

Selektiver DNS-Strangbruch an fester Phase – eine neue Methode zur Sequenzerkennung

Inauguraldissertation

Zur Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie
vorgelegt der
Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel

von

Sandra Thöni

Aus Gsteigwiler (BE)

Basel, 2006

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität
Basel auf Antrag der Professoren:

Prof. Dr. B. Giese

Prof. Dr. H. Wennemers

Basel, den 2. Mai 2006

Prof. Dr. H.-J. Wirz (Dekan)

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. B. Giese in der Zeit von April 2001 bis April 2006 im Departement Chemie der Universität Basel durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden an folgenden Veranstaltungen/Orten vorgestellt:

NCCR-Workshop, CH-Pontresina, September 2002.

22. Regio-Symposium, D-Falkau, September 2002.

review panel site visit (NCCR), CH-Basel, Mai 2003.

scientific advisory board (NCCR), CH-Basel, Oktober 2003.

Vortrag bei Biolytix AG, CH-Witterswil, September 2004.

Bio-Nanoworkshop (NCCR/Frontiers), CH-Lenzerheide, Januar 2005.

25. Regio Symposium, CH-Sornetan, September 2005.

Mein Dank gilt folgenden Personen:

Prof. Dr. Bernd Giese für die Möglichkeit zu dieser abwechslungsreichen Arbeit und seine stete Unterstützung.

Prof. Dr. Helma Wennemers für die Übernahme des Korreferats.

Prof. Dr. Urs Séquin für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Dr. Eugen Stulz für viele Diskussionen und seine Hilfe.

Dr. Christoph Kressierer für das Weiterführen dieser Arbeit.

Dr. Christoph Meyer für die Hilfestellung zu Beginn dieser Arbeit.

Dr. Philipp Krattiger für das zur Verfügung stellen des Dispers Rot 1 Derivats.

Allen Institutsangestellten für die grosse Unterstützung.

Dr. Andreas Biland-Thommen, Dr. Eugen Stulz, Dr. Christoph Kressierer, Dr. Martin Spichty, Meike Cordes, Kirsten Koch und Michael Kunz für das Korrekturlesen des Manuskripts.

Michael Kunz für seine Unterstützung während der Dissertationszeit und seine Hilfe bei Computerproblemen.

Den aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Giese und Stulz für eine unvergessliche Zeit.

Für Michi und Marco

Ein grosser Mensch ist, wer sein Kinderherz nicht verliert.
(Chinesisches Sprichwort)

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Inhaltsverzeichnis | I |
| Abkürzungsverzeichnis | V |
| Zusammenfassung | VII |
| Summary | X |
| Theoretischer Teil | 1 |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Struktur und Funktion der DNS | 1 |
| 1.2 Schädigungen und Mutationen der DNS | 3 |
| 1.3 DNS-Analysemethoden | 7 |
| 1.4 Schlussfolgerung | 11 |
| 2 Aufgabenstellung | 12 |
| 3 Methodik | 13 |
| 3.1 Einleitung | 13 |
| 3.2 Die Strategien | 13 |
| 3.3 Die Bruchstelle | 14 |
| 3.4 Die feste Phase | 15 |
| 3.5 Markierung | 16 |
| 3.6 Zusammenfassung | 17 |
| 4 Voruntersuchungen | 18 |
| 4.1 Einleitung | 18 |
| 4.2 Oligonukleotidsynthesen | 18 |
| 4.3 Schmelzpunkte | 23 |
| 4.4 Farbstoff und Oligonukleotid | 28 |
| 4.5 Stabilität des Systems unter Photolysebedingungen | 33 |
| 4.6 Zusammenfassung | 34 |
| 5 Der Aufbau | 35 |
| 5.1 Strategie A: Mehrstufiger Aufbau | 35 |
| 5.2 Strategie B: Einstufiger Aufbau | 36 |
| 5.3 Zusammenfassung | 42 |
| 6 Hybridisierungen | 43 |
| 6.1 Einleitung | 43 |
| 6.2 Einfluss der Hybridisierungsbedingungen | 43 |
| 6.3 Einfluss der Oberflächenbeladung | 45 |

| | | |
|----------------------|---|----|
| 6.4 | Einfluss des Abstandshalters | 46 |
| 6.5 | Hybridisierungsexperimente von Gegensträngen mit Fehlstellen | 47 |
| 6.6 | Ist ein Fischen der richtigen Sequenz möglich? | 47 |
| 6.7 | Zusammenfassung | 50 |
| 7 | Photolysen | 51 |
| 7.1 | Einleitung | 51 |
| 7.2 | Einzelstrangsysteme | 51 |
| 7.3 | Match-Sequenzen | 55 |
| 7.4 | Sequenzen mit Fehlpaarungen | 60 |
| 7.5 | Zusammenfassung | 63 |
| 8 | Alternative Analytik | 64 |
| 8.1 | Einleitung | 64 |
| 8.2 | UV/Vis –Spektroskopie | 64 |
| 8.3 | Betrachtung der Festphase (Mikroskopie) | 67 |
| 8.4 | Zusammenfassung | 68 |
| 9 | Ausblick | 69 |
| Experimenteller Teil | | 71 |
| 10 | Geräte und Materialien | 73 |
| 10.1 | Verwendete Geräte und Materialien | 73 |
| 10.2 | Verwendete Lösungsmittel und Chemikalien | 74 |
| 10.3 | Oligonukleotide | 75 |
| 10.4 | Pufferlösungen | 75 |
| 10.5 | Übersicht über verwendete DNS-Sequenzen | 76 |
| 11 | Synthese der DNS-Synthesizer kompatiblen Bausteine | 81 |
| 11.1 | Synthese des Phosphoramidites von 5'-C-(2-Nitrophenyl)-thymidin | 81 |
| 11.2 | Dispers Rot 1-O-(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit | 83 |
| 12 | Synthese des Capreagenzes | 84 |
| 12.1 | S-(2-Thiopyridyl)-2-mercaptoethanol | 84 |
| 13 | Oligonukleotide | 85 |
| 13.1 | Oligonukleotidsynthesen | 85 |
| 13.2 | Reinigung der Oligonukleotide | 87 |
| 13.3 | Massenbestimmung (MALDI-ToF-MS) | 92 |
| 13.4 | Postsynthetische Modifikationen von Oligonukleotiden | 93 |
| 13.5 | Quantifizierung von Oligonukleotiden | 94 |
| 13.6 | Bestimmung von Extinktionskoeffizienten | 95 |
| 14 | Aufbau des Analysensystems | 97 |
| 14.2 | Mehrstufiger Aufbau | 97 |

| | | |
|----------------------|---|-----|
| 14.3 | Einstufiger Aufbau | 98 |
| 15 | Experimente in Lösung | 102 |
| 15.1 | Bestrahlung TNO ₂ -modifizierter Oligonukleotide | 102 |
| 15.2 | DNS-Schmelzkurven der Doppelstränge in Lösung | 102 |
| 15.3 | UV/Vis-Messungen DR1-modifizierter Oligonukleotide | 104 |
| 16 | Experimente an fester Phase | 105 |
| 16.1 | Hybridisierung an fester Phase | 105 |
| 16.2 | DNS Schmelzkurven der Doppelstränge an fester Phase | 106 |
| 16.3 | Bestrahlungen an fester Phase | 107 |
| 16.4 | Wärmebehandlung von Bestrahlungs- und Hybridisierungsproben | 107 |
| 16.5 | Reduktive Abspaltung von Oligonukleotiden | 107 |
| 17 | Analysen | 108 |
| 17.1 | RP18-HPLC-Analysen | 108 |
| 17.2 | UV/Vis-Analysen | 108 |
| 17.3 | Mikroskopie | 108 |
| Anhang | | 109 |
| 18 | Varia | 111 |
| 18.1 | Die Phosphoramiditmethode | 111 |
| 18.2 | Methode zur Bestimmung der Hybridisierungseffizienz | 112 |
| 18.3 | Aktuelle Bestrahlungstemperatur vs. Kryostattemperatur | 112 |
| 18.4 | Nachweisgrenze für UV/Vis Detektion | 113 |
| 18.5 | Übersichten über Hybridisierungs- und Bestrahlungsexperimente | 114 |
| Literaturverzeichnis | | 119 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------|---|
| °C | Grad Celsius |
| A | Adenin |
| Abb. | Abbildung |
| Ac | Acetat |
| allg. | allgemein |
| B | Base (DNS) |
| bp | Basenpaare |
| bzw. | beziehungsweise |
| C | Cytosin |
| cm | Zentimeter |
| CPG | <i>Controlled Pore Glass</i> |
| div. | diverse |
| DMT | 4,4'-Dimethoxytrityl- |
| DNS | 2'-Desoxyribonukleinsäure |
| DR1 | Dispers Rot 1 |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| Et | Ethyl- |
| FRET | <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i> |
| G | Guanin |
| GVO | Genveränderter Organismus |
| h | Stunde(n) |
| HPLC | <i>High Performance Liquid Chromatography</i> |
| Hz | Hertz |
| h ν | Strahlung (Licht) |
| Kap. | Kapitel |
| kV | Kilovolt |
| lcaa | <i>long chain alkyl amino -</i> |
| Lsg. | Lösung |
| M | molar (mol / L) |
| MALDI-ToF-MS | <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight – Mass Spectrometry</i> |
| MES | Natrium 2-(N-morpholino)-ethansulfonat |
| MHz | Megahertz |

| | |
|------------------|--|
| min. | Minuten |
| mL | Milliliter |
| mM | millimolar |
| mm | <i>Mismatch</i> |
| mRNS | Boten-Ribonukleinsäure |
| nm | Nanometer |
| NMR | <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Kernspinresonanz) |
| ns | Nanosekunde |
| ON | Oligonukleotid |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| Pr | Propyl |
| RNS | Ribonukleinsäure |
| RP | <i>Reversed phase</i> |
| rpm | <i>Rounds per Minute</i> |
| rsp. | respektive |
| RT | Raumtemperatur |
| SNP | <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> |
| SP | Festphase (<i>Solid Phase</i>) |
| T | Thymin |
| Tab. | Tabelle |
| TBAF | Tetrabutylammoniumfluorid |
| TBDMS | <i>tert</i> -Butyldimethylsilyl- |
| TEAA | Triethylammoniumacetat |
| TEMED | <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin |
| TNO ₂ | 5'-Nitrophenylthymidin |
| Tris | 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol |
| U | Uracil |
| UV/Vis | Ultraviolett/Visuell |
| vs. | <i>versus</i> (gegen) |
| W | Watt |
| z.B. | zum Beispiel |
| µL | Mikroliter |
| µm | Mikrometer |
| µM | Mikromolar |

Zusammenfassung

Einleitung: Seit der Strukturaufklärung der DNS wachsen die Informationen um Gendefekte und Gentechnologie stetig an. Daher rührt das grosse Interesse an der Entwicklung von Techniken zur Analyse von DNS-Sequenzen. Viele Methoden zur DNS-Sequenzanalyse oder -erkennung wie DNS-Chips und *real-time* PCR-Methoden sind heute bekannt. Diese Techniken erfordern die Vervielfältigung und oft auch Markierung der Zielsequenzen. Die hier vorgestellte Methode soll es ermöglichen, Sequenzen ohne Vervielfältigung und Markierung, basierend auf selektivem DNS-Strangbruch an der Festphase, qualitativ und quantitativ zu erkennen.

Methode: Analog den Arraytechniken benutzen wir ein Oligonukleotid auf einer Festphase als zentrales Element. In unserer Methode führen wir in dieses immobilisierte Oligonukleotid zwei Modifikationen ein: die photolabile Gruppe **X** und die Markierung **M**. Zusammen mit der Zielsequenz (Analyt) soll dieses Oligonukleotid nun eine Doppelhelix bilden. Nach erfolgter Bestrahlung ist das Oligonukleotid an der vordefinierten Stelle gespalten. Auf Grund der Basenpaarung verbleibt die Markierung **M** bei Anwesenheit des passenden Gegenstranges auf der festen Phase. Im Fall einer

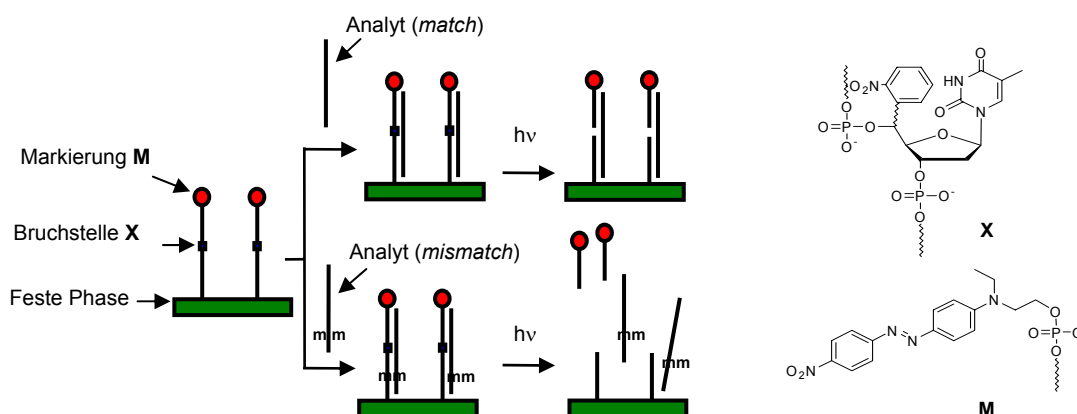
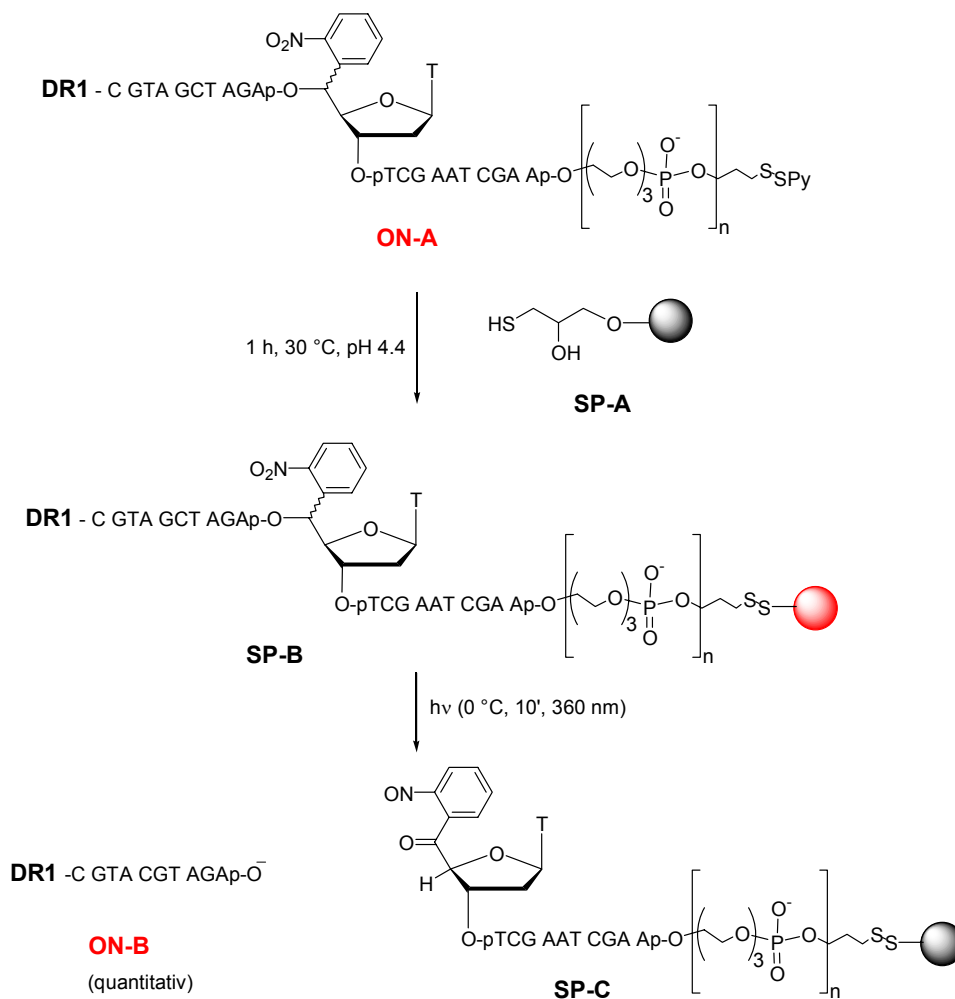


Abbildung A: Die Methode: Immobilisiertes Oligonukleotid mit 5'-Nitrophenylthymidin (**X**) als Bruchstelle und Dispers Rot 1 als Markierung (**M**). Nach Hybridisierung einer Zielsequenz und anschliessender Bestrahlung (10 °C, 10 min., ≥ 360 nm, 500 W) wird das **M**-markierte Fragment auf der Festphase verbleiben (*match*) oder es wird freigesetzt (*mismatch*).

Fehlpaarung (mm) in der Zielsequenz wird die Stabilität der Doppelstrangfragmente reduziert, was die Freisetzung des **M**-markierten Photolyseproduktes **ON-B** mit sich bringt und die Detektion von **M** in der Lösung ermöglicht (*Abbildung A*).

Resultate: Zum Aufbau wurde das Oligonukleotid nach Synthese und Reinigung an einer Festphase immobilisiert. Die hier verwendete Methode des Disulfidaustausches ergab quantitative Immobilisierungsausbeuten für die verwendeten 3'-modifizierten Oligonukleotide (*Schema A*).



