C 20 min	45 °C 10 min	50 °C 10 min	65 °C 3 h
45 °C 20 min	40 °C 10 min	40 °C 10 min	60 °C 2 h
37 °C 30 min	35 °C 10 min	30 °C 10 min	LIDHT OFF
23 °C 30 min	30 °C 10 min	STORE AT 23 °C	55 °C 1 h
STORE AT 8 °C	25 °C 20 min		50 °C 1 h
	STORE AT 23 °C		STORE AT 50 °C
Hyb40.CYC: 40 °C, nach jeweils 1 h Temperatur um 0,7 °C erniedrigen.			
Nach 1 h bei 8,5 °C: STORE AT 8 °C			

G: Verwendete Geräte

PAGE:

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

Analytische Agarose Gele:

Vertikales Einzelsystem: GENterphorese™, 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

Präparative Agarose Gele:

180 x 130 x 3 mm, Eigenbau AK Prof. E. R. Schmidt, Institut für molekulare Genetik, Johannes Gutenberg Universität, Mainz

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
Ultrazentrifuge: Sorvall Discovery M120SE, Kendor, Hanau

UV-Spektrometer:

Carry 100 Bio UV-Vis Spektrophotometer, Varian Inc.
Eppendorf BioPhotometer, Eppendorf

Fluoreszenzspektrometer:

FP-6500 Research Fluorescence Spectrometer, Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Gross-Umstadt

LS 50B Fluorescence Spectrometer, PerkinElmer Inc.

AFM:

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

MALDI-TOF MS: TofSpec E, Micromass

NMR: Bruker 300 UltraShield

Literaturverzeichnis

- [1] R. P. Feynman, "There's Plenty of Room at the Bottom", *Engineering & Science*, 5 (Februar 1960), <http://www.zyvex.com/nanotech/feynman.html>
- [2] R. P. Feynman, "There's Plenty of Room at the Bottom", in *Miniaturization*, H. D. Gilbert, Reinhold Publishing Corporation, New York, (1961), p. 282-296
- [3] S. Bleil, D. W. M. Marr, C. Bechinger, "Field-mediated self-assembly of highly parallel microfluidic devices", *Appl. Phys. Lett.*, **2006**, 88, 263515
- [4] G. M. Wallraff, W. D. Hinsberg, "Lithographic Imaging Techniques for the Formation of Nanoscopic Features", *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 1801-1821
- [5] Y. Xia, J. A. Rogers, K. E. Paul, and G. M. Whitesides, "Unconventional Methods for Fabricating and Patterning Nanostructures", *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 1823-1848
- [6] K. E. Drexler, "Molecular engineering: An approach to the development of general capabilities for molecular manipulation", *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **1981**, 78 (9), 5275-5278
- [7] D. L. Oxender, C. F. Fox, "Protein Engineering", Alan R. Liss Inc., New York, (1987)
- [8] S. J. Pollack, J. W. Jacobs, P. G. Schultz, *Science*, **1986**, 234, 1570-1574
- [9] A. Tramantano, K. D. Janda, R. A. Lerner, *Science*, **1986**, 234, 1566-1570
- [10] L. Regan, W. F. DeGrado, "Characterisation of a Helical Protein Designed from First Principles", *Science*, **1988**, 241 (4868), 976-978
- [11] W. F. DeGrado, Z. R. Wasserman, J. D. Lear, "Protein Design, a Minimalist Approach", *Science*, **1989**, 243 (4891), 622-627
- [12] A. K. Walko, W. Meijberg, B. L. Feringa, "A Light-Actuated Nanovalve Derived from Channel Protein", *Science*, **2005**, 309, 755-758
- [13] D. H. Freedman, "Exploiting the Nanotechnology of Life", *Science*, **1991**, 254 (5036), 1308-1310
- [14] W. B. Sherman, N. C. Seeman, "A Precisely Controlled DNA Biped Walking Device", *Nano Letters*, **2004**, 4 (7), 1203-1207
- [15] Y. Chen, M. Wang, C. Mao, "An Autonomous DNA Nanomotor Powered by a DNA Enzyme", *Angew. Chem.*, **2004**, 116, 2-5
- [16] B. Yurke, A. J. Turberfield, A. P. J. Mills, F. C. Simmel, and J. L. Neumann, "A DNA-fuelled molecular machine made of DNA", *Nature*, **2000**, 406, 605-608