Schema A: Immobilisierung des Oligonukleotids ON-A auf der thiolmodifizierten Agarose SP-A und Bestrahlung des Einzelstrangsystems SP-B. Quantitative Freisetzung des Oligonukleotidfragments ON-B.

Die Hybridisierungen von Gegensträngen an diese immobilisierten Oligonukleotide zeigten sehr gute Ausbeuten. Nach Erwärmen auf 85 °C und einer Abkühlzeit von mindestens 1.5 h unter Schütteln wurden quantitative Hybridisierungsausbeuten erzielt.

Die Bestrahlungen von **X**- und **M**-modifizierten Oligonukleotiden an der festen Phase **SP-B** zeigten, dass die Strangspaltung quantitativ verläuft (*Schema A*). Die Bestrahlungen von Doppelstrangsystemen mit dem System **SP-B**, wobei komplementäre Zielsequenzen eingesetzt wurden, zeigen zudem den für die Analyse gewünschten Effekt: die Hauptmenge des Photolyseproduktes **ON-B** (~80 %) verbleibt an der Festphase und kann durch Wärmebehandlung freigesetzt werden. Die Einführung zweier Fehlstellen in die Zielsequenz bewirkt die Freisetzung von **ON-B** direkt nach der Bestrahlung. Das Doppelstrangsystem ist durch diese Fehlstellen soweit destabilisiert worden, dass bei einer Bestrahlungstemperatur von 10 °C kein Doppelstrang mehr besteht. Das dadurch freigesetzte Bestrahlungsprodukt **ON-B** zeigt somit die Anwesenheit der Fehlstellen an. Bei nur einer Fehlstelle in der Zielsequenz zeigen sich, in Abhängigkeit von der Position der Fehlstelle, unterschiedliche Ergebnisse. Die Freisetzung von **ON-B** – und damit die Detektion der Fehlstellen – ist nur für bestimmte Positionen möglich. Es kann aber gezeigt werden, dass eine Anpassung des Systems an eine bestimmte Zielsequenz möglich ist. Mit dem hier gezeigten Doppelstrangeffekt ist das System in der Lage für Analysen eingesetzt zu werden, die darauf abzielen die Anwesenheit einer bekannten Sequenz nachzuweisen. Durch die effiziente Strangspaltung an der Festphase ist zusätzlich die Grundlage zu quantitativen Detektion von DNS-Sequenzen (z.B. für den Nachweis von GVO) gegeben.

Summary

Introduction: In recent times, interest in genetic modification called for the development of important techniques in the analysis of modified oligonucleotide sequences. Many DNA sequence detection methods are known to date, including the use of DNA chips and real-time PCR methodology techniques. However, they all require target amplification and/or labelling steps during analysis. The method developed herein allows the qualitative and quantitative detection of DNA sequences without the need for target amplification or labelling steps prior to the analysis, but is based on the site specific DNA cleavage on solid-support.

Method: Akin to other currently employed techniques, our innovation makes use of an immobilised DNA strand. However, we incorporate a photocleavable site **X**, in addition to a marker tag **M** at the terminus of the strand. Together with the target sequence, a double helix is formed and upon irradiation, **X** is cleaved and the marker containing fragments remain on the support through base pairing with the complementary target strand. In case of mismatches, located either in the upper or lower section, the stability of the double strand is attenuated, and releasing the fragment containing the marker tag **M**, which subsequently is detectable in solution (*Figure A*).

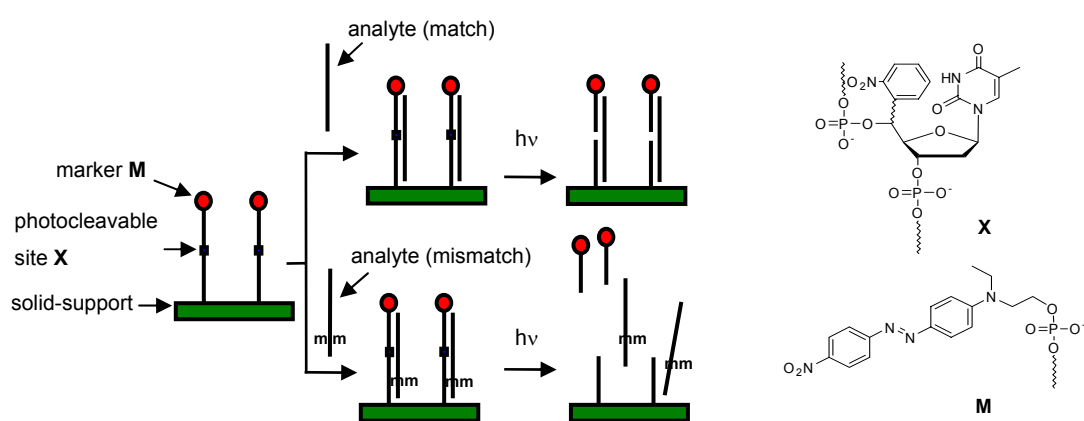
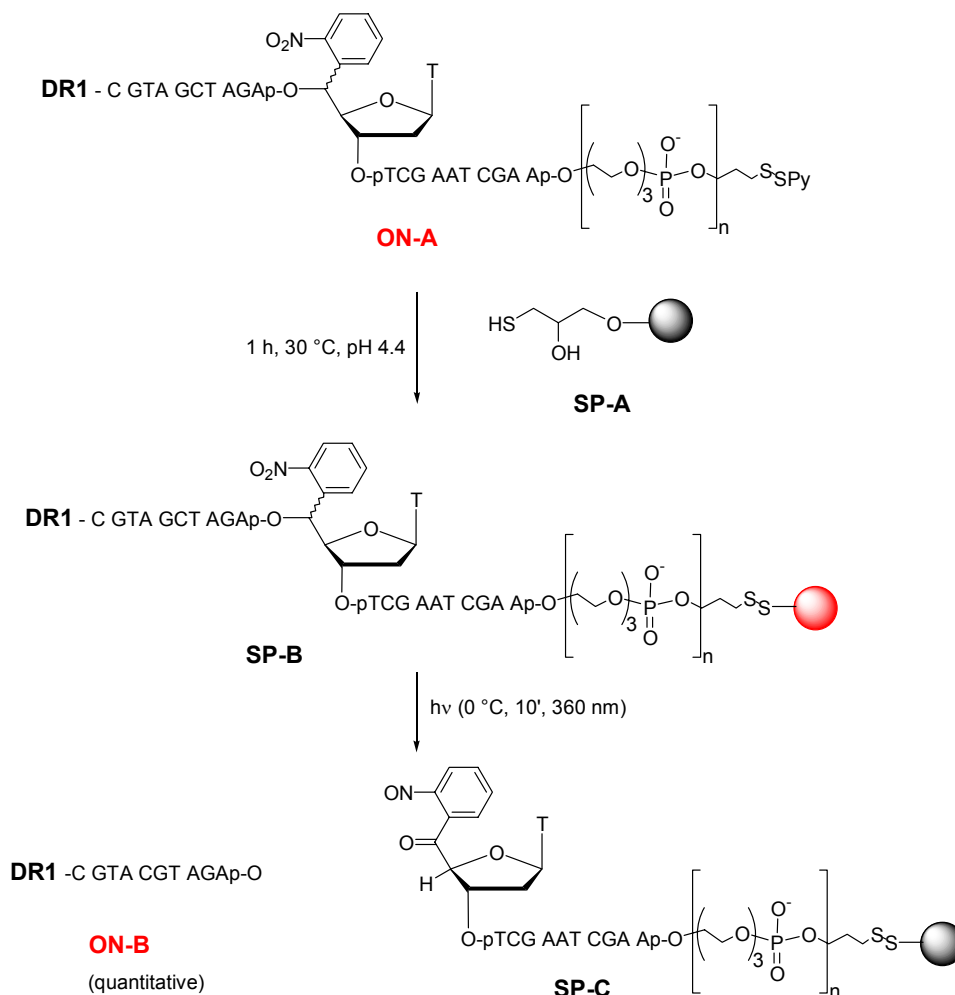


Figure A: Immobilised oligonucleotide containing 5'-nitrophenyl modified thymine (**X**) and Disperse Red 1 (**M**). After hybridisation of a target sequence and subsequent irradiation (10 °C, 10 mins, ≥ 360 nm, 500 W), marked oligofragments remain on the support (match) or are released (mismatch).

Results: For the construction of the device we made use of the disulfide exchange mechanism which lead to quantitative yield for the immobilisation of the used 3' modified oligonucleotides (*Scheme A*).



Scheme A: Immobilisation of oligonucleotide ON-A on the thio modified agarose SP-A. Irradiation of single strand device SP-B. Quantitative release of oligo fragment ON-B.

Furthermore, hybridisation of counter strands to **SP-B** showed good yields. After heating to 85 °C and cooling for a minimum of 1.5 h with stirring, quantitative hybridisation yields were obtained.

Irradiation of an **X** and **M** modified single strand **SP-B** affords quantitative yield of cleavage produkt **ON-B** (*Scheme A*). Identical irradiation experiments using a duplex with the complementary strand did not release the same amount of **ON-B**. The main part of **ON-B** (~80%) remaining on the support could be released upon heat treatment. This is the expected „counter-strand-effect“. Introduction of two mismatches into the counter strand lead to a destabilisation of the helix and therefore liberation of **ON-B** indicating the mismatches. Incorporation of only one mismatch gives various results,

but it could be shown that at selected positions single mismatches (SNPs) can be detected using our methodology. With the obtained “counter-strand-effect” the potential of the herein presented method for qualitative sequence detection could be shown. Furthermore, the effective strand cleavage on the solid support offers the opportunity for quantitative sequence detection (e.g. for GMO evidence).

Theoretischer Teil

1 Einleitung

1.1 Struktur und Funktion der DNS

Bekanntermassen ist die gesamte Erbinformation von Lebewesen in der 2'-Desoxyribonukleinsäure (DNS) gespeichert. Dieser komplexen Aufgabe steht eine relativ einfache Primärstruktur gegenüber. Ein DNS-Einzelstrang besteht aus 2'-Desoxyriboseeinheiten verknüpft über Phosphodiester, die das Rückgrat ausbilden, und vier Nucleobasen, die über eine *N*-glykosidische Bindung mit der Desoxyribose verknüpft sind. Für die Speicherung der genetischen Information sind die vier Nucleobasen, unterteilt in Purin- (Adenin **A** und Guanin **G**) und Pyrimidinbasen (Cytosin **C** und Thymin **T**) verantwortlich (Abbildung 1).¹

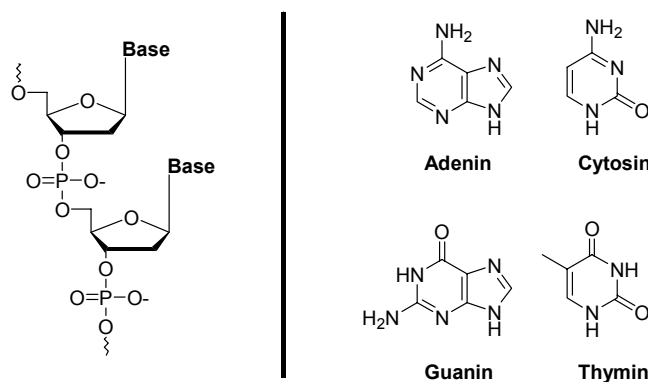


Abbildung 1: Primärstruktur eines DNS-Stranges; die Purinbasen Adenin und Guanin und die Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin.

Die Aufklärung der Sekundärstruktur durch Watson und Crick² im Jahre 1953 beschreibt die Form der DNS als Doppelhelix, bestehend aus zwei Einzelsträngen, die sich antiparallel um eine gemeinsame Achse winden. Unterschiedliche Helixstrukturen können ausgebildet werden.³ Die am häufigsten ausgebildete Form ist die B-Form, daneben existieren die A-, die C- und die Z-Form.

Die Nucleobasen sind dabei zum Zentrum der Helix gerichtet und bilden paarweise Wasserstoffbrücken aus. **A** bildet mit **T** zwei Wasserstoffbrücken aus und **C** mit **G** drei (Abbildung 2). Dieses spezifische Paarungsverhalten bildet die Grundlage der Genetik.

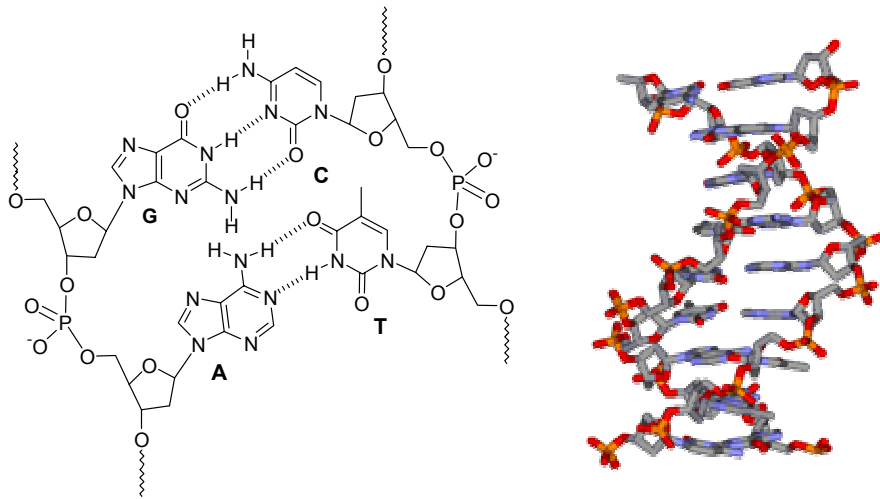


Abbildung 2: Die spezifischen Basenpaare, die zur Bildung einer Doppelhelix führen.

Die DNS besteht aus kodierenden und nicht-kodierenden Regionen. Kodierende Regionen enthalten die Information zum Aufbau von Proteinen und werden Gene genannt. Bei der Biosynthese von Proteinen kodieren immer drei Basen der Boten-Ribonukleinsäure (mRNS) für eine Aminosäure. Diese mRNS wird durch Transkription von der DNS erstellt. Die mRNS dient dann als Templat für die Translation in Proteine.¹

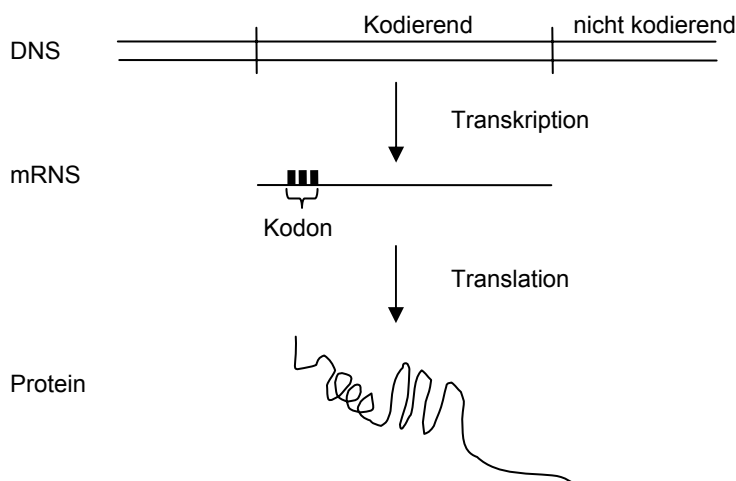


Abbildung 3: Gen-Expression: von der DNS zum Protein.

Tritt nun eine Änderung in der DNS-Sequenz auf, die einen Fehler in der mRNS generiert, kann dies während der Translation bedeuten, dass an dieser Stelle eine andere Aminosäure in das Protein eingebaut wird oder auch, dass die Synthese

abbricht. Solche Änderungen können die unterschiedlichsten Auswirkungen haben. Wie im nachfolgenden Kapitel beschrieben.

1.2 Schädigungen und Mutationen der DNS

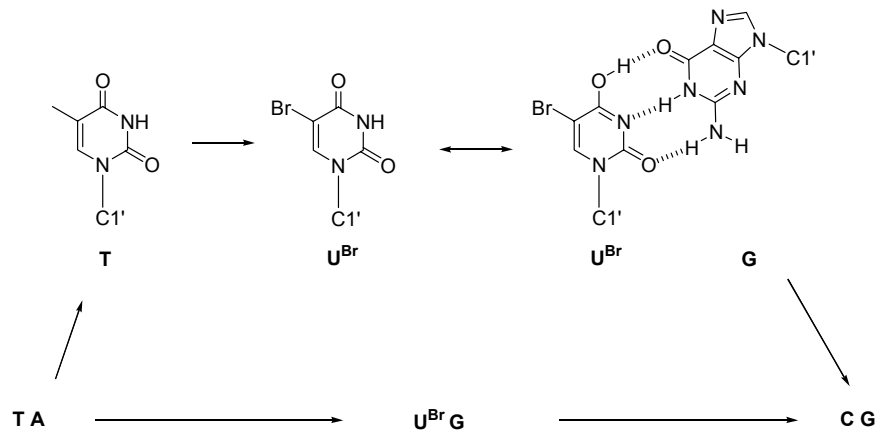
1.2.1 Einleitung

Veränderungen in der Erbsubstanz können dramatische Auswirkungen auf den jeweiligen Organismus haben. Eine Mutation in der DNS-Sequenz kann den Tod einer Zelle bewirken oder die Bildung von Tumorzellen begünstigen. So sind heute viele Krankheiten bekannt, die auf Gendefekte zurückzuführen sind, wie zum Beispiel Sichelzellenanämie⁴ oder cystische Fibrose.⁵ Doch nicht alle Veränderungen sind negativ, so basiert die Evolution auf Veränderungen, die sich als positive Eigenschaften durchgesetzt haben. Auch die moderne Gentechnologie verändert die Erbsubstanz, um Eigenschaften von einer Art auf eine andere zu übertragen.⁶ Im Folgenden werden verschiedene Arten von Änderungen resp. Mutationen in der DNS kurz beschrieben.

1.2.2 Schädigungen und Veränderungen der DNS

1.2.2.1 Spontane Mutationen^{1,7}

Spontane Mutationen finden auf Grund der Tatsache statt, dass Organismen aktiv sind. Die Häufigkeit, mit der solche Mutationen auftreten, ist für einen bestimmten Organismus typisch. Bei Bakterien bewegt sich die Häufigkeit von Mutationen an einer bestimmten Stelle zwischen 10^{-5} und 10^{-6} pro Generation. Solche spontanen Mutationen betreffen meist nur ein Basenpaar und werden deshalb Punktmutationen genannt. Wird zum Beispiel anstelle eines Thymins das Analoge 5-Bromuracil \mathbf{U}^{Br} eingebaut, führt dies zu einer Mutation. Der Bromsubstituent bewirkt, dass \mathbf{U}^{Br} im Vergleich zum \mathbf{T} in der tautomeren Form vorliegt und deshalb eher mit \mathbf{G} ein Basenpaar bildet statt mit \mathbf{A} . Somit wird die DNS-Sequenz an dieser Stelle verändert, statt eines $\mathbf{A-T}$ Paares enthält sie nun ein $\mathbf{G-C}$ Paar. (*Schema 1*)

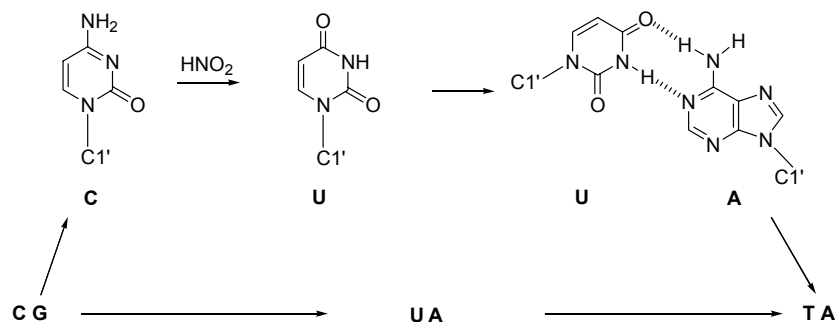


Schema 1: Durch den Einbau von U^{Br} anstelle von T verursachte Transitionsmutation.

Wird, wie in diesem Fall, eine Pyrimidinbase gegen eine Pyrimidinbase ausgetauscht, spricht man von einer Transitionsmutation. Dies gilt auch, wenn eine Purinbase gegen eine Purinbase ausgetauscht wird. Im Gegenzug dazu wird bei Transversionen eine Purin- gegen eine Pyrimidinbase und umgekehrt ersetzt.⁷

1.2.2.2 Mutageninduzierte Veränderungen^{1,7}

Gewisse chemische Verbindungen induzieren durch ihre Reaktionen mit der Erbsubstanz Mutationen. Solche Substanzen werden als Mutagene bezeichnet. Die häufigsten Reaktionen sind Oxidationen und Methylierungen. So wird zum Beispiel Cytosin durch die Reaktion mit Salpetriger Säure oxidativ desaminiert, was zur Entstehung von Uracil führt. Da sich Uracil (das T-Analoge in RNS) mit A paart, führt dies von einem G-C zu einem A-T Paar. (Schema 2)



Schema 2: Durch oxidative Desaminierung von C induzierte Transitionsmutation.

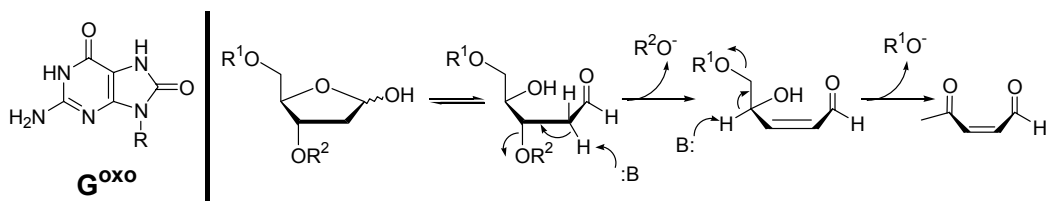
1.2.2.3 Strahlungsinduzierte Veränderungen

Nicht nur chemische, sondern auch physikalische Einflüsse können zu Änderungen in der DNS führen. Strahlung kann abhängig von ihrer Stärke unterschiedlichste Schädigungen in der DNS induzieren. Zum Beispiel kann energiereiche γ -Strahlung die DNS direkt oder indirekt schädigen. Wie in *Schema 3* gezeigt, wirkt die Strahlung direkt auf die DNS. Durch die Energie des Photons wird ein Elektron aus der DNS herausgeschlagen, wodurch ein Radikalkation entsteht. Dieses Radikalkation hat nun eine Vielzahl an möglichen Reaktionswegen: Zerfall, Umlagerungen, Reaktion mit Nucleophilen und Elektroneneinfang.



Schema 3: Direkter Wirkungsmechanismus von γ -Strahlung auf DNS.

Bei indirekter Wirkung schädigen durch γ -Strahlung generierte reaktive Spezies, die mit den Nucleobasen oder dem Zuckerrückgrat reagieren können, die DNS. Die Hauptfolgereaktion ist die Addition von Hydroxylradikalen an die π -Bindungen der Nucleobasen (~ 80%). Durch solche Angriffe wird im Allgemeinen die Elektronendichte, durch die Bildung von z. B. 7,8-Dihydro-8-oxoguanin (G^{oxo}), in den Heterozyklen erniedrigt, was aus den Nucleobasen bessere Abgangsgruppen macht und dadurch letztendlich zu basenfreien Stellen in der DNS führt.⁸ Solche basenfreien Stellen sind alkali-labil und führen unter ebensolchen Bedingungen zum DNS-Strangbruch (*Schema 4*).⁹



Schema 4: Durch Addition des Hydroxylradikals an die Position 8 von G entstandene modifizierte Base G^{oxo} ; baseninduzierter Strangbruch von basenfreien Stellen.

Auch energieärmere Strahlung kann die DNS schädigen. So kann durch UV induzierte Photozyklisierung ein T-Dimer entstehen, welches während der Replikation oder der Transkription zum Abbruch oder zu Mutationen führen kann.¹⁰

1.2.2.4 Gentechnologische Veränderungen

Die moderne Gentechnologie erlaubt es, bekannte Gene von einem Organismus in einen anderen zu transferieren. So kann eine Pflanze mit einem Gen bestückt werden, das sie gegenüber Krankheiten resistent macht. Um Gene in fremde Organismen zu übertragen, werden Vektoren verwendet. Der Vektor wird dabei in eine Wirtszelle gebracht und kann dort auch in das Chromosom aufgenommen werden (*Abbildung 4*). Solche gewollten Veränderungen eines Genoms sind vorerst positiv. Die Veränderung äussert sich in der Exprimierung des eingeführten Gens und führt zu einer zusätzlichen Eigenschaft des Organismus.⁶

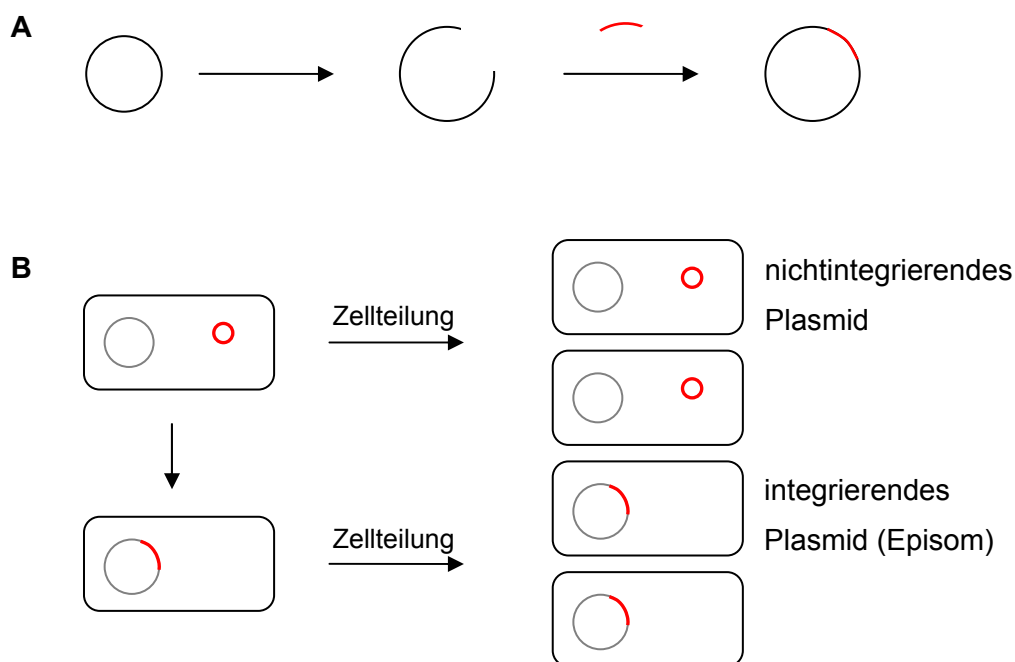


Abbildung 4: A: Einbau eines fremden Gens in einen Vektor, B: Replikation eines rekombinanten Vektors in der Wirtszelle: nichtintegrierendes Plasmid und integrierendes Plasmid (Episom).

Heute sind viele genveränderte Organismen (GVO) technisch und wirtschaftlich nutzbar, bekannt sind unter anderen die Maissorten Roundup Ready® und Yieldgard®. Auch zur Produktion von Medikamenten wie Insulin werden GVOs verwendet.¹¹

1.3 DNS-Analysemethoden

1.3.1 Einleitung

Viele Methoden zur Analyse von DNS sind in den Jahren seit der Entdeckung der Bedeutung der DNS beschrieben worden. Die von Sanger entwickelte Dideoxymethode¹² und die Methode von Maxam und Gilbert¹³ zur Sequenzierung von DNS sind wichtige Methoden, um die genaue Abfolge der Basen in Organismen zu bestimmen. Andere Methoden wie die Chromosomen-Kartierung geben keine Auskunft über die Basenfolge, sondern zeigen für jeweilige Organismen bestimmte Muster, die sich im Krankheitsfalle ändern.¹⁴

Bei den meisten heute durchgeführten DNS-Analysen ist nicht mehr die Sequenzierung des Genoms von Interesse, sondern man möchte kleinste Unterschiede in bekannten Sequenzen schnell detektieren. Meistens handelt es sich dabei um die Detektion von Punktmutationen (SNPs).

Zur Entstehung solcher Proben zur DNS-Analyse hat die Entwicklung der Oligonukleotidsynthese an der Festphase durch Beaucage und Caruthers¹⁵ den wesentlichen Grundstein gelegt. Nun lassen sich synthetisch dargestellte Sequenzen als Proben einsetzen. Dabei wird die Selektivität, mit welcher die Watson-Crick-Basenpaare gebildet werden, ausgenutzt, um Sequenzen zu erkennen. Zusätzlich benötigen all diese Systeme eine Modifikation, die durch Hybridisierung mit der Zielsequenz ein detektierbares Signal generiert, da die Nukleobasen keine eindeutig identifizierbare Funktionalität besitzen. Im folgenden Abschnitt werden nun verschiedene Methoden zur Analyse von DNS-Sequenzen beschrieben.

1.3.2 „Real-time“ Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode, die die *in vitro* Vervielfältigung von DNS unter Verwendung von thermostabilen Polymerasen ermöglicht.¹⁶ Die Reaktion ist in drei Schritte unterteilt: das Denaturieren, das Hybridisieren der zwei Startoligonukleotide *Primer* an die Matrizen und die Kettenverlängerung durch die Polymerase. So wird der Abschnitt der Matrize vervielfältigt, der zwischen den beiden Primersequenzen liegt (*Abbildung 5*).

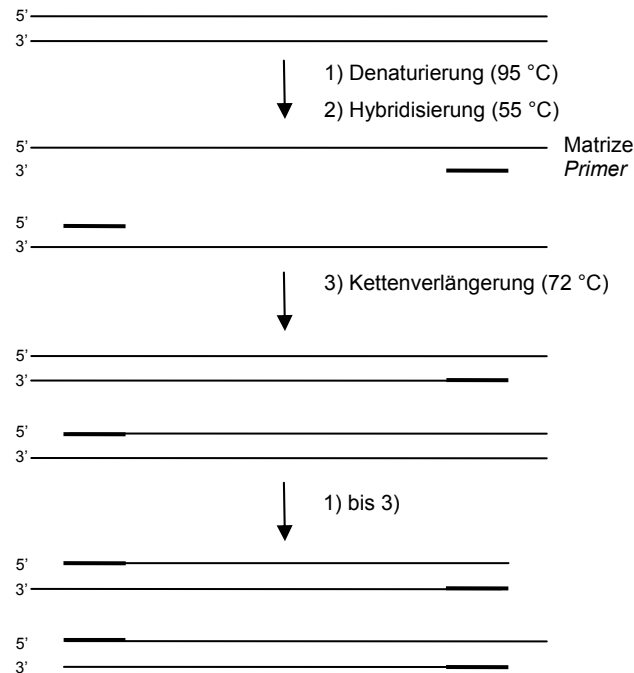


Abbildung 5: Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

Bei der *real-time* PCR-Analyse wird die Akkumulierung der PCR-Produkte während der PCR beobachtet. Das beobachtete Signal wird dabei durch Fluoreszenzfarbstoffe generiert, die an doppelsträngige DNS binden, aber nur geringfügig an einzelsträngige DNS. Am häufigsten verwendet wird hierzu SYBRGreen®. Der Nachteil hierbei ist, dass der Fluoreszenzfarbstoff unspezifisch an Doppelstränge bindet, was bedeutet, dass jedes PCR-Produkt ein Signal generiert, auch wenn es durch so genanntes *mispriming* entstanden ist. Ein weiterer negativer Punkt ist, dass diese Methode nicht sequenzspezifisch ist, da die Signalgeber an jede Art von Doppelstrang binden. Doch gibt es auch die Möglichkeit sequenzspezifische PCR-Analysen durchzuführen. Dabei wird das Signal auf andere Art und Weise generiert. Auch hier sind verschiedene Methoden entwickelt worden: *Primer*-Proben, Signalgenerierung durch Probenspaltung, kompetitive Hybridisierung, lineare Proben und interkalierende Proben.¹⁷

Durch Standardisierung lassen sich mit *real-time* PCR auch DNS-Proben quantifizieren. Verschiedene Designs solcher *real-time* PCR-Methoden werden heute z. B. in der Parasitologie,¹⁸ Onkologie¹⁹ oder Lebensmitteltechnologie²⁰ routinemässig eingesetzt. Dabei geht es meist um den Nachweis von An- oder Abwesenheit einer bestimmten Sequenz. Hauptnachteile sind der apparative Aufwand und der hohe Anspruch an die Reinheit der zu untersuchenden Probe, um die Aktivität der Polymerase nicht zu gefährden.

1.3.3 DNS-Chips / Microarrays

Die heute verwendeten Microarrays sind eine Weiterentwicklung der ersten von Southern entwickelten Arrays.²¹ Zur Darstellung der Microarrays werden Genklone auf Glas immobilisiert oder Oligonukleotide direkt auf den Chips synthetisch dargestellt.²² Das Prinzip bleibt dabei das Gleiche: an immobilisierte DNS wird ein markierter Gegenstrang hybridisiert und anschliessend das Signal z.B. Fluoreszenz ausgewertet. Da die Signale nur dort auftreten, wo auch ein Doppelstrang gebildet wurde, ergeben sich aus der Kombination von Signal und dessen Position Informationen über die Sequenz.

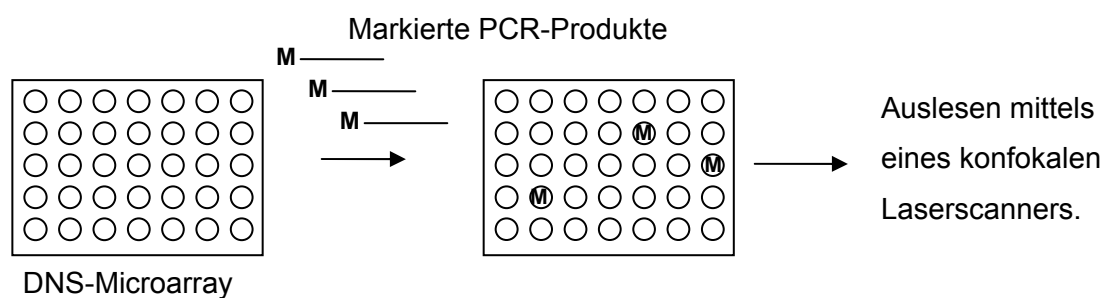
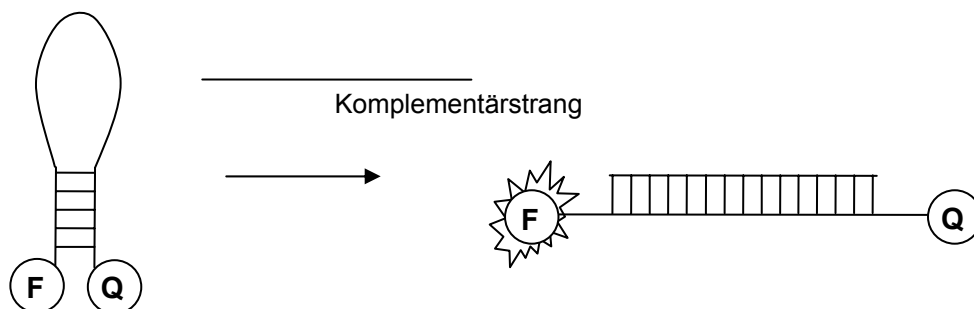


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Funktionsweise von DNS-Microarrays.