- [17] H. Yan, X. Zhang, Z. Shen, and N. C. Seeman, "A robust DNA mechanical device controlled by hybridization topology", *Nature*, **2002**, *415*, 62-65
- [18] A. R. Pease, J. O. Jeppesen, J. F. Stoddart, Y. Luo, C. P. Collier, and J. R. Heath, "Switching Devices Based on Interlocked Molecules", *Acc. Chem. Res.*, **2001**, *34*, 433-444
- [19] M. C. Jiménez, C. Dietrich-Buchecker, J.-P. Sauvage, "Towards Synthetic Molecular Muscles: Contraction and Stretching of a Linear Rotaxane Dimer", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, *39 (18)*, 3284-3287
- [20] A. M. Brouwer, C. Frochot, F. G. Gatti, D. A. Leigh, L. Mottier, F. Paolucci, S. Roffia, and G. W. H. Worpel, "Photoinduction of Fast Reversible Translational Motion in a Hydrogen-Bonded Molecular Shuttle", *Science*, **2001**, *291*, 2124-2128
- [21] N. Koumura, R. W. Zijlstra, R. A. v. Delden, N. Harada, and B. L. Feringa, "Light-driven unidirectional molecular rotor", *Nature*, **1999**, *401*, 152-155
- [22] T. R. Kelly, H. DeSilva, R. A. Silva, "Unidirectional rotary motion in a molecular system", *Nature*, **1999**, *401*, 150-152
- [23] U. Feldkamp, C. M. Niemeyer, "Rational Design of DNA Nanoarchitectures", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 2-23
- [24] J. B. Hays, M. E. Magar, B. H. Zimm, "Persistence Length of DNA", *Biopolymers*, **1969**, *8*, 531-536
- [25] N. C. Seeman, "Biomolecular Stereodynamics", R. H. Sarman, Adenine Press, New York, (1981)
- [26] N. C. Seeman, "Nucleic Acid Junctions and Lattices", *J. Theor. Biol.*, **1982**, *99*, 237-247
- [27] N. C. Seeman, N. R. Kallenbach, "Design of Immobile Nucleic Acid Junctions", *Biophysical Journal*, **1983**, *44*, 201-209
- [28] N. R. Kallenbach, R.-I. Ma, N. C. Seeman, "An immobile nucleic acid junction constructed from oligonucleotides", *Nature*, **1983**, *305*, 829-831
- [29] N. C. Seeman, "Construction of Three-Dimensional Sticky Figures from Branched DNA", *DNA and Cell Biology*, **1991**, *10 (7)*, 475-486
- [30] F. Mathieu, S. Liao, J. Kopatsch, T. Wang, C. Mao, and N. C. Seeman, "Six-Helix Bundles Designed from DNA", *Nano Letters*, **2005**, *5 (4)*, 661-665
- [31] Y. Zhang, N. C. Seeman, "Construction of a DNA-Truncated Octahedron", *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 1661-1669

- [32] X. Yang, L. A. Wenzler, J. Qi, X. Li, and N. C. Seeman, "Ligation of DNA Triangles Containing Double Crossover Molecules", *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 9779-9786
- [33] E. Winfree, F. Liu, L. A. Wenzler, and N. C. Seeman, "Design and self-assembly of two-dimensional DNA crystals", *Nature*, **1998**, *394*, 539-544
- [34] B. Ding, R. Sha, N. C. Seeman, "Pseudo-hexagonal 2D Crystals from Double Crossover Cohesion", *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 1023-10231
- [35] H. Yan, S. H. Park, G. Finkelstein, J. H. Reif, and T. H. LaBean, "DNA-Templated Self-Assembly of Protein Arrays and Highly Conductive Nanowires", *Science*, **2003**, *301*, 1882-1884
- [36] B. H. Robinson, N. C. Seeman, "The design of a biochip: a self-assembling molecular-scale memory device", *Protein Engineering*, **1987**, *1* (4), 295-300
- [37] P. W. K. Rothemund, "Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns", *Nature*, **2006**, *440*, 297-302
- [38] S. Y. Park, A. K. R. Lytton-Jean, B. Lee, S. Weigand, G. C. Schatz, and C. A. Mirkin, "DNA-programmable nanoparticle crystallization", *Nature*, **2008**, *451*, 553-556
- [39] T. Mori, D. Umeno, M. Maeda, "Sequence-Specific Affinity Precipitation of Oligonucleotide Using Poly(N-Isopropylacrylamide)-Oligonucleotide Conjugate", *Biotechnol. Bioeng.*, **2001**, *72* (3), 261-268
- [40] J. M. Gibbs, S.-J. Park, D. R. Anderson, K. J. Watson, C. A. Mirkin, and S. T. Nguyen, "Polymer-DNA Hybrids as Electrochemical Probes for the Detection of DNA", *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 1170-1178
- [41] Z. Li, P. Fullhart, C. A. Mirkin, "Reversible and Chemically Programmable Micelle Assembly with DNA Block-Copolymer Amphiphiles", *Nano Letters*, **2004**, *4* (6), 1055-1058
- [42] K. Ding, F. E. Alemdaroglu, M. Börsch, R. Berger, and A. Herrmann, "Engineering the Structural Properties of DNA Block Copolymer Micelles by Molecular Recognition", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 1172-1175
- [43] M. Ballico, S. Cogoi, S. Drioli, and G. M. Bonora, "Postsynthetic Conjugation of Biopolymers with High Molecular Mass Poly(ethylene glycol): Optimization of a Solution Process Tested on Synthetic Oligonucleotides", *Bioconjugate Chem.*, **2003**, *14*, 1038-1043
- [44] F. E. Alemdaroglu, A. Herrmann, "DNA meets synthetic polymers - highly versatile hybrid materials", *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, *5*, 1311-1320