Unter Verwendung photolithographischer Methoden ist es heute möglich, abertausende von unterschiedlichen Oligonukleotiden parallel auf Glasplatten zu synthetisieren.^{22d} Die PCR-Produkte werden meistens mit einem Fluoreszenzfarbstoff (z.B. Cy3) markiert. Das Auslesen der Chips erfolgt dann mit einem konfokalen Laserscanner. Mit dieser Methode erreicht man einen grossen Durchsatz an Proben. Dass durch die hohe Dichte an unterschiedlichen Strängen beim Auslesen der Chips eine riesige Datenmenge produziert wird, ist als Nachteil anzuführen. Für die Auswertung der Daten werden leistungsfähige Computerprogramme benötigt. Eine weitere Schwierigkeit ist, dass die Hybridisierung der PCR-Produkte nicht quantitativ verläuft. Neue Entwicklungen sollen die Effizienz steigern (vgl. Kap. 6). Die Sensitivität der Methode liegt im femtomolaren Bereich und variiert mit dem Versuchsaufbau.²³ Mit der Entwicklung von so genannten „*Lab on a chip*“-Anordnungen sind schnelle Analysen ausserhalb eines Speziallabors möglich.²⁴

1.3.4 Molecular Beacons

Die 1996 von Tyagi und Kramer vorgestellte Methode der sogenannten *Molecular Beacons*²⁵ wurde in der Zwischenzeit mehrfach adaptiert und leicht abgewandelt.²⁶ Das Grundprinzip blieb dabei jedoch dasselbe. Die *Molecular Beacons* sind Oligonukleotide, die ein Fluorophor an einem Ende des Stranges und einen Fluoreszenzlöscher (*Quencher*) am anderen Ende des Stranges tragen. Die Sequenz des Oligonukleotids ist so gewählt, dass eine Haarnadelstruktur ausgebildet wird. Durch diese Struktur sind sich das Fluorophor und der *Quencher* räumlich so nah, dass die Fluoreszenz gelöscht ist. Gibt man zum *Molecular Beacon* nun ein Oligonukleotid, dessen Sequenz komplementär zu derjenigen der Schlaufe im *Beacon* ist, wird durch die Bildung des Doppelstranges die Haarnadel geöffnet und eine lineare Struktur entsteht. In dieser linearen Anordnung sind nun das Fluorophor und der *Quencher* räumlich von einander getrennt, so dass die Fluoreszenz nicht mehr gelöscht und detektierbar ist (*Schema 5*). Durch Variation sowohl der Längen als auch der Sequenzen von Schlaufe und Haarnadel-stabilisierendem Stamm, kann die Empfindlichkeit des Systems variiert werden. *Molecular Beacons* werden auch als Reporter bei PCR-Analysen eingesetzt. Der Hauptnachteil dabei ist die Konkurrenz zwischen der bimolekularen Doppelstrangbildung, die zum Signal führt, und der intramolekularen Rückbildung des Stammes. Die Abänderung des Systems zu bimolekularen *Beacons* umgeht dieses Problem. Immobilisierte *Beacons* werden ebenfalls eingesetzt, da sie leicht wieder regeneriert und für weitere Analysen verwendet werden können.



Schema 5: Prinzip der Molecular Beacons: Haarnadelform wird durch die Doppelstrangsequenz des Stammes stabilisiert, wobei der Fluorophor F und der Quencher Q räumlich benachbart sind. Nach Zugabe einer Zielsequenz und Doppelstrangbildung mit der Schlaufensequenz, sind F und Q in der linearen Struktur voneinander distanziert.

1.4 Schlussfolgerungen

Die DNS ist vielen Einflüssen unterworfen, die zu verschiedensten Veränderungen führen können. Die Auswirkungen dieser Veränderungen auf die Zelle sind ebenso variabel, wie es die Einflüsse selbst sind. Sie reichen von der Ausbildung neuer Merkmale, über die Bildung von Krebszellen, bis hin zum Zelltod. Die Wissenschaft auf der einen Seite ist daran interessiert, Veränderungen zu erkennen und sie, falls sie sich negativ auf den Organismus auswirken sollten, zu korrigieren oder aber bewusst Änderungen durch gentechnologische Methoden einzusetzen, um so einen Einfluss auf gewisse Eigenschaften auszuüben. Auf der anderen Seite ist es für Anwender genveränderter Organismen wichtig diese eindeutig zu erkennen. All dies macht es notwendig, Zugriff auf Methoden zu haben, die es erlauben, DNS-Sequenzen sicher und schnell zu analysieren. Obschon einige Methoden zur DNS-Analyse seit Jahren in der Praxis routinemässig eingesetzt werden, sind noch nicht alle Bedürfnisse befriedigt. Jede Methode bringt Nachteile mit sich. Sei dies eine zu geringe Empfindlichkeit, das Generieren von falschen Positivergebnissen (*real-time* PCR), unbefriedigendes Ausnutzen der DNS-Analyten (DNS-Chips), geringe Sensitivität auf Grund langer Analysesequenzen (div. PCR-Methoden) oder die Produktion von beinahe unüberschaubar grossen Datenmengen. Diese Mängel sind der Grund dafür, dass die Entwicklung neuer Methoden noch immer ein häufig angestrebtes Ziel ist.

2 Aufgabenstellung

Als Standardmethoden zur DNS-Analytik werden hauptsächlich Chip- und PCR-Techniken eingesetzt (siehe *Kapitel 1.3*). Beide Methoden haben den Nachteil, dass sie relativ aufwändig sind und nur unter Laborbedingungen durchgeführt werden können.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung einer Methode, die als Schnelltest zur DNS-Analyse bekannter Sequenzen verwendet werden kann. In Anlehnung an die Chiptechnologie soll in unserer Methode ein DNS-Strang auf einer festen Phase fixiert werden. Dieser DNS-Strang soll eine Markierung für die Analyse tragen, um den Markierungsschritt für den Analyten zu umgehen.

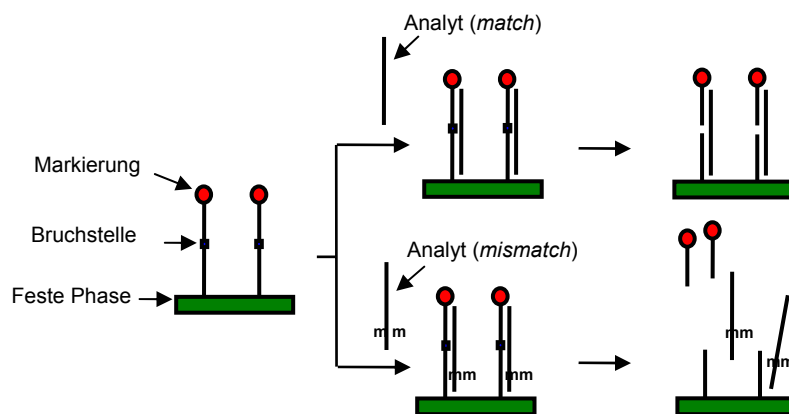


Abbildung 7: Prinzip der neuen DNS-Analysemethode.

Das Prinzip dieser Methode wird in *Abbildung 7* gezeigt: der Analytstrang bildet mit dem Strang auf der festen Phase durch spezifische Basenpaarung einen Doppelstrang aus. Nach dem induzierten Strangbruch durch eine Sollbruchstelle, wird die Markierung durch Basenpaarung mit einem passenden Gegenstrang (*match*) auf der festen Phase zurückgehalten. Nicht spezifische Basenpaarung (*mismatch*) führt zu einer Destabilisierung des Doppelstranges, und das markierte Fragment wird freigesetzt. So ergeben sich zwei unterschiedliche Analysenansätze: die Betrachtung der Lösung, und die Betrachtung der festen Phase.

In der vorliegenden Arbeit soll nun der Aufbau eines solchen Systems realisiert werden. Mit dem System sollen Versuche zur Stabilität und Hybridisierungseffizienz durchgeführt werden.

3 Methodik

3.1 Einleitung

Für den Aufbau des Systems sind einige Vorüberlegungen anzustellen. Auswahl von Aufbaustrategie, Bruchstelle, Festphase und Markierung muss getroffen werden. Jeder Teil muss mit den anderen zusammenpassen, um zum Schluss als Gesamtheit eine stabile Konstruktion zu bilden, die für die DNS-Sequenzanalyse verwendet werden kann.

3.2 Die Strategien

Um ein solches System aufzubauen, gibt es zwei mögliche Strategien: die erste Strategie sieht einen mehrstufigen Aufbau direkt auf der gewählten festen Phase vor, analog dem Aufbau von DNS Chips. Die zweite einen einstufigen Aufbau, bei welchem das vorsynthetisierte Oligonukleotid nach dessen Reinigung an der festen Phase immobilisiert wird (*Abbildung 8*).

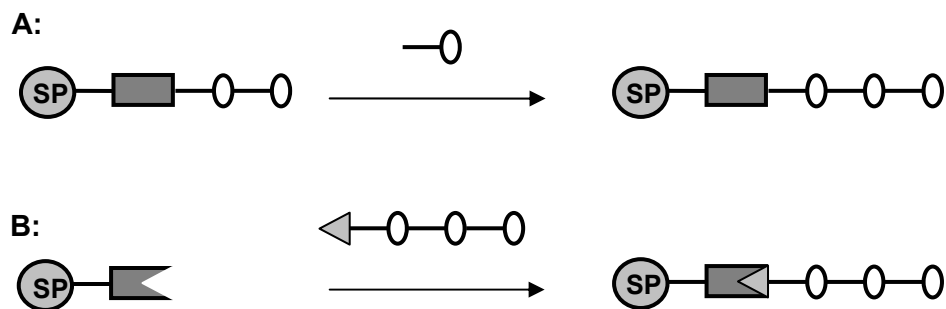


Abbildung 8: Strategien des mehrstufigen (A) und des einstufigen (B) Aufbaus.

Für den Aufbau des Systems nach **A** soll der DNS-Strang mit Hilfe des DNS-Synthesizers auf einer modifizierten Festphase nach der Phosphoramidit-Methode synthetisiert werden. Diese Strategie ist der direkte und schnellste Weg.

Der etwas aufwändigere Aufbau nach **B** führt über die Synthese eines Oligonukleotids, welches an einem Ende so modifiziert ist, dass es sich auf eine Festphase aufbringen lässt. Viele Methoden solcher Immobilisierungstechniken sind aus der Literatur bekannt (*Kap. 5.2*). Beide Strategien wurden zu Beginn dieser Arbeit verfolgt.

3.3 Die Bruchstelle

Die in das Oligonukleotid einzuführende Sollbruchstelle hat viele unterschiedliche Bedingungen zu erfüllen. Für eine unkomplizierte Einführung an einer freiwählbaren Position innerhalb der Sequenz ist es am einfachsten, wenn sich die Modifikation am DNS-Synthesizer als Phosphoramiditbaustein in eine DNS-Sequenz einbauen lässt. Die Sollbruchstelle muss deshalb gegenüber sauren und basischen Bedingungen, wie sie während der DNS-Synthese vorkommen, stabil sein. Eine weitere Anforderung ist Hitzestabilität, da zur Hybridisierung des Analytstranges Temperaturen bis 85 °C verwendet werden. Die wichtigste Eigenschaft, die die Bruchstelle erfüllen muss, ist jedoch die Fähigkeit zu quantitativem Strangbruch, Damit die Möglichkeit zu quantitativen DNS-Analysen weiter gegeben ist.

Im Arbeitskreis um Giese sind in den letzten Jahren Modifikationen entwickelt worden, die sich mittels Standardphosphoramiditchemie in Oligonukleotide einbauen lassen und die zum DNS-Strangbruch führen (*Abbildung 9*).^{27,28,29,30} Der Strangbruch wird in allen Fällen durch Photolyse initiiert, die durch ihre Orthogonalität zu sauren und basischen Bedingungen ideal für die Anwendung in der neuen Methode ist.

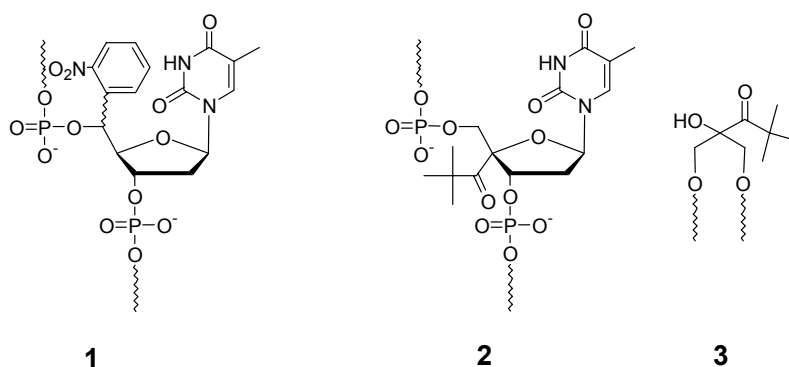
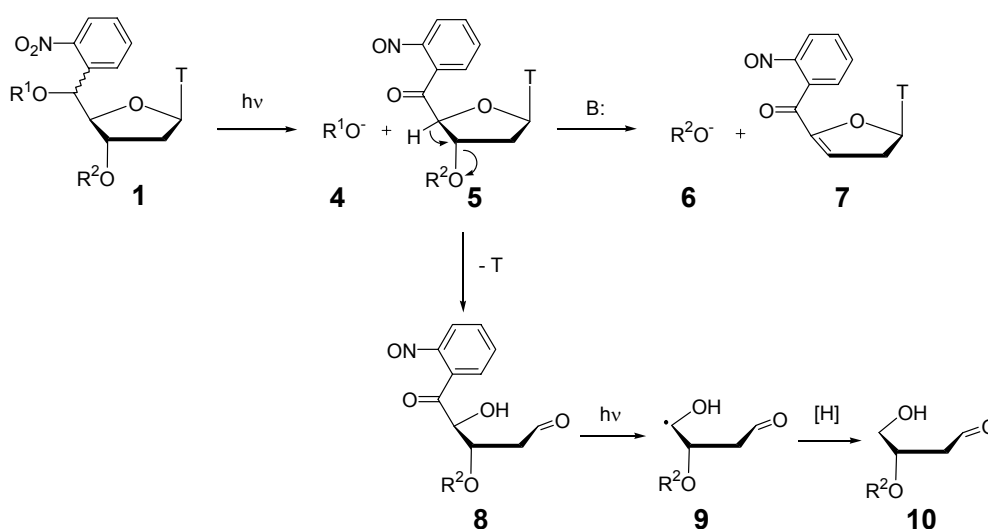


Abbildung 9: Photolabile Stellen: 5'-C-(2-Nitrophenyl)-thymidin **1, 4'-Pivaloylthymidin **2**, 2-C-Pivaloylglycerin **3**.**

Jedoch sind nicht alle photolabilen Modifikationen für unsere Methode gleich gut geeignet. So fehlt dem 2-C-Pivaloylglycerin **3** die Möglichkeit, mit dem Gegenstrang ein Basenpaar auszubilden. Ausserdem zeigen Schmelzpunktmessungen, dass der Schmelzpunkt eines 21mers durch den Einbau von **3** um 12 °C herabgesetzt wird, wohingegen für 4'-Pivaloylthymidin **2** eine Erhöhung um 2 °C und für 5'-C-(2-Nitrophenyl)-thymidin **1** eine Erniedrigung um 3 °C resultieren.²⁷

1 hat gegenüber **2** den Vorteil, dass sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Photolysebedingungen dieselben Photolyseprodukte entstehen. Zusätzlich kann die Photolyse von **1** bei 360 nm durchgeführt werden (max. 335 nm für **2** und **3**), wodurch

die DNS weniger stark geschädigt wird, als bei kürzeren Wellenlängen (vgl. Kap. 1.2.2.3). Dies sind die Gründe, weshalb in der vorliegenden Arbeit nur die Modifikation **1** eingesetzt wird. Die Spaltung von **1** beruht auf der photochemischen Anregung der Arylnitrogruppe. Durch H-Abstraktion in benzylicher Position und anschliessender Hydroxyl-Wanderung findet der Zerfall zum 3'-Phosphat **4** und zum Nitrosoketon **5** statt. Der Strang ist gespalten. **5** reagiert nach Deprotonierung an der α -Position zur Carbonylgruppe zum 5'-Phosphat **6** und zur Nitrosoverbindung **7** oder nach Deglycosylierung und photoinduzierter Norrish-Typ-I-Spaltung über die Intermediate **8** und **9** zum Hydroxyaldehyd **10** (Schema 6).²⁸



Schema 6: Photolyse von 5'-Nitrophenylthymidin **1**.

3.4 Die feste Phase

Der Begriff „feste Phase“ kann eine Polymerstruktur, Partikel von einer definierten Form und Grösse (Mikro- oder Nanopartikel) oder auch eine Oberfläche bezeichnen. Der Vorteil von Festphasen ist, dass sie durch Filtration sehr einfach von einer Lösung abgetrennt werden können. Dieser Vorteil wird auch in der organischen Synthese häufig eingesetzt. So werden vor allem Peptide³¹ und Oligonukleotide³² an der Festphase synthetisiert, aber auch Katalysatoren werden an Festphasen verwendet, um sie nach der Reaktion einfach aus der Lösung zu entfernen.³³

Als Festphasen werden Polymere (z.B. Polystyrol), Glas, Polysaccharide (z.B. Agarose) und auch Metallpartikel (z.B. Gold) verwendet. Je nach Verwendungszweck variieren die Ansprüche an die Festphase. Die Hauptbedingungen, welchen die Festphase genügen muss, sind die geringe bis gar keine unspezifische Wechselwirkung mit Oligonukleotiden und die mögliche Anwendbarkeit in wässrigem

Medium. In der hier vorgestellten Arbeit werden drei Festphasen verwendet: Tentagel, ein auf Polystyrol basierendes Harz, sowie CPG (*controlled pore glass*) und Sepharose, eine modifizierte Agarose (*Abbildung 10*).

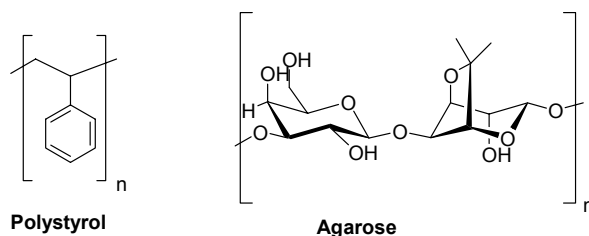
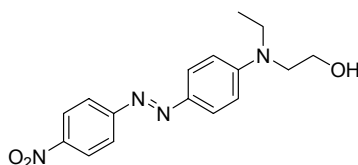


Abbildung 10: Matrixstrukturen der Festphasen Tentagel (Polystyrol) und Sepharose (Agarose).

3.5 Markierung

Für die Markierung von DNS sind viele Modifikationen kommerziell erhältlich. Bei diesen Modifikationen handelt es sich beinahe ausschliesslich um Fluoreszenzfarbstoffe, die oft in Kombination mit Fluoreszenzlöschern oder aber in FRET-Systemen verwendet werden. Als Markierung für DNS kommen aber auch andere Modifikationen in Frage. In der DNS-Analytik häufig verwendet werden auch radioaktive ^{32}P -Markierungen. Beide Methoden benötigen einen gewissen apparativen Aufwand zur Signalauswertung.

Die Idee der Entwicklung einer Methode, die sich auch ausserhalb eines Labors oder mit minimalem apparativem Aufwand durchführen liesse, führt zu optischen Systemen. Am einfachsten ist es, einen optischen Farbstoff einzusetzen. Bei genügend grossem Extinktionskoeffizienten lässt sich so die Lösung mittels UV/Vis-Spektroskopie vermessen oder aber die Entfärbung der Festphase kann von Auge betrachtet werden, was eine Anwendung in der Art von Teststreifen ermöglichen würde.



11

Abbildung 11: Dispers Rot 1.

Für die ersten Versuche soll deshalb ein optischer Farbstoff eingesetzt werden. Auf Grund seines für organische Verbindungen hohen Extinktionskoeffizienten wird der Farbstoff Dispers Rot 1 (**11**) verwendet. Ein weiterer Vorteil ist die synthetische Zugänglichkeit über die primäre Alkoholfunktionalität zur Darstellung eines Bausteins für die automatisierte Oligonukleotidsynthese (siehe *Kap. 18.1*).

3.6 Zusammenfassung

Setzt man nun alle diese Komponenten zusammen, erhält man ein System, das ermöglichen soll, bekannte DNS-Sequenzen zu erkennen. Für diese Arbeit soll das Analysensystem aus folgenden Teilen zusammengesetzt werden: aus 5'-Nitrophenylthymidin (**1**) als Bruchstelle und Dispers Rot 1 (**11**) als optisch detektierbare Markierung. Diese beiden Modifikationen sollen in einen DNS-Strang eingebaut werden. Die so modifizierte DNS soll dann vorzugsweise über das 3'-Ende, mit einer festen Phase verknüpft werden, um das Festphasensystem **SP1** zu erhalten. Dabei ist die Art der Festphase abhängig von der Zugänglichkeit, je nach gewählter Strategie. Die beiden in *Kapitel 3.2* beschriebenen Strategien sollen parallel verfolgt und somit auf ihre Anwendbarkeit überprüft werden.

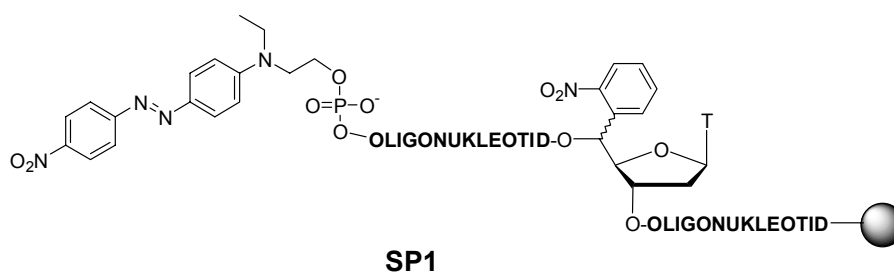


Abbildung 12: System SP1 mit den festgesetzten Komponenten Dispers Rot 1 (11**) und 5'-Nitrophenylthymidin (**1**).**

4 Voruntersuchungen

4.1 Einleitung

Verschiedene Voruntersuchungen sind notwendig, um das System auf seine Anwendbarkeit für die vorgestellte Methode zu überprüfen. Gibt es unerwünschte Wechselwirkungen zwischen DNS und fester Phase? Lassen sich alle Modifikationen in einen einzigen Strang einführen? Sind alle eingeführten Modifikationen unter den entsprechenden Bedingungen stabil? Wie ist das Potenzial der Methode überhaupt einzuschätzen und wie lang müssen die Sequenzen sein, um ausreichende Basenpaarung auszubilden? Diese Fragen sollen in den nun folgenden Kapiteln behandelt werden.

4.2 Oligonukleotidsynthesen

Viele Modifikationen für Oligonukleotide sind bekannt und auch kommerziell als Phosphoramidit-Bausteine oder vormodifizierte Festphasen erhältlich. Auch modifizierte Oligonukleotide sind kommerziell erhältlich. Die meisten tragen eine, maximal zwei Modifikationen. Für den Aufbau der hier beschriebenen Methode war es notwendig drei bis vier Modifikationen gezielt in einen einzigen DNS-Strang einzuführen. Sowohl die internen Modifikationen, als auch die 5'-Modifikationen wurden als Phosphoramidit-Bausteine eingesetzt. Um das 3'-Ende zu modifizieren wurden käufliche, vorgefertigte Festphasen angewendet. Die verschiedenen Modifikationen sind in *Abbildung 13* gezeigt. Die Phosphoramidite von Dispers Rot 1 (**12**) und des photolabilen Bausteins 5'-Nitrophenylthymidin (**13**) sind die zentralen Elemente der Methode. Für den Aufbau nach der einstufigen Methode wurden die Thiomodifikationen am 5'- und am 3'-Ende über die Elemente **14** und **16** eingeführt. Der Polyethylenglycolbaustein (**15**) wurde zusätzlich zur Modifikation **16** verwendet. Zur Darstellung von 3'-Phosphaten wurde die Festphase **17** verwendet. Kommerziell erhältlich sind die Modifikationen **14**, **15** und die 3'-Modifikationen **16** und **17**.

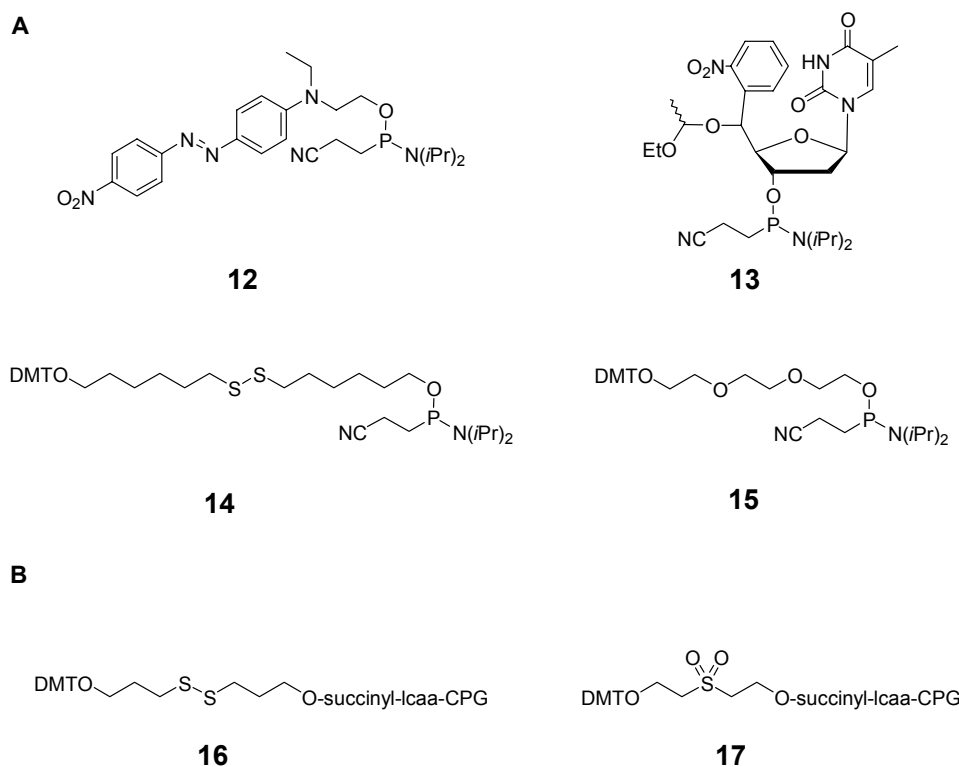
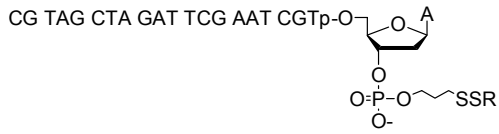


Abbildung 13: Bausteine für interne und 5'-Oligonukleotidmodifikation (A); Festphasen zur 3'-Oligonukleotidmodifikation (B).

Verschiedene Kombinationen von Modifikationen wurden in Oligonukleotide eingefügt. Die Synthesen wurden alle nach der Phosphoramiditmethode durchgeführt.¹⁵ Die Oligonukleotide wurden nach der Synthese mittels RP18-HPLC gereinigt. Die Oligonukleotide **ON8A** und **ON11A** wurden unter Anwendung von PAGE gereinigt, da sie sich nicht mittels RP18-HPLC von Nebenprodukten trennen liessen. Die nach der Synthese erhaltenen Alkyldisulfide wurden nach Reduktion mit DTT unter Verwendung von 2,2'-Dithiodipyridin zu den pyridylmodifizierten Oligonukleotiden umgesetzt. Diese pyridylmodifizierten Oligonukleotide konnten dann für die Immobilisierungen eingesetzt werden (Kap. 5.2). Die dargestellten Oligonukleotide wurden für verschiedene Untersuchungen entweder in Lösung oder auf der Festphase immobilisiert eingesetzt. Die dargestellten Oligonukleotide und ihre Verwendungszwecke sind hier gezeigt:

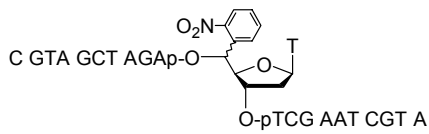


ON1A: R = -C₃H₆OH

ON1B: R = -Py

21 bp

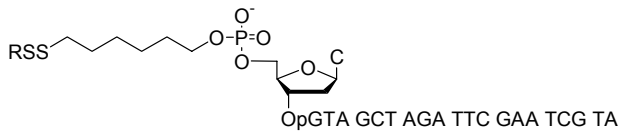
- Immobilisierungen → **SP4**
- Hybridisierungen
- Bestrahlungen
- Schmelzpunkte



ON2

21 bp

- Bestrahlungen
- Schmelzpunkte

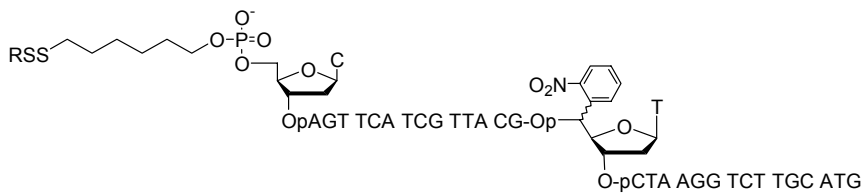


ON3A: R = -C₃H₆OH

ON3B: R = -Py

21 bp

- Immobilisierungen → **SP18**
- Hybridisierungen
- Bestrahlungen
- Schmelzpunkte

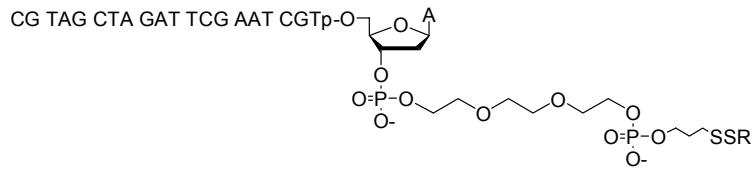


ON4A: R = -C₃H₆OH

ON4B: R = -Py

31 bp

- Immobilisierungen → **SP19**
- Hybridisierungen
- Bestrahlungen

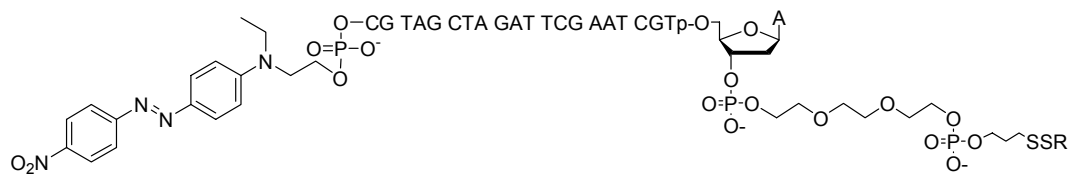


ON5A: R = $-\text{C}_3\text{H}_6\text{OH}$

ON5B: R = $-\text{Py}$

21 bp

- Immobilisierungen → **SP2**
- Hybridisierungen
- Bestrahlungen
- Schmelzpunkte

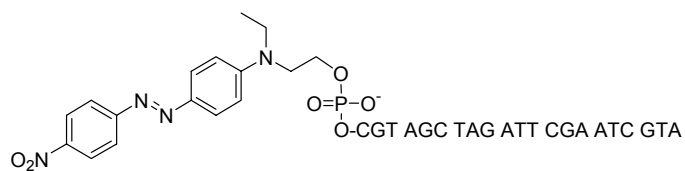


ON6A: R = $-\text{C}_3\text{H}_6\text{OH}$

ON6B: R = $-\text{Py}$

21 bp

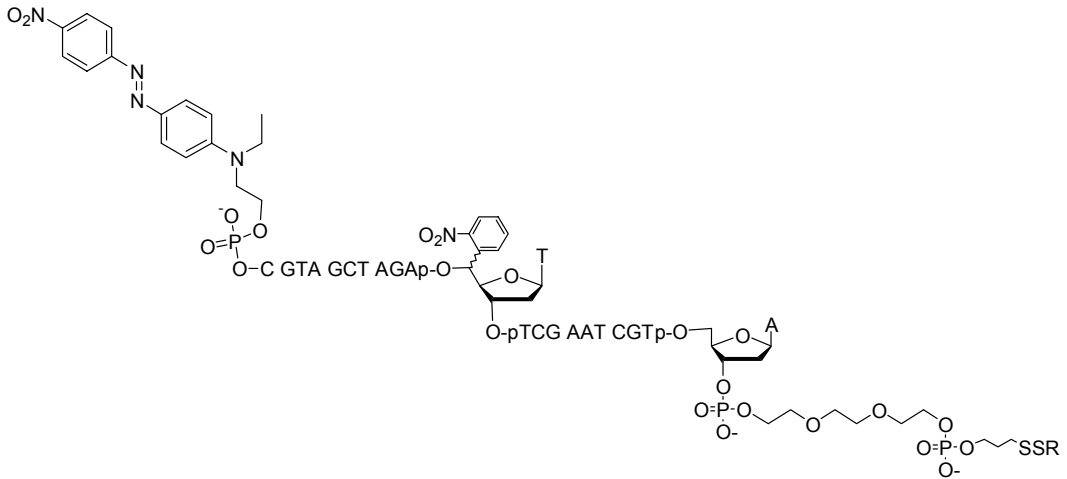
- Immobilisierungen → **SP3**
- Hybridisierungen
- Bestrahlungen
- Schmelzpunkte
- Mikroskop-Bilder



ON7

21 bp

- Schmelzpunkte
- UV/Vis
- Extinktionskoeffizient

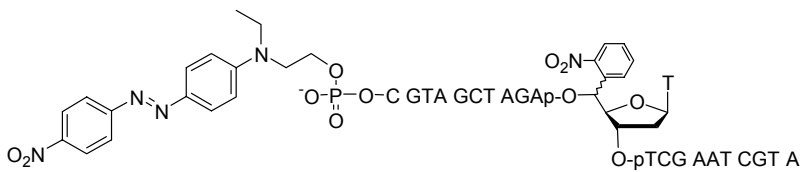


ON8A: R = $-\text{C}_3\text{H}_6\text{OH}$

ON8B: R = $-\text{Py}$

21 bp

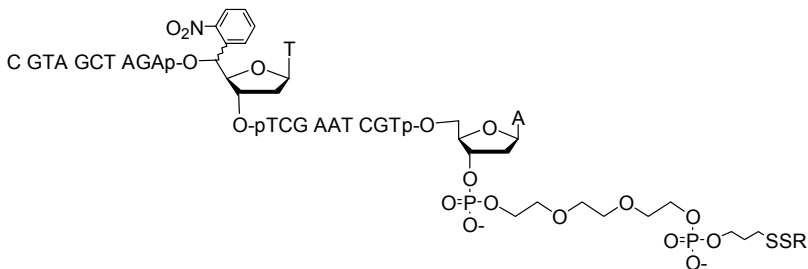
- Immobilisierungen → **SP20**, **SP23**
- Hybridisierungen
- Bestrahlungen
- Schmelzpunkte
- Mikroskop-Bilder