- [45] R. M. Boomer, S. D. Lewis, J. M. Healy, M. Kurz, C. Wilson, and T. G. McCauley, "Conjugation to Polyethylene Glycol Polymer Promotes Aptamer Biodistribution to Healthy and Inflamed Tissues", *Oligonucleotides*, **2005**, *15* (3), 183-195
- [46] J. H. Jeong, S. W. Kim, T. G. Park, "Novel Intracellular Delivery System of Antisense Oligonucleotide by Self-Assembled Hybrid Micells Composed of DNA/PEG Conjugate and Cationic Fusogenic Peptide", *Bioconjugate Chem.*, **2003**, *14*, 473-479
- [47] S. Cogoi, M. Ballico, G.-M. Bonora, and L. E. Xodo, "Antiproliferative activity of a triplex-forming oligonucleotide recognizing a Ki-ras polypurine/polypyrimidine motif correlates with protein binding", *Cancer Gene Ther.*, **2004**, *11*, 465-476
- [48] F. E. Alemdaroglu, N. C. Alemdaroglu, P. Langguth, and A. Herrmann, "DNA Block Copolymer Micells - A Combinatorial Tool for Cancer Nanotechnology", *Adv. Mater.*, **2008**, *20*, 899-902
- [49] M. D. Costioli, I. Fisch, F. Garret-Flaudy, and F. Hibrig, "DNA Purification by Triple-Helix Affinity Precipitation", *Biotechnol. Bioeng.*, **2003**, *81* (5), 535-545
- [50] F. E. Alemdaroglu, K. Ding, R. Berger, and A. Herrmann, "DNA-Templated Synthesis in Three Dimensions: Introducing a Micellar Scaffold for Organic Reactions", **2006**,
- [51] F. E. Alemdaroglu, N. C. Alemdaroglu, P. Langguth, and A. Herrmann, "Cellular Uptake of DNA Block Copolymer Micells with Different Shapes", *Macromol. Rapid Commun.*, **2008**, *29*, 326-329
- [52] F. E. Alemdaroglu, M. Safak, J. Wang, R. Berger, and A. Herrmann, "DNA multiblock copolymers", *Chem. Commun.*, **2007** (13), 1358-1359
- [53] E. Ergen, M. Weber, J. Jacob, A. Herrmann, and K. Müllen, "Twin Probes as a Novel Tool for the Detection of Single-Nucleotide Polymorphisms", *Chem. Eur. J.*, **2006**, *12*, 3707-3713
- [54] J. Xu, E. A. Fogelman, S. L. Craig, "Structure and Properties of DNA-Based Reversible Polymers", *Macromolecules*, **2004**, *37*, 1863-1870
- [55] C. E. Immoos, S. J. Lee, M. W. Grinstaff, "DNA-PEG Triblock Macromolecules for Reagentless DNA Detection", *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 10814-10815
- [56] F. Bergmann, W. Bannwarth, "Solid Phase Synthesis of Directly Linked Peptide-Oligodeoxynucleotide Hybrids Using Standard Synthesis Protocols", *Tetrahedron Letters*, **1995**, *36* (11), 1839-1842
- [57] T. P. Lodge, "Block Copolymers: Past Successes and Future Challenges", *Macromol. Chem. Phys.*, **2003**, *204*, 265-273

- [58] M. W. Matsen, F. S. Bates, "Unifying Weak- and Strong-Segregation Block Copolymer Theories", *Macromolecules*, **1996**, *29* (4), 1091-1098
- [59] H. G. Elias, in *Makromoleküle - Band 1*, 5. Auflage, Hüthig & Wepf Verlag, Basel, Heidelberg, New York, (1990), p. 791-801 3-85739-101-4
- [60] D. E. Discher, A. Eisenberg, "Polymer Vesicles", *Science*, **2002**, *297* (967), 967-973
- [61] S. Jain, F. S. Bates, "On the Origins of Morphological Complexity in Block Copolymer Surfactants", *Science*, **2003**, *300* (460), 460-464
- [62] J. N. Israelachvili, D. J. Mitchell, B. W. Ninham, "Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers", *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2*, **1976**, *72*, 1525-1568
- [63] K. Kataoka, A. Harada, Y. Nagasaki, "Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance", *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2001**, *47*, 113-131
- [64] K. H. Roux, "Immunoglobulin Structure and Function as Revealed by Electron Microscopy", *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **1999**, *120*, 85-99
- [65] S. Highsmith, K. M. Kretschmar, C. T. O'Konski, and M. F. Morales, "Flexibility of myosin rod, light meromyosin, and myosin subfragment-2 in solution", *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **1977**, *74* (11), 4986-4999
- [66] E. Odermatt, J. Engel, H. Richter, and H. Hörman, "Shape, Conformation and Stability of Fibronectin Fragments Determined by Electron Microscopy, Circular Dichroism and Ultracentrifugation", *J. Mol. Biol.*, **1982**, *159* (1), 109-123
- [67] W. A. Wegener, "Bead models of segmentally flexible macromolecules", *J. Chem. Phys.*, **1982**, *76* (12), 6425-6430
- [68] M. L. Mansfeld, W. H. Stockmayer, "Unperturbed Dimensions of Wormlike Stars", *Macromolecules*, **1980**, *13*, 1713-1715
- [69] T. Lindahl, R. D. Wood, "Quality Control by DNA Repair", *Science*, **1999**, *286*, 1897-1905
- [70] T. Lindahl, "Instability and decay of the primary structure of DNA", *Nature*, **1993**, *362*, 709-715
- [71] F. H. Westheimer, "Why Nature Chose Phosphates", *Science*, **1987**, *235* (4793), 1173-1178
- [72] T. Lindahl, B. Nyberg, "Rate of Depurination of Native Deoxyribonucleic Acid", *Biochemistry*, **1972**, *11* (19), 3610-3618
- [73] L. Orgel, "A Simpler Nucleic Acid", *Science*, **2000**, *290* (5495), 1306-1307

- [74] K. E. Nelson, M. Levy, S. L. Miller, "Peptide nucleic acids rather than RNA may have been the first genetic molecule", *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **2000**, *97* (8), 3868-3871
- [75] G. F. Joyce, "RNA evolution and the origins of life", *Nature*, **1989**, *338*, 217-224
- [76] N. R. Pace, "Origin of Life - Facing Up to the Physical Setting", *Cell*, **1991**, *65*, 531-533
- [77] J. D. Watson, F. H. C. Crick, "Molecular Structure of Deoxyribose Nucleic Acids", *Nature*, **1953**, *171*, 737-738
- [78] R. P. Bowater, "DNA Structure", in *Encyclopedia of the Human Genome*, (2003)
- [79] R. R. Sinden, "DNA Structure and Function", Academic Press Inc., Imprint of Elsevier, San Diego, (1994), p. 12-14
- [80] R. L. Ornstein, R. Rein, D. L. Breen, and R. D. MacElroy, "An Optimized Potential Function for the Calculation of Nucleic Acid Interaction Energies. I. Base Stacking", *Biopolymers*, **1978**, *17*, 2341-2360
- [81] R. R. Sinden, "DNA Structure and Function", Academic Press Inc., Imprint of Elsevier, San Diego, (1994), p. 27
- [82] W. Saenger, "Principles of Nucleic Acid Structure", Springer-Verlag, New York, (1984)
- [83] R. Holliday, "A mechanism for gene conversion in fungi", *Genet. Res.*, **1964**, *5*, 282-304
- [84] B. J. Thompson, M. N. Camien, R. C. Warner, "Kinetics of branch migration in double-stranded DNA", *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **1976**, *73* (7), 2299-2303
- [85] N. C. Seeman, B. H. Robinson, "Proceedings of the Second SUNYA Conversation in the Discipline Biomolecular Stereodynamics", in *Simulation of Double Stranded Branch Point Migration*, Ramaswamy H. Sarma, Volume 1, Adenine Press, New York, (1981) ISBN: 0-940030-00-4
- [86] J. P. Cooper, P. J. Hagerman, *J. Mol. Biol.*, **1987**, *198*, 711-719
- [87] D. R. Duckett, *Cell*, **1988**, *55*, 79-89
- [88] M. E. A. Churchill, T. D. Tullius, N. R. Kallenbach, and N. C. Seeman, "A Holliday recombination intermediate is twofold symmetric", *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **1988**, *85*, 4653-4656
- [89] R. M. Clegg, *Biochemistry*, **1992**, *24*, 5745-5749
- [90] D. E. Wemmer, A. J. Wand, N. C. Seeman, and N. R. Kallenbach, "NMR analysis of DNA junctions: imino proton NMR studies of individual arms and intact junction", *Biochemistry*, **1985**, *24*, 5745-5749
- [91] S. M. Chen, F. Heffron, W. Leupin, and W. J. Chazin, *Biochemistry*, **1991**, *30*, 766-771