ON9

21 bp

- Synthese und Reinigung

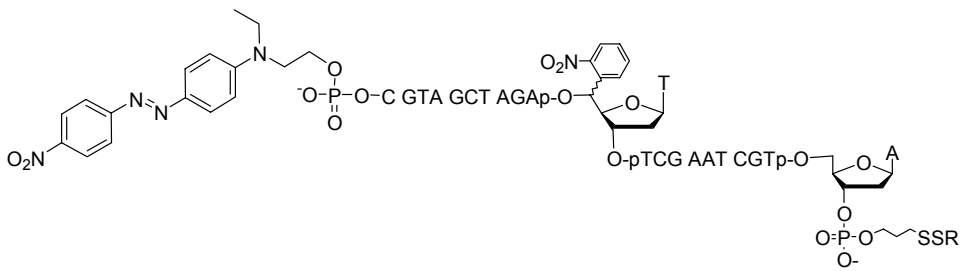


ON10A: R = $-\text{C}_3\text{H}_6\text{OH}$

ON10B: R = $-\text{Py}$

21 bp

- Immobilisierungen → **SP21**
- Hybridisierungen
- Bestrahlungen



ON11A: R = $-\text{C}_3\text{H}_6\text{OH}$

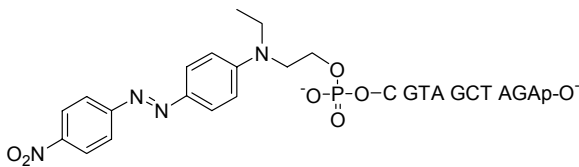
- Immobilisierungen → **SP22**

ON11B: R = $-\text{Py}$

- Hybridisierungen

21 bp

- Bestrahlungen



ON12

- UV/Vis

21 bp

- Externer Standard

4.3 Schmelzpunkte

Die nicht kovalenten Wasserstoffbindungen, die eine DNS Doppelhelix stabilisieren, können durch ein Erhöhen der Temperatur aufgeschmolzen werden. Dieses Schmelzen oder Denaturieren einer Doppelhelix kann bei 260 nm UV-spektroskopisch beobachtet werden. Der Grund dafür ist, dass die Absorption doppelsträngiger DNS ungefähr um 40 % geringer ist, als bei einer identischen Mischung freier Nukleotide. Dieses Verhalten wird als hyperchromer Effekt bezeichnet. Der Schmelzpunkt eines Doppelstranges ist per Definition derjenige Punkt, an welchem die Hälfte des Doppelstranges als Einzelstrang vorliegt.³⁴ Über den Schmelzpunkt eines DNS-Stranges lassen sich Rückschlüsse auf die Stabilität des Doppelstranges ziehen. In den folgenden Abschnitten sollen nun auf Grund der gemessenen Schmelzpunkte verschiedene Aspekte betrachtet werden.

4.3.1 Potenzial des Systems 31mer vs. 21mer (in Lösung)

Um eine Vorstellung vom Selektivitätspotenzial der zu entwickelnden Methode zu bekommen, wurde der Schmelzpunkt von verschiedenen 31mer- und 21mer-Systemen bestimmt. Die Systeme sind den Situationen, wie sie vor und nach der Strangspaltung vorliegen, nachempfunden. Weiter gaben diese Messungen einen Anhaltspunkt über die Temperatur, bei welcher die Experimente durchgeführt werden müssen, um die gewünschte Differenzierung zu erzielen. Betrachtete man die Schmelzpunkte der 31mer-Systeme, waren folgende Schlüsse zu ziehen (*Tabelle 1*): Ein bestrahltes System, bei welchem die beiden Photolyseprodukte als 15mer Fragmente bestehen, hatte im Falle der *match*-Sequenz einen Schmelzpunkt von 52.3 °C. Das bedeutete, dass die Bestrahlungstemperatur unter 52.3 °C liegen müsste, damit das System auf Grund der Basenpaarung zusammenhält. Führte man in jedes dieser Fragmente eine fehlgepaarte Stellen ein, so sank der Schmelzpunkt um 9.1 °C auf 43.2 °C. Um dem System die Möglichkeit zu geben, zwischen gepaarter und fehlgepaarter Situation zu unterscheiden, müsste die Temperatur des Experimentes zwischen diesen beiden gemessenen Schmelzpunkten liegen. Wählt man eine Bestrahlungstemperatur, die unter 43.2 °C liegt, würde das fehlgepaarte System als Doppelstrangsystem vorliegen und sich nicht mehr von dem gepaarten System unterscheiden. Für Systeme mit zwei Fehlstellen pro Fragment wäre eine Unterscheidung noch möglich.

Tabelle 1: Übersicht über verschiedene 31mer-Systeme, die unterschiedliche Situationen vor und nach der Bestrahlung simulieren sollen.

| | Sequenz | T_m / [°C] |
|---|---|--------------|
| 1 | CATGCAAGACCTTAGACGTAACGATGAACTG GTACGTTCTGGAATCTGCATTGCTACTTGAC ON15/ON14 | 70.0 |
| 2 | CATGCAAGACATTAGACGTACCGATGAACTG GTACGTTCTGGAATCTGCATTGCTACTTGAC ON16/ON14 | 61.5 |
| 3 | CATGCCAGACATTAGACGTACCGATTAAGT GTACGTTCTGGAATCTGCATTGCTACTTGAC ON17/ON14 | 50.0 |
| 4 | CATGCAAGACCTTAG—A—CGTAACGATGAACTG GTACGTTCTGGAATCp pGCATTGCTACTTGAC ON15/ON18/ON19 | 52.3 |
| 5 | CATGCAAGACATTAG—A—CGTACCGATGAACTG GTACGTTCTGGAATCp pGCATTGCTACTTGAC ON16/ON18/ON19 | 43.2 |
| 6 | CATGCCAGACATTAG—A—CGTACCGATTAAGT GTACGTTCTGGAATCp pGCATTGCTACTTGAC ON17/ON18/ON19 | 29.5 |

Wiederholte man derartige Messungen mit 21mer-Systemen (*Tabelle 2*), wurde deutlich, dass die Temperatur, bei welcher das Experiment durchgeführt werden muss, bei etwa 15 °C liegen sollte. Das System mit den 10mer Fragmenten, bei dem ein Schmelzpunkt von 33 °C gemessen wurde, läge somit nach der Bestrahlung vollständig als Doppelstrang vor. Bei dem gemessenen fehlgepaarten System lag der Schmelzpunkt nicht im Messbereich von 15 °C bis 80 °C.

Tabelle 2: Übersicht über verschiedene 21mer-Systeme, die unterschiedliche Situationen vor und nach der Bestrahlung simulieren sollen. a) kein Schmelzpunkt im Messbereich: 15 – 80 °C.

| | Sequenz | | T_m / [°C] |
|----|--|-----------------------|-----------------------------|
| 1 | TACGATTCGAATCTAGCTACG ATGCTAAGCTTAGATCGATGC | ON13/ON20 | 62.6 |
| 2 | TACGATTCGA—A—TCTAGCTACG ATGCTAAGCTp pAGATCGATGC | ON13/ON21/ON22 | 32.2 |
| 3 | TACGATTCGA— G —TCTAGCTACG ATGCTAAGCTp pAGATCGATGC | ON23/ON21/ON22 | 31.9 |
| 4 | TACGATT A GA—A—TC G AGCTACG ATGCTA A GCTp pAG A T A TCGATGC | ON24/ON21/ON22 | -- ^{a)} |
| 5 | TACGATTCGA—A—TCTAGCTACG ATGCTAAGCTp | ON13/ON22 | 33.7 |
| 6 | TACGATTCGA—A—TCTAGCTACG pAGATCGATGC | ON13/ON21 | 33.7 |
| 7 | TACGATTCGA—A—TCTAGCTACG pAGATCGATGC-p DR1 | ON13/ON12 | 35.8 |
| 8 | TACGATT A GA—A—TC G AGCTACG pAG A T A TCGATGC | ON24/ON21 | -- ^{a)} |
| 9 | TACGATT A GA—A—TC G AGCTACG ATGCTA A GCTp | ON24/ON22 | -- ^{a)} |
| 10 | TACGATTCGA—A—TC G AGCTACG pAG A T A TCGATGC-p DR1 | ON24/ON12 | -- ^{a)} |
| 11 | TACGATTCGAATCTAGCTACG ATGCTAAGCTTAGATCGATGC-p DR1 | ON13/ON7 | 66.4 |
| 12 | TACGATTCGA—A—TCTAGCTACG PySS- Sp9 p-ATGCTAAGCTT NO ₂ AGATCGATGC-p DR1 | ON13/ON8B | 65.8 |

Sowohl bei den 31mer-Systemen als auch bei den 21mer-Systemen ist ein Temperaturbereich definierbar, in welchem die Experimente durchgeführt werden müssen, um den gewünschten Effekt der Differenzierung zu erhalten. Für die experimentelle Durchführung ist jedoch das 21mer-System geeigneter. Das 31mer-System erfordert höhere Temperatur und da ein Absinken der Temperatur die Doppelstrangbildung der fehlgepaarten Systeme ermöglicht, müsste die Temperatur ständig hochgehalten werden. Wählt man beim 21mer-System eine Temperatur unter 15 °C (Beginn des Messbereichs), so kann der Effekt, falls noch nicht deutlich hervorgetreten, durch leichtes Erwärmen erreicht werden.

4.3.2 Einfluss der verschiedenen Modifikationen

Das Einführen von Modifikationen in eine DNS-Doppelhelix kann entweder einen stabilisierenden oder aber einen destabilisierenden Effekt haben. Von verschiedenen Doppelstrangsystemen wurden deshalb die Schmelzpunkte bestimmt. Es wurden die Schmelzpunkte in Lösung aber auch an fester Phase betrachtet, da die Festphase ebenfalls eine Art Modifikation darstellt. Die Darstellung der Festphasensysteme wird in *Kapitel 5.2* beschrieben.

Aus Messungen an fester Phase resultierten Schmelzkurven mit starkem Rauschen (*Abbildung 14*), welche erst bearbeitet werden mussten (*Origin6.0*, sigmoidaler fit), bevor der Schmelzpunkt bestimmt werden konnte.

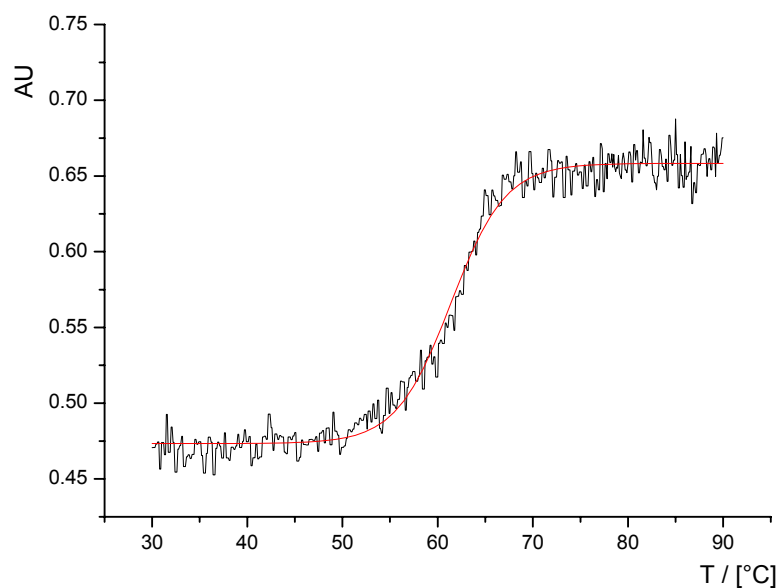


Abbildung 14: DNS-Schmelzkurve an fester Phase. Rote Linie: sigmoidal gefittete Kurve.

Tabelle 3 zeigt die gemessenen Werte. Daraus geht hervor, dass der Einfluss der Festphase gering war. Vergleicht man den Schmelzpunkt des Systems **ON20/ON13** von 62.6 °C mit demjenigen auf der Festphase von 58.6 °C war zwar eine Absenkung des Schmelzpunktes von 4 °C auszumachen, jedoch liess sich dieser destabilisierende Effekt durch das Einfügen eines Distanzhalters wie in **SP2/ON13** verringern, was der Schmelzpunkt von 61.2 °C bei diesem System zeigte.

Tabelle 3: Übersicht über gemessene Schmelzpunkte in Lösung und an fester Phase in Phosphat-Puffer 1 pH=7. a) gerührt, mit *Origin6.0* (sigmoidaler fit) bearbeitet.

| | Sequenz | | T_m / [°C] |
|----|--|------------------|-----------------------------|
| 1 | TACGATTCGAATCTAGCTACG ATGCTAAGCTTAGATCGATGC | ON13/ON20 | 62.6 |
| 2 | TACGATTCGA—A—TCTAGCTACG pAGATCGATGC | ON13/ON21 | 33.7 |
| 3 | TACGATTCGA—A—TCTAGCTACG pAGATCGATGC-p DR1 | ON13/ON12 | 35.8 |
| 4 | TACGATTCGAATCTAGCTACG ATGCTAAGCTTAGATCGATGC-p DR1 | ON13/ON7 | 66.4 |
| 5 | TACGATTCGA—A—TCTAGCTACG PySS- Sp9p -ATGCTAAGCTT NO₂ AGATCGATGC-p DR1 | ON13/ON8B | 65.8 |
| 6 | TACGATTCGA—A—TCTAGCTACG ATGCTAAGCTT NO₂ AGATCGATGC | ON13/ON2 | 51.6 |
| 7 | TACGATTCGAATCTAGCTACG SP-SS- Sp9p ATGCTAAGCTTAGATCGATGC | ON13/SP2 | 61.2 ^{a)} |
| 8 | TACGATTCGAATCTAGCTACG SP-SS-pATGCTAAGCTTAGATCGATGC | ON13/SP4 | 58.6 ^{a)} |
| 9 | TACGATTCGAATCTAGCTACG SP-SS- Sp9p ATGCTAAGCTTAGATCGATGC-p DR1 | ON13/SP3 | 63.5 ^{a)} |
| 10 | pTCTAGCTACG SP-SS- Sp9p ATGCTAAGCTTAGATCGATGC-p DR1 | ON54/SP3 | 27.0 ^{a)} |
| 11 | TACGATTCGA—A—TCTAGCTACG SP-SS- Sp9p -ATGCTAAGCTT NO₂ AGATCGATGC-p DR1 | ON13/SP5 | 56.9 ^{a)} |

Im Gegensatz zur leicht destabilisierenden Wirkung der festen Phase auf den Doppelstrang, schien der Farbstoff **11** eine stabilisierende Wirkung zu haben. Die Werte für vergleichbare **DR1**-modifizierte und unmodifizierte Systeme zeigten immer

eine Erhöhung des Schmelzpunktes. Für **ON13/ON20** und **ON13/ON7** resultiert eine Erhöhung von 3.8 °C, für **ON13/ON21** und **ON13/ON12** von 2.1 °C und für **ON13/SP2** und **ON13/SP3** von 2.3 °C. Wie schon aus früheren Arbeiten bekannt, hat **1** einen destabilisierenden Einfluss auf einen Doppelstrang. Die gemessene Erniedrigung betrug 3 bis 4 °C.²⁷ Im Gegenzug dazu zeigten die hier präsentierten Messungen Differenzen von 11 °C für vergleichbare Systeme in Lösung (**ON20/ON13** und **ON2/ON13**) und 4.8 °C für diejenigen an fester Phase (**SP3/ON13** und **SP4/ON13**). Trotz der destabilisierenden Wirkungen der meisten Modifikationen, zeigten die Messungen, dass das System an der festen Phase mit allen Modifikationen genügend Stabilität besitzt, um für die Methode eingesetzt zu werden.

4.4 Farbstoff und Oligonukleotid

Dass sich der Farbstoff Dispers Rot 1 (**11**) durch Standardphosphoramiditchemie an das 5'-Ende eines Oligonukleotids anbringen lässt, konnte im *Kapitel 4.2* gezeigt werden. Wie sich jedoch die Eigenschaften des Farbstoffes und des Oligonukleotids dadurch verändern, bleibt noch zu untersuchen. Die Wasserunlöslichkeit des Farbstoffes erwies sich als unproblematisch. Alle in *Kapitel 4.2* dargestellten **DR1**-modifizierten Oligonukleotide (**ON6-9**, **ON11/12**) blieben wasserlöslich.

Zwei Eigenschaften des Farbstoffes gaben dennoch Anlass zur genaueren Betrachtung. Azoverbindungen unterliegen einer raschen cis-trans-Isomerisierung initiiert durch Strahlung³⁵ und trans-Azobenzole sind in der Lage in DNS zu interkalieren.³⁶ Da von Interkalatoren bekannt ist, dass sie zusammen mit Licht DNS schädigen können,³⁷ musste das System dahingehend ebenfalls untersucht werden (*Abbildung 15*).