- [92] L. A. Marky, N. R. Kallenbach, K. A. McDonough, N. C. Seeman, and K. J. Breslauer, "The melting behavior of a DNA junction structure: A calorimetric and spectroscopic study", *Biopolymers*, **1987**, 26 (9), 1621-1634
- [93] D. M. J. Lilley, R. M. Clegg, "The Structure of the Four-Way Junction in DNA", *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **1993**, 22, 299-328
- [94] N. C. Seeman, N. R. Kallenbach, "DNA Branched Junctions", *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **1994**, 23, 53-86
- [95] C. Altona, J. A. Pikkemaat, F. J. J. Overmars, "Three- and four-way junctions in DNA: a conformational viewpoint", *Curr. Opin. Mol. Biol.*, **1996**, 6, 305-316
- [96] C. Altona, "Classification of Nucleic Acid Junctions", *J. Mol. Biol.*, **1996**, 263, 568-581
- [97] N. C. Seeman, M. F. Maestre, R.-I. Ma, and N. R. Kallenbach, "The Molecular Basis of Cancer", in *Prog. Clin. & Biol. Res. 172A*, R. Rein, Alan Liss Inc., New York, (1985), p. 99-108
- [98] S. Zhang, T.-J. Fu, N. C. Seeman, "Symmetric Immobile DNA Branched Junctions", *Biochemistry*, **1993**, 32, 8062-8067
- [99] Q. Guo, M. Lu, N. R. Kallenbach, "Conformational Preference and Ligand Binding Properties of DNA Junctions Are Determined by Sequence at the Branch", *Biopolymers*, **1991**, 31, 359-372
- [100] D. R. Duckett, A. I. H. Murchie, S. Diekmann, E. v. Kitzing, B. Kemper, and D. M. J. Lilley, "The Structure of the Holliday Junction and its Resolution", *Cell*, **1988**, 55, 79-89
- [101] A. M. Maxam, W. Gilbert, "Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages", *Meth. Enzymol.*, **1980**, 65, 499-557
- [102] K. Kleppe, E. Ohtsuka, R. Kleppe, I. Molineux, and H. G. Khorana, "Studies on Polynucleotides XCVI. Repair Replication of Short Synthetic DNA's as catalyzed by DNA Polymerases", *J. Mol. Biol.*, **1971**, 56, 341-361
- [103] J. Brownie, S. Shawcross, J. Theaker, D. Whitcombe, R. Ferrie, C. Newton, and S. Little, "The elimination of primer-dimer accumulation in PCR", *Nucleic Acids Res.*, **1997**, 25 (16), 3235-3241
- [104] F. Sanger, A. R. Coulson, "A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase." *J. Mol. Biol.*, **1975**, 94, 441-448
- [105] H. Schaller, G. Weimann, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 430-440
- [106] H. G. Khorana, "Total synthesis of a gene", *Science*, **1979**, 203, 614-625

- [107] R. L. Letsinger, K. K. Ogilvie, P. S. Miller, *J. Am. Chem. Soc.*, **1969**, *91* (12), 3360-3365
- [108] R. L. Letsinger, J. L. Finnan, G. A. Heavner, and W. B. Lunsfold, *J. Am. Chem. Soc.*, **1975**, *97*, 3278-3279
- [109] S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, "Deoxynucleoside phosphoramidites - A new class of key intermediates for deoxyoligonucleotide synthesis", *Tetrahedron Letters*, **1981**, *22* (20), 1859-1862
- [110] L. C. McBride, M. H. Caruthers, "An investigation of several deoxynucleoside phosphoramidites useful for synthesizing deoxyoligonucleotides", *Tetrahedron Letters*, **1983**, *24* (3), 245-248
- [111] N. C. Seeman, "De Novo Design of Sequences for Nucleic Acid Structural Engineering", *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, **1990**, *8* (3), 573-581
- [112] U. Feldkamp, H. Rauhe, W. Banzhaf, "Software Tools for DNA Sequence Design", *Genetic Programming and Evolvable Machines*, **2003**, *4*, 153-171 <http://ls11-www.cs.uni-dortmund.de/molcomp/downloads/dsg.jsp>
- [113] J. R. Williamson, M. K. Raghuraman, T. R. Cech, *Cell*, **1989**, *59*, 871-880
- [114] W. I. Sundquist, A. Klug, *Nature*, **1989**, *342*, 827-829
- [115] D. Sen, W. Gilbert, *Nature*, **1990**, *344*, 410-414
- [116] H.-S. Koo, H.-M. Wu, D. M. Crothers, "DNA bending at adenine o thymine tracts", *Nature*, **1986**, *320*, 501-506
- [117] H. Htun, J. E. Dahlberg, "Single Strands, Triple Strands, and Kinks in H-DNA", *Science*, **1988**, *241*, 1791-1796
- [118] V. I. Lyamichev, S. M. Mirkin, M. D. Frank-Kamenetskii, "Structures of homopurine-homopyrimidine tract in superhelical DNA", *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **1985**, *3*, 327-338
- [119] G. Kallansrund, B. Ward, "A Comparison of Measured and Calculated Single- and Double-Stranded Oligodeoxynucleotide Extinction Coefficients", *Anal. Biochem.*, **1996**, *236*, 134-138
- [120] J. H. Murphy, T. L. Trapane, "Concentration and Extinction Coefficient Determination for Oligonucleotides and Analogs Using a General Phosphate Analysis", *Anal. Biochem.*, **1996**, *240* (273-282),
- [121] Technical Bulletin: E. J. Devor, M. A. Behlke, "Oligonucleotide Yield, Resuspension, and Storage", IDT, Integrated DNA Technologies (2005), http://eu.idtdna.com/support/technical/TechnicalBulletinPDF/Oligonucleotide_Yield_Resuspension_and_Storage.pdf

- [122] Applications / Instructions (Hyperlink "Definitions" in OligoAnalyzer 3.1):
 "Definitions and Physical Models", IDT, Integrated DNA Technologies
<http://eu.idtdna.com/Analyzer/Applications/Instructions/Default.aspx?AnalyzerDefinitions=true>
- [123] C. R. Cantor, M. M. Warshaw, H. Shapiro, "Oligonucleotide interactions III. Circular dichroism studies of the conformation of deoxynucleotides", *Biopolymers*, **1970**, *9*, 1059-1077
- [124] A. V. Tataurov, Y. You, R. Owczarzy, "Predicting ultraviolet spectrum of single stranded and double stranded deoxyribonucleic acids", *Biophys. Chem.*, **2008**, *133*, 66-70
- [125] Bedienungsanleitung:: Eppendorf, BioPhotometer 6131, Eppendorf AG Hamburg p. 74,
- [126] M. J. Cavaluzzi, P. N. Borer, "Revised UV extinction coefficients for nucleoside-5'-monophosphates and unpaired DNA and RNA", *Nucleic Acids Res*, **2004**, *32 (1)*, e13 (doi:10.1093/nar/gnh015)
- [127] K. Burton, "A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid", *Biochem. J.*, **1956**, *62 (2)*, 315-323
- [128] H. G. Elias, "Makromoleküle, Band 1: Chemische Struktur und Synthese", Wiley-VCH, Weinheim, (1999)
- [129] S. Kinugasa, A. Takatsu, H. Nakanishi, H. Nakahara, and S. Hattori, "Preparation and Characterisation of Oligo(ethylene glycol)s. 2", *Macromolecules*, **1992**, *25*, 4848-4853
- [130] A. V. Lebedev, D. C. Combs, R. I. Hogrefe, "Preactivated Carboxyl Linker for the Rapid Conjugation of Alkylamines to Oligonucleotides on Solid Support", *Bioconjugate Chem.*, **2007**, *18*, 1530-1536
- [131] Technical Report: G. Research, "*Glen Research Report of Products for RNA and DNA Oligonucleotide Synthesis, Modification and Labelling: A novel route to activated carboxylate modified oligonucleotides*", (2008),
<http://www.glenresearch.com//GlenReports/GR15-15.html>
- [132] J. Feigon, W. Leupin, W. A. Denny, and D. R. Kearns, "Two-Dimensional Proton Nuclear Magnetic Resonance Investigation of the Synthetic Deoxyribonucleic Acid Decamer d(ATATCGATAT)₂", *Biochemistry*, **1983**, *22*, 5943-5951
- [133] J. Sambrook, D. W. Russell, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3. Vol", Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, (2001)

- [134] M. Morpurgo, F. M. Veronese, "Conjugates of Peptides and Proteins to Polyethylene Glycols", in *Bioconjugation Protocols*, C. M. Niemeyer, Humana Press, Totowa, New Jersey, p. 54
- [135] Technical Report: "Glen Research Products for RNA and DNA Oligonucleotide Synthesis, Modification and Labelling: Methods to Avoid Inactivation of Primary Amines", (2008),
http://www.glenresearch.com//Technical/TB_avoidaminealkylation.html
- [136] Diplomarbeit: T. Kiefer, "Synthese monodisperser heterobifunktioneller Polyethylenoxide als Blockbausteine für Oligonukleotid-PEO-Blockcopolymerer", Institut f. phys. Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz (2006)
- [137] Persönliche Mitteilung: Dr. Matthias Resmini, Geschäftsführer biomers.net GmbH, Söflinger Str. 100, Ulm
- [138] R. T. Pon, S. Yu, "Tandem oligonucleotide synthesis using linker phosphoramidites", *Nucleic Acids Res*, **2005**, *33* (6), 1940-1948
- [139] D. A. Bintzler, C. E. Terrell, "10-nmol Oligonucleotide Synthesis for the ABI Model 394 DNA Synthesizer", *J. Biomol. Tech.*, **2000**, *11* (3), 122-134
- [140] Technical Report: S. D. Allen, T. M. Luebke, S. D. Rose, "UltramersTM - The Longest Oligonucleotides Available with Mass Spectrometry QC", IDT - Integrated DNA Technologies (2007), http://eu.idtdna.com/home/Ultramers_Technical_Report_IDT.pdf
- [141] U. Feldkamp, R. Wacker, H. Schroeder, W. Banzhaf, and C. M. Niemeyer, "Microarray-Based in vitro Evaluation of DNA Oligomer Libraries Designed in silico", *Chem. Phys. Chem.*, **2004**, *5*, 367-372
- [142] Laufende Dissertation: T. Kiefer, AK Prof. M. Schmidt, Institut f. phys. Chemie, Johannes-Gutenberg Universität Mainz
- [143] S. Cheng, C. Fockler, W. M. Barnes, and R. Higuchi, "Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA", *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **1994**, *91* (12), 5695-5699
- [144] J. Cline, J. C. Braman, H. H. Hogrefe, "PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases", *Nucleic Acids Res*, **1996**, *24* (18), 3546-3551
- [145] H. O. Smith, "Nucleotide Sequence Specificity of Restriction Endonucleases", *Science*, **1979**, *205*, 455-462
- [146] F. K. Winkler, "Structure and function of restriction endonucleases", *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1992**, *2*, 93-99