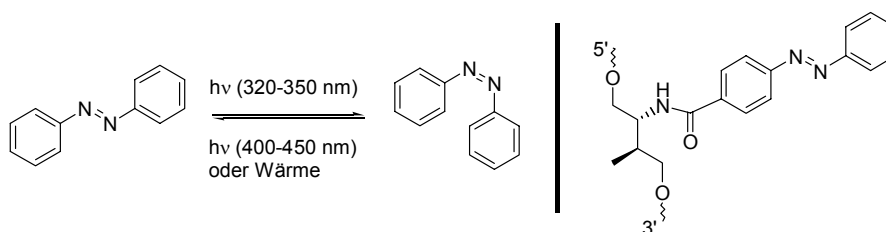
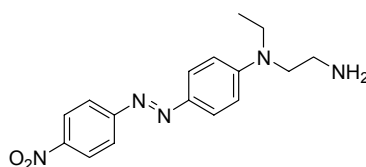


Abbildung 15: Photoinduzierte cis-trans-Isomerie von Azobenzol; in DNS eingebauter trans-Azobenzylbaustein.

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der UV/Vis-Messungen beschrieben. Die Stabilität eines immobilisierten **DR1**-Oligonukleotids unter Photolysebedingungen wird in *Kapitel 4.5.2* beschrieben.

4.4.1 UV-Vis Messungen

Falls **DR1** mit den Basen der DNS Wechselwirkung beispielsweise π -Stapelung zeigt, stellen sich die Fragen, wie sich diese Wechselwirkungen auf das System auswirken, ob eine Photolyse noch möglich ist und ob sich im Einzelstrang und Doppelstrang unterschiedliche Wechselwirkungen zeigen?



18

Abbildung 16: Gering wasserlösliches Derivat von DR1 (18).

Verglich man zunächst die gemessenen UV/Vis-Spektren des Farbstoffderivats **18** in Wasser mit demjenigen von **DR1**-modifizierten Einzelsträngen, fiel die starke Rotverschiebung des Maximums um 40 nm von 480 nm nach 520 nm auf (*Abbildung 17*).

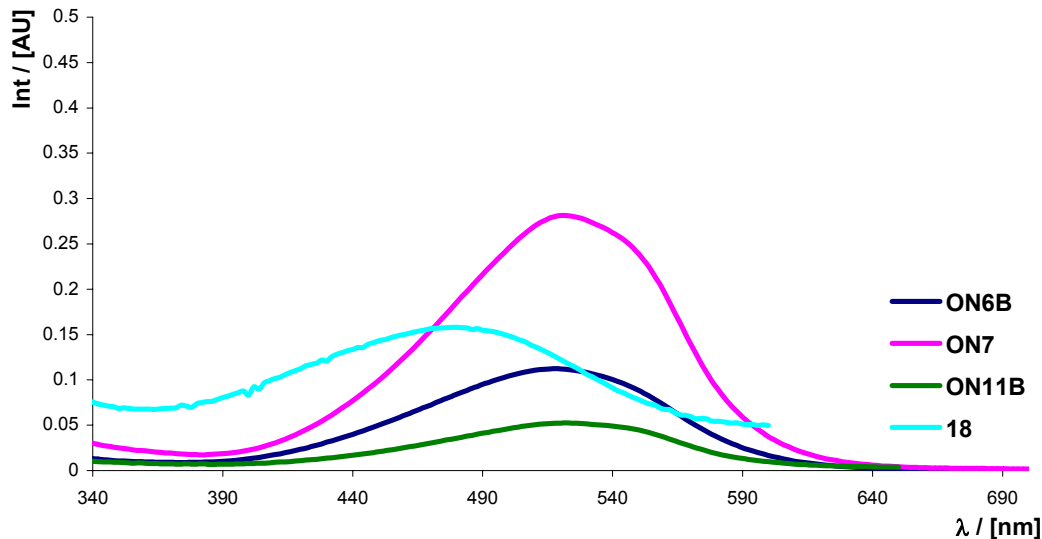


Abbildung 17: UV-Vis-Spektren von 18, ON7, ON6B und ON11B in H₂O.

Beim Einbau von Methylrot in ein Oligonukleotid beobachteten Asanuma *et al.* ebenfalls eine bathochrome Verschiebung.³⁸ Auch für intercalierende (~ 10 nm)³⁹ und in Oligonukleotide eingebaute (5-8 nm)⁴⁰ Pyrene wurden Rotverschiebungen gemessen. Es war also anzunehmen, dass zwischen dem Farbstoff Dispers Rot 1 und den Nucleobasen π - π -Wechselwirkung stattfindet. Messungen von Doppelsträngen zeigten, dass

sich das Maximum nicht weiter verschob. Es blieb bei 520 nm. Die bestehende π - π -Wechselwirkung ist also in einzelsträngiger und in doppelsträngiger DNS vergleichbar.

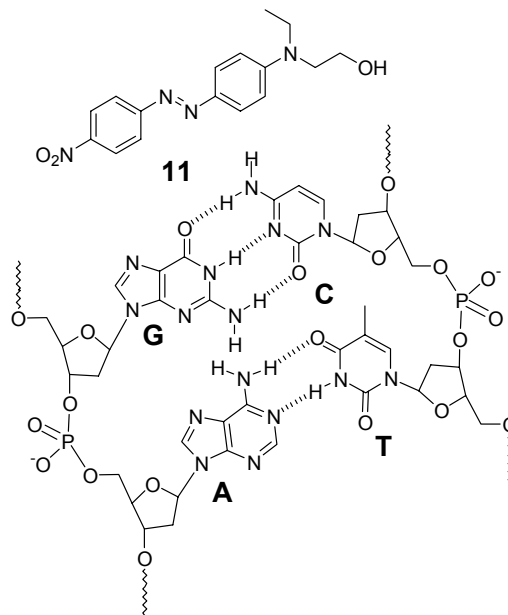


Abbildung 18: Strukturvergleich: Dispers Rot 1 mit Watson-Crick Basenpaaren A–T, C–G.

Vergleicht man die Struktur von **11** mit denjenigen der Basenpaare, kann man annehmen, dass der Farbstoff sich als Deckel auf den Doppelstrang legt (*Abbildung 18*). Die Tatsache, dass die bathochrome Verschiebung im Einzel- und im Doppelstrang gleich gross war, deutete daraufhin, dass die π - π -Wechselwirkung mit nur einer Base für die Verschiebung verantwortlich war.

Mass man vom Einzelstrang **ON12** UV/Vis-Spektren bei zwei unterschiedlichen Temperaturen zeigte sich, dass sich das Maximum von 518 nm bei 20 °C nach 504 nm bei 90 °C verschob, also wieder zurück in Richtung Absorptionsmaximum des freien Chromophors (*Abbildung 19*). Die Messung der Absorption von farbstoffmodifizierten Oligonukleotiden bei 520 nm in Abhängigkeit von der Temperatur zeigte, dass schon geringe Temperaturänderungen eine Abnahme der Absorption bewirkten. Es schien also tatsächlich eine temperaturabhängige Wechselwirkung zwischen dem Einzelstrang und dem Farbstoff zu bestehen.

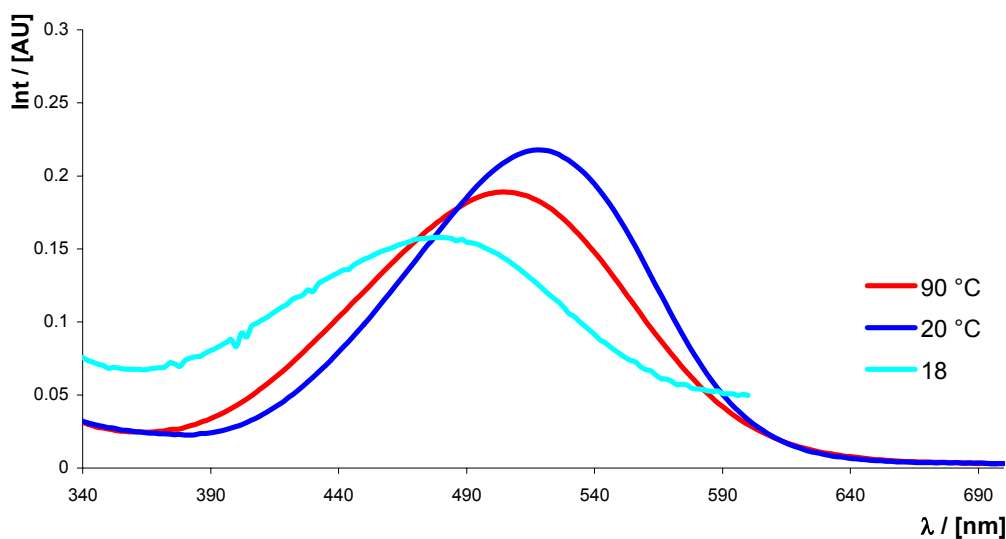


Abbildung 19: UV/Vis-Spektren von 18 in Wasser und von ON12 in Phosphatpuffer bei 20 °C und 90 °C.

Vergleich man die Messungen der Stränge **ON12** und **ON7** in *Abbildung 20* so sah man, dass für die kürzere Sequenz **ON12** (10mer) die Abnahme der Absorption direkt bei Messbeginn, also bei 15 °C einsetzte. Beim längeren Oligonukleotid **ON7** (21mer) trat die Abnahme erst ab ca. 32 °C auf. Die Steigungen der Absorptionskurven bei höherer Temperatur waren in etwa gleich gross.

Betrachtete man die analogen Messungen für Doppelstränge in *Abbildung 21*, so erkannte man um die bei 260 nm bestimmten Schmelzpunkte von 66.4 °C für **ON7/ON13** und 35.8 °C für **ON12/ON13** jeweils ein Plateau (*Kap. 4.3*). Vor und nach diesem Plateau unterschieden sich die Steigungen. Vor dem Schmelzpunkt war die Abnahme pro Temperatureinheit geringer als danach. Es benötigte für dieselbe Absorptionsänderung im Doppelstrang mehr Energie als im Einzelstrang.

Tabelle 4: Übersicht über die in diesem Kapitel verwendeten Oligonukleotide.

| ON | Sequenz |
|--------------|---|
| ON6B | DR1-pCGT AGC TAG ATT CGA ATC GTAp-O(C ₂ H ₄ O) ₃ -PO ₂ -O-(CH ₂) ₃ -SSPy |
| ON7 | DR1-pCGT AGC TAG ATT CGA ATC GTA |
| ON11B | DR1-pCGT AGC TAG ATNO ₂ T CGA ATC GTAp-(CH ₂) ₃ -SSPy |
| ON12 | DR1-pCGT AGC TAG Ap |
| ON13 | TAC GAT TCG AAT CTA GCT ACG |

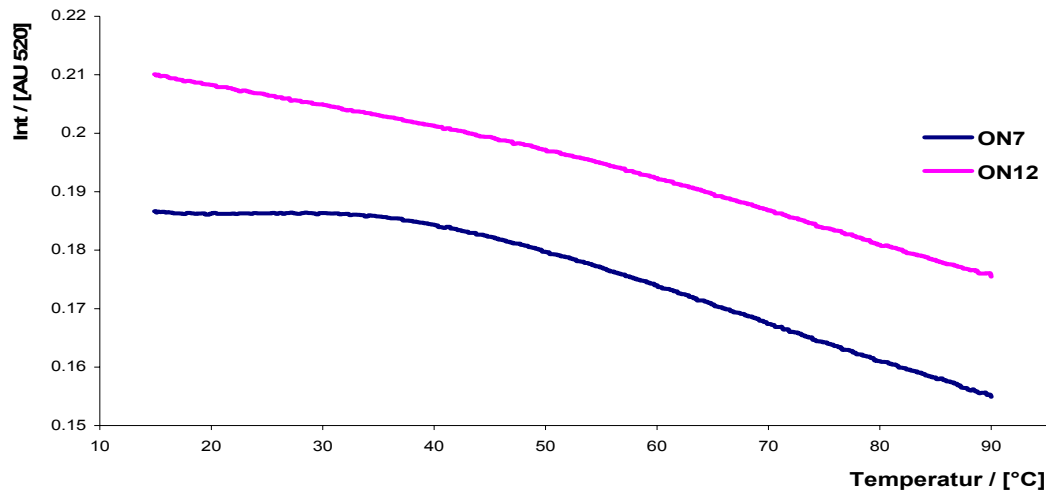


Abbildung 20: Temperaturabhängigkeit der Absorption der Oligonukleotide ON7 (21mer) und ON12 (10mer) bei 520 nm.

Die Steigungen der Doppelstrangsysteme verhielten sich so, dass sie sich vor den Schmelzpunkten unterschieden und danach praktisch gleich waren. Dies legte den Schluss nahe, dass die Wechselwirkung, die der Farbstoff mit der DNS einging, sowohl im Doppelstrang als auch im Einzelstrang von der Länge des Stranges abhing. Weiter liess sich sagen, dass die Wechselwirkung im Doppelstrang stärker war als im Einzelstrang, da für eine gleich grosse Absorptionsänderung mehr thermische Energie notwendig war.

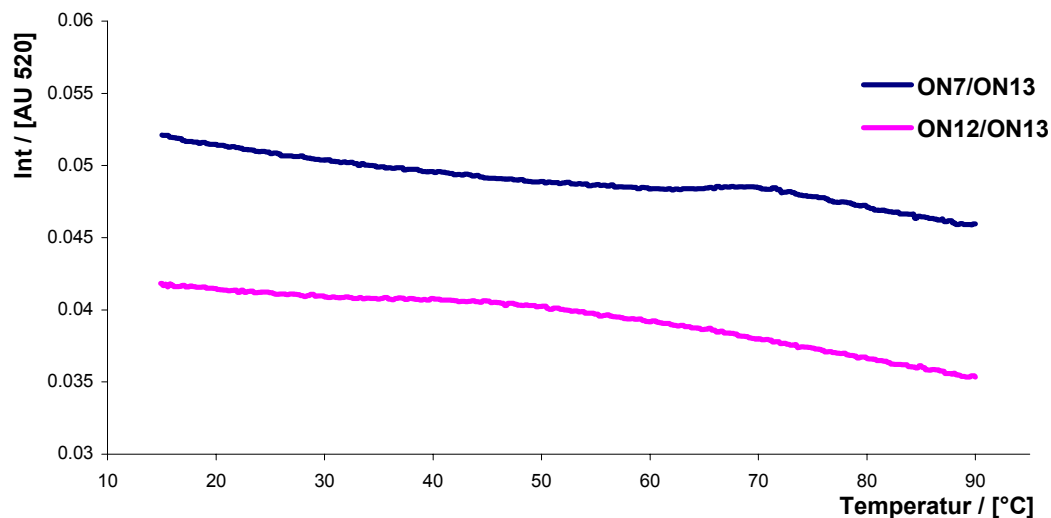
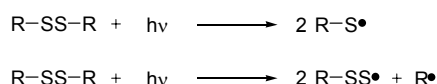


Abbildung 21: Temperaturabhängigkeit der Absorption der Doppelstrangsysteme ON7/ON13 und ON12/ON13 bei 520 nm.

4.5 Stabilität des Systems unter Photolysebedingungen

4.5.1 Stabilität der Disulfidbrücke

Da Disulfide photochemisch nicht inert sind,⁴¹ musste die Stabilität der Disulfidbrücke unter den verwendeten Photolysebedingungen überprüft werden. *Schema 7* zeigt mögliche homolytische Spaltungen von Disulfiden.



Schema 7: Reaktionen von Disulfiden unter Bestrahlung.

Zu diesem Zweck wurden die Systeme **SP6** und **SP2** (Darstellung siehe *Kap. 5.2*) nach Standardbedingungen bestrahlt. Die Systeme waren Einzelstrangsysteme, die entweder über das 5'-oder das 3'-Ende auf Sepharose immobilisiert wurden (*Abbildung 22*). Die Sequenzen der Oligonukleotide entsprachen den Sequenzen, die für die späteren Sequenzanalysen verwendet wurden. Im Anschluss an die Bestrahlungen wurden die Photolyselösungen mittels RP18-HPLC analysiert. In den Lösungen konnten keine Photolyseprodukte nachgewiesen werden. Es zeigte sich also, dass die Disulfidbrücke gegenüber den verwendeten Photolysebedingungen stabil ist.

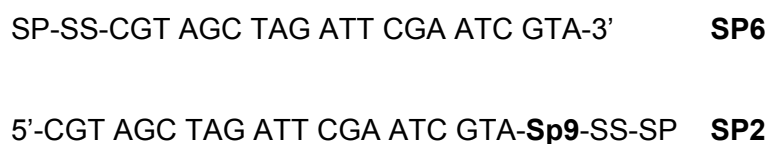
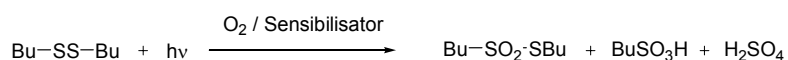


Abbildung 22: Festphasensysteme zur Überprüfung der Disulfidstabilität unter den Photolysebedingungen (≥ 360 nm, 0 °C, 10-15 min., 500 W).

4.5.2 Stabilität mit dem Farbstoff

Obwohl die Disulfidbindung unter den Photolysebedingungen stabil war, könnte die Anwesenheit des Farbstoffes dies ändern. Es ist bekannt, dass Disulfide bei längerwelligem Licht unter Verwendung von Sensibilisatoren in Anwesenheit von Sauerstoff gespalten werden können. *Schema 8* zeigt eine mögliche Photooxidation in Anwesenheit eines Sensibilisators.⁴² Da als Sensibilisatoren oft aromatische Systeme eingesetzt

werden und der Farbstoff mit den Basen der Oligonukleotide in Wechselwirkung steht, stellte sich die Frage nach der Stabilität erneut.



Schema 8: Photooxidation von Disulfiden in Anwesenheit eines Sensibilisators.