- [147] S. Bennet, S. E. Halford, "Recognition of DNA by Type II Restriction Enzymes", *Curr. Top. Cell. Regul.*, **1989**, *30*, 57-104
- [148] A. Pingoud, J. Alves, R. Geiger, "Restriction Enzymes. In Enzymes in Molecular Biology", M. M. Burrell, Humana Press, (1991)
- [149] M. A. Greagg, M. J. Fogg, G. Panayotou, S. J. Evans, B. A. Connolly, and L. H. Pearl, "A read-ahead function in archaeal DNA polymerases detects promutagenic template-strand uracil", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, *96*, 9045-9050
- [150] J. M. Clark, "Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases", *Nucleic Acids Research*, **1988**, *16 (20)*, 9677-9686
- [151] J. R. Smith, J. D. Carpten, M. J. Brownstein, S. Ghosh, V. L. Magnuson, D. A. Gilbert, J. M. Trent, and F. S. Collins, "Approach to Genotyping Errors Caused by Nontemplated Nucleotide Addition by Taq DNA Polymerase", *Genome Research*, **1995**, *5*, 312-317
- [152] M. J. Brownstein, J. D. Carpten, J. R. Smith, "Modulation of Non-Templated Nucleotide Addition by Taq Polymerase: Primer Modifications that Facilitate Genotyping", *BioTechniques*, **1996**, *20 (6)*, 1004-1009
- [153] V. L. Magnuson, D. S. Ally, S. J. Nylund, Z. E. Karanjawala, J. B. Rayman, J. I. Knapp, A. L. Lowe, S. Ghosh, and F. S. Collins, "Substrate Nucleotide-Determined Non-Templated Addition of Adenine by Taq DNA Polymerase: Implications for PCR-Based Genotyping and Cloning", *BioTechniques*, **1996**, *21 (4)*, 700-709
- [154] M. J. McPherson, P. Quirke, G. R. Taylor, "PCR - A Practical Approach", Oxford University Press, (1996)
- [155] S. H. Chen, C. Y. Lin, C. S. Cho, C. Z. Lo, and C. A. Hsiung, "Primer Design Assistant (PDA): a web-based primer design tool", *Nucleic Acids Res*, **2003**, *31 (13)*, 3751-3754
- [156] Online Tool: "Custom Primers - OligoPerfekt™ Designer", invitrogen
<http://tools.invitrogen.com/content.cfm?pageid=9716>
- [157] K. J. Breslauer, R. Frank, H. Blöcker, and L. A. Marky, "Predicting DNA duplex stability from the base sequence." *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **1986**, *83*, 3746-3750
- [158] D. A. Hoagland, E. Arvanitidou, C. Welch, "Capillary Electrophoresis Measurements of the Free Solution Mobility for Several Model Polyelectrolyte Systems", *Macromolecules*, **1999**, *32*, 6180-6190
- [159] Weidkin, Müller, Dehnicke, "Schwingungsspektroskopie", Georg Thieme Verlag, ISBN: 3-13-625102-4

- [160] T. A. Kunkel, R. D. Sabatino, R. A. Bambara, "Exonucleolytic proofreading by calf thymus DNA polymerase δ ", *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **1987**, *84*, 4865-4869
- [161] K. R. Tindall, T. A. Kunkel, "Fidelity of DNA Synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA Polymerase", *Biochemistry*, **1988**, *27*, 6008-6013
- [162] P. Wu, N. Sugimoto, "Transition characteristics and thermodynamic analysis of DNA duplex formation: a quantitative consideration for the extent of duplex association", *Nucleic Acids Res*, **2000**, *28 (23)*, 4762-4768
- [163] M. Ailenberg, N. M. Goldenberg, 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", (Methodology article), *BMC Biotechnology*, **2005**, *5:23*,
- [164] W. F. Donahue, B. M. Turczyk, K. A. Jarrell, "Rapid gene cloning using terminator primers and modular vectors", *Nucleic Acids Res*, **2002**, *30:e95*,
- [165] V. W. Coljee, H. L. Murray, W. F. Donahue, and K. A. Jarrell, "Seamless gene engineering using RNA- and DNA-overhang cloning", *Nat. Biotechnol.*, **2000**, *18*, 789-791
- [166] J. Gál, R. Schnell, S. Szekeres, and M. Kálmán, "Directional cloning of native PCR products with preformed sticky ends (Autosticky PCR)", *Mol Gen Genet*, **1999**, *260*, 569-573
- [167] Diplomarbeit: S. Muth, "DNA-PEG-Hybridstrukturen, ihre Replikation und Transkription", Institut für molekulare Genetik, Johannes Gutenberg-Universität Mainz (2008)
- [168] Abbildung aus: <http://www.neb.com/nebecomm/products/productF-530.asp>:
- [169] T. Horn, M. S. Urdea, "Forks and combs and DNA: the synthesis of branched oligodeoxyribonucleotides", *Nucleic Acids Res*, **1989**, *17 (17)*, 6959-6967
- [170] R. H. E. Hudson, M. J. Damha, "Nucleic Acid Dendrimers: Novel Biopolymer Structures", *J. Am. Chem. Soc*, **1993**, *115*, 2119-2124
- [171] Y. Wang, B. A. Armitage, G. C. Berry, "Reversible Association of PNA-Terminated Poly(2-hydroxyethyl acrylate) from ATRP", *Macromolecules*, **2005**, *38*, 5846-5848
- [172] Y. Tian, Y. He, A. E. Ribbe, and C. Mao, "Preparation of branched structures with long DNA duplex arms", *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, *4*, 3404-3405
- [173] K. Keren, M. Krueger, R. Gilad, G. Ben-Yoseph, U. Sivan, and E. Braun, "Sequence-Specific Molecular Lithography on Single DNA Molecules", *Science*, **2002**, *297*, 72-75

- [174] R.-I. Ma, N. R. Kallenbach, R. D. Sheardy, M. L. Petrillo, and N. C. Seeman, "Three-arm nucleic acid junctions are flexible", *Nucleic Acids Res*, **1986**, *14* (24), 9745-9753
- [175] Y. Wang, J. E. Mueller, B. Kemper, and N. C. Seeman, "Assembly and Characterization of Five-Arm and Six-Arm DNA Branched Junctions", *Biochemistry*, **1991**, *30*, 5667-5674
- [176] X. Wang, N. C. Seeman, "Assembly and Characterization of 8-Arm and 12-Arm DNA Branched Junctions", *J. Am. Chem. Soc*, **2007**, *129*, 8169-8176
- [177] W. D. Volkmuth, T. Duke, R. H. Austin, and E. C. Cox, "Trapping of branched DNA in microfabricated structures", *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **1995**, *92*, 6887-6891
- [178] P. Tosch, C. Wälti, A. P. J. Middelberg, and A. G. Davies, "Generic Technique to Generate Large Branched DNA Complexes", *Biomacromolecules*, **2006**, *7*, 677-681
- [179] J. P. Cooper, P. J. Hagerman, "Gel Electrophoretic Analysis of the Geometry of a DNA Four-way Junction", *Journal of Molecular Biology*, **1987**, *198* (4), 711-719
- [180] J. P. Cooper, P. J. Hagerman, "Geometry of a branched DNA structure in solution", *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **1989**, *86*, 7336-7340
- [181] N. C. Seeman, "Nucleic Acid Junctions and Lattices", *Journal of Theoretical Biology*, **1982**, *99*, 237-247
- [182] N. C. Seeman, N. R. Kallenbach, "Design of immobile nucleic-acid junctions", *Biophysical Journal*, **1983**, *44* (2), 201-209
- [183] N. R. Kallenbach, N. C. Seeman, "Stable Branched DNA Structures: DNA Junctions", *Comments on molecular and cellular biophysics*, **1986**, *4* (1), 1-16
- [184] N. C. Seeman. "Nanoscale Assembly and Manipulation of Branched DNA: A Biological Starting Point for Nanotechnology" in Appendix D: "Branched DNA and Nanotechnology" by Dr. Ned Seeman, *NanoCon Northwest regional nanotechnology conference* (1989)
- [185] M. B. Kermekchiev, A. Tzekov, W. M. Barnes, "Cold-sensitive mutants of Taq DNA polymerase provide a hot start for PCR", *Nucleic Acids Res*, **2003**, *31* (21), 6139-6147
- [186] D. M. Perreault, E. V. Anslyn, "Der Mechanismus der RNA-Spaltung durch Umesterung-eine vereinheitlichende Analyse des aktuellen Diskussionsstandes", *Angew. Chem.*, **1997**, *109*, 470-490
- [187] T. Lindahl, A. Andersson, "Rate of Chain Breakage at Apurinic Sites in Double-Stranded Deoxyribonucleic Acid", *Biochemistry*, **1972**, *11* (19), 3618-3623
- [188] S. D. Satish, C. Mohapatra, J. T. Hsu, "Studies on primer-dimer formation in polymerase chain reaction (PCR)", *Biotechnology Techniques*, **1999**, *13*, 643-646

- [189] User Manual: "*NucleoSpin Extrakt II*", Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren (2006),
- [190] Broschüre: "*Your universally applicable Polymer*", Clariant GmbH, Funktional Chemicals Division, BU II Personal Care <http://fun.clariant.com>
- [191] K. Bürger, *Z. Anal. Chem.*, **1963**, 196, 251
- [192] K. Bürger, *Z. Anal. Chem.*, **1967**, 224, 421
- [193] J. Dietrich, H. Sucker, *Pharm. Ind.*, **1972**, 34, 117
- [194] R. Neissner, *Pharm. Ind.*, **1969**, 31, 724
- [195] K. Thoma, *Scientia Pharmaceutica*, **1964**, 32, 216
- [196] Online Tool: "*NEBcutter V2.0*", New England Biolabs
<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>
- [197] B. Polisky, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **1975**, 72, 3310
- [198] R. C. Gardner, A. J. Howarth, J. Messing, and R. J. Shepherd, *DNA*, **1982**, 1, 109-115
- [199] Internetseite: "*Star Activity (relaxed or altered specificity)*", New England Biolabs
http://www.neb.com/nebecomm/tech_reference/restriction_enzymes/star_activity.asp
- [200] C. C. Richardson, "Phosphorylation of Nucleic Acid by an Enzyme from T4 Bacteriophage-Infected *Escherichia coli*", *PNAS*, **1965**, 54, 158-165
- [201] A. D. Ellington, J. W. Szostak, "In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands." *Nature*, **1990**, 346, 818-822