Deshalb wurde die Stabilität der Disulfidbrücke in Anwesenheit des Farbstoffes im System **SP3** (Darstellung siehe *Kap. 5.2*) zusätzlich überprüft. Dabei handelte es sich um ein Einzelstrangsystem, welches am 5'-Ende mit dem Farbstoff modifiziert und über das 3'-Ende mit der Festphase verknüpft war (*Abbildung 23*). Die Bestrahlung nach den Standardbedingungen zeigte auch hier, dass das System stabil ist.



Abbildung 23: Festphasensystem zur Überprüfung der Disulfidstabilität in Anwesenheit des Farbstoffes DR1 unter den Photolysebedingungen (≥ 360 nm, 0 °C, 15 min., 500 W).

4.6 Zusammenfassung

Die Voruntersuchungen zeigten, dass sich das System aus den zuvor ausgewählten Bausteinen aufbauen lassen sollte, da es möglich war in ein Oligonukleotid die erforderlichen drei bis vier Bausteine einzufügen und dieses anschliessend zu reinigen. Die UV/Vis-Messungen zeigten zwar, dass eine π - π -Wechselwirkung der Oligonukleotide mit dem am 5'-Ende angehängten Farbstoff **DR1** besteht, doch zeigten weder die Schmelzpunktmessungen noch die Bestrahlung des Systems einen negativen Einfluss auf die Helixstabilität oder die Stabilität der Disulfidbrücke. Das System zeigte sich unter den zu verwendenden Bedingungen als stabil. Die bevorzugte Sequenzlänge beträgt 21 Basenpaare und die Bestrahlungstemperatur soll 15 °C nicht übersteigen. Die Bestrahlungen werden bei 10 °C durchgeführt, da die an fester Phase gemessenen Schmelzpunkte jeweils um einige Grad Celsius tiefer lagen, als diejenigen von vergleichbaren Systemen in Lösung.

5 Der Aufbau

5.1 Strategie A: Mehrstufiger Aufbau

Die einfachste und direkteste Synthesestrategie ist es, eine geeignete vormodifizierte Festphase am DNS-Synthesizer einzusetzen, um darauf direkt die Oligonukleotidsequenz aufzubauen. Die Methode hat den Vorteil, dass nach vollendeter Synthese der DNS-Strang nicht wie beim Standardsyntheseprotokoll bei der Behandlung mit Ammoniak von der Festphase abgespalten wird, sondern auf ihr verbleibt. Dazu ist eine modifizierte Festphase nötig, die der Ammoniakbehandlung standhält.

Zwei feste Phasen wurden verwendet: CPG und Tentagel. Die basenstabilen Modifikationen, ein Amid auf Tentagel (**SP7**) und ein Imid auf CPG (**SP8**), sind in *Abbildung 24* gezeigt.⁵⁵

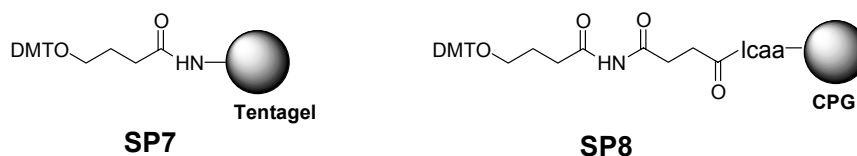


Abbildung 24: Vormodifizierte Festphasen zum mehrstufigen Aufbau.

5.1.1 Synthesen der Oligonukleotide auf CPG und Tentagel

Die Synthesen wurden alle nach dem Standardprotokoll zur DNS-Synthese mit einem DNS-Synthesizer direkt auf den modifizierten Festphasen **SP7/8** durchgeführt (siehe *Kap. 18.1*). Nach vollendeter Synthese wurden die Oberflächenbeladungen und somit auch die Syntheseausbeuten durch Abspalten der Tritylschutzgruppe am 5'-Ende des Oligonukleotids **SP9/10** bestimmt (*Kap. 14.2.2*).



SP9 = Tentagel (203.44 nmol/mg)
SP10 = CPG (76.27 nmol/mg)

Schema 9: Oligonukleotidsynthese auf modifizierter Festphase **SP7/8**.

Die Syntheseausbeuten zeigten sehr deutlich, dass diese Strategie nicht die Methode der Wahl sein kann. Die Ausbeuten bewegten sich mit einem bis maximal neun Prozent in Bereichen, die für die automatisierte DNS-Synthese zu niedrig waren. Selbst bei einer geringeren Kupplungseffizienz von 95 % sollte für die Synthese eines 21-mers eine Ausbeute von 34 % resultieren. Abgesehen von den dürftigen Ausbeuten zeigten auch die Bestrahlungen zusätzliche negative Aspekte (vgl. Kap. 7.2.1).

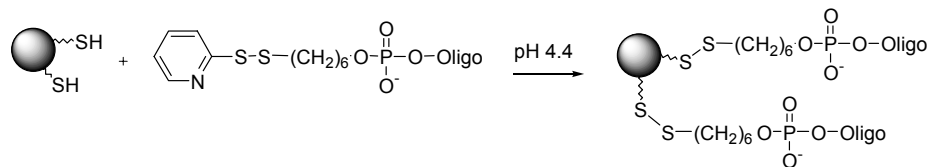
Tabelle 5: Ausbeuten und Oberflächenbeladungen für Oligonukleotidsynthesen auf fester Phase. a) in Klammern angegeben die Syntheseausbeuten in Prozent.

| | SP | Sequenz | Beladung ^{a)} [nmol/mg] |
|---|------|--|-------------------------------------|
| 1 | SP11 | CCC CCTNO ₂ CCC CC-O(CH ₂) ₃ CONH-CPG | 0.93 (1.2) |
| 2 | SP12 | CGT AGC TAG ATNO ₂ T CGA ATC GTA -O(CH ₂) ₃ CONH-CPG | 0.77 (1.0) |
| 3 | SP13 | TTT TTT TTT TTNO ₂ T TTT TTT TTT-O(CH ₂) ₃ CONH-CPG | 1.43 (1.9) |
| 4 | SP14 | CCC CCTNO ₂ CCC CC-O(CH ₂) ₃ CONH-Tenta | 18.71 (9.2) |
| 5 | SP15 | CGT AGC TAG ATNO ₂ T CGA ATC GTA -O(CH ₂) ₃ CONH-Tenta | 13.93 (6.8) |
| 6 | ST16 | TTT TTT TTT TTNO ₂ T TTT TTT TTT-O(CH ₂) ₃ CONH-Tenta | 8.09 (4.0) |

5.2 Strategie B: Einstufiger Aufbau

Um einen einstufigen Aufbau des Systems durchzuführen, muss ein DNS-Strang an eine Festphase gebunden werden. Dazu wird eine Modifikation in den Strang eingeführt, die mit einer Funktionalität der Festphase selektiv reagiert und so das Oligonukleotid mit der Festphase verknüpft. Es sind verschiedene Möglichkeiten bekannt, kovalente Anknüpfungen⁴³ ebenso wie solche, die auf einer sehr starken Wechselwirkung⁴⁴ beruhen. Eine Zusammenfassung über verschiedene Methoden gibt der Übersichtsartikel von Henke und Krull.⁴⁵

Die von Luther *et al.* beschriebene Methode verbindet Oligonukleotide (hier: RNS) über eine Disulfidbrücke mit einer Festphase (*Schema 10*).⁴⁶ Die Methode beruht auf dem Mechanismus des Disulfidaustauschs, der eine milde Möglichkeit bietet, vor allem unsymmetrische Disulfide darzustellen. In der Biologie wird diese Methode angewandt, um Protein-Protein Konjugate zu bilden.⁴⁷ Auch, um aktive Spezies aus einer Mischung herauszufischen, wird die Methode des Disulfidaustauschs verwendet, wobei die herausgefischten Moleküle kovalent an eine feste Phase gebunden und mit Mercaptoethanol wieder freigesetzt werden.⁴⁸



Schema 10: Immobilisierung von RNS via 5'-Ende nach Luther *et al.*

5.2.1 Immobilisierung über das 5'-Ende

Um DNS am 5'-Ende mit der notwendigen Modifikation zu versehen, wurde in der DNS-Synthese das Phosphoramidit **14** eingesetzt (Abbildung 25).

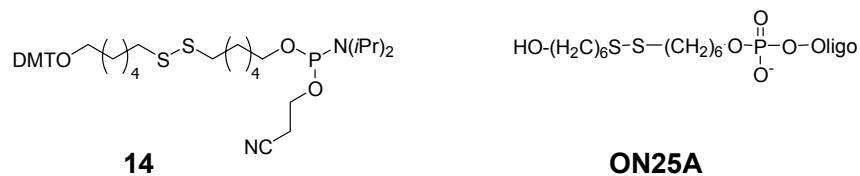
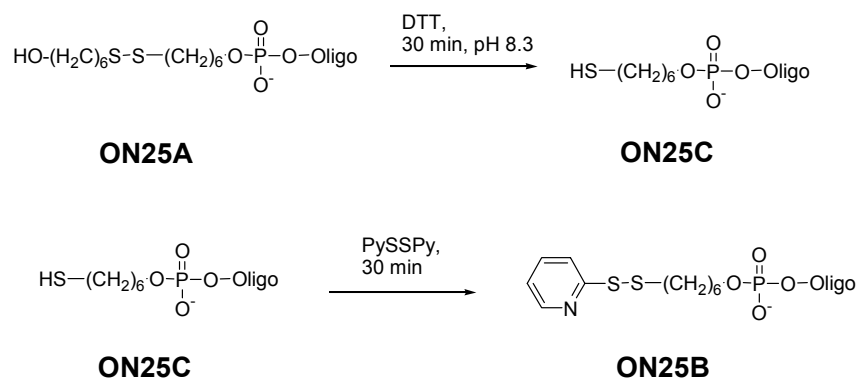


Abbildung 25: Phosphoramidit der Alkyldisulfidmodifikation (**14**), 5'-alkyldisulfidmodifiziertes Oligonucleotid (**ON25A**).

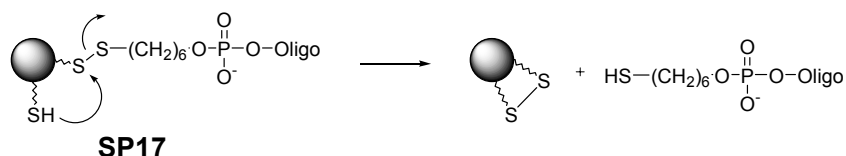
Nach einem ersten Reinigungsschritt wurde das 5'-Ende von **ON25A** zum Thiol **ON25C** reduziert und anschliessend mit 2,2'-Dithiodipyridin umgesetzt. Das pyridyldisulfidmodifizierte Oligonucleotid **ON25B** konnte nun mit einer thiolmodifizierten Festphase zur Reaktion gebracht werden.



Schema 11: Reduktion von **ON25A** zum Thiol **ON25C** und anschliessende Umsetzung zu **ON25B**.

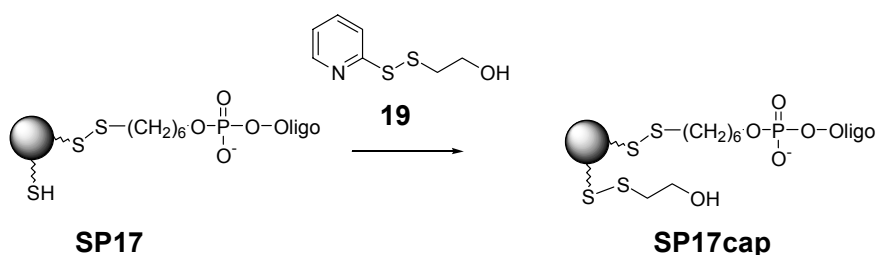
Da im Gegensatz zu anderen Festphasenreaktionen das Oligonucleotid nicht in einem Überschuss eingesetzt wurde, mussten die überzähligen Thiole auf der festen Phase deaktiviert werden. Deaktiviert man die freien Thiole nicht, sind diese in der Lage

ihrerseits einen Disulfidaustausch mit den bereits gebildeten Disulfidbrücken einzugehen, was zu einer Freisetzung von Oligothiolen führt. Man erhält dann eine oxidierte, deaktivierte Oberfläche und Oligonukleotide in Lösung (*Schema 12*). Dies bedeutet, dass die Reaktionszeit des Immobilisierungsschrittes genau definiert sein musste. Die von Luther optimierte Reaktionszeit betrug eine Stunde.⁵³



Schema 12: Freisetzung der immobilisierten Oligonukleotide durch freie Thiole.

Die Deaktivierung wird Capping genannt und ist in *Schema 13* gezeigt. Hierzu wurde das pyridylmodifizierte Disulfid **19** eingesetzt.



Schema 13: Deaktivierung freier Thiole auf der Festphase.

Bei den ersten Immobilisierungen wurden Oligonukleotide analog der von Luther beschriebenen Prozedur über ihr 5'-Ende an die Festphase gebunden. Die Immobilisierungsreaktionen konnten mittels RP-HPLC verfolgt werden. Dazu wurde eine Mischung zweier Oligonukleotide eingesetzt. Jedoch war nur einer dieser Stränge **ON3B** so modifiziert, dass er sich auf der Festphase anbringen liess, der andere diente als interner Standard (**ON20**). *Abbildung 26* zeigt typische Chromatogramme einer Immobilisierung über das 5'-Ende. Das Verhältnis der eingesetzten Stränge betrug vor der Reaktion in etwa eins zu eins. Das Chromatogramm nach der Reaktion zeigte jeweils nur noch den internen Standard. Die Immobilisierungsreaktion verlief demnach quantitativ.

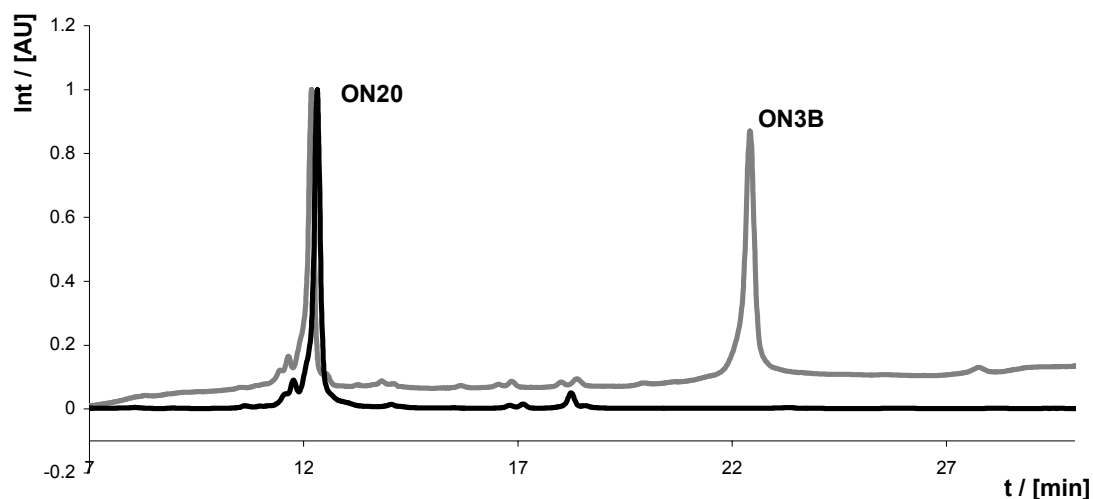


Abbildung 26: RP18-HPLC-Chromatogramme: Vor der Immobilisierungsreaktion (grau) und danach (schwarz).

Obwohl die Immobilisierungen quantitativ verliefen (*Tabelle 6*), war die Anknüpfung über das 5'-Ende nicht die ideale Methode für den Aufbau des Analysensystems. Zwei entscheidende Faktoren spielten hier eine Rolle. Einerseits waren es die Photolyseprodukte, die einen wichtigen Faktor bildeten, da in 3'-Richtung unterschiedliche Photolyseprodukte entstehen (**5**, **10**, **6**), wohingegen in 5'-Richtung einzig das 3'-Phosphat **4** gebildet wird (*Schema 6*). Die Detektion nur eines Photolyseprodukts bringt eine Vereinfachung der Analytik mit sich. Andererseits bietet das 5'-Ende die grössere Freiheit zur Einführung einer Markierung.

Tabelle 6: Übersicht über die via 5'-Ende immobilisierten Systeme.

| | SP | Oligonukleotid | Ausbeute / [%] |
|---|------|----------------|----------------|
| 1 | SP18 | ON3B | 98 |
| 2 | SP19 | ON4B | 100 |

5.2.2 Immobilisierung über das 3'-Ende

Die Einführung der Disulfidmodifikation am 3'-Ende eines Nukleotids konnte durch vorgefertigte und kommerziell erhältliche Festphasen erreicht werden (vgl. *Kap. 4.2*). Diese Festphasen wurden direkt am DNS-Synthesizer eingesetzt. Nach der Abspaltung von der Festphase wurde das erhaltene 3'-Alkyldisulfidoligonukleotid ebenfalls reduziert und mit 2,2'-Dithiodipyridin umgesetzt (vgl. *Kap. 5.2.1*).

Vergleich man die Länge der Kohlenstoffketten der beiden Thiomodifikationen stellte man fest, dass die 5'-Modifikation **14** eine C₆-Kette trägt, die 3'-Modifikation **16** jedoch nur aus einer C₃-Kette besteht. Dies könnte dazu führen, dass entweder die Immobilisierung selbst oder aber nachfolgende Experimente beeinträchtigt würden, da die Ankergruppe und der DNS-Strang nicht so frei zugänglich sind, wie im Falle der 5'-Immobilisierung.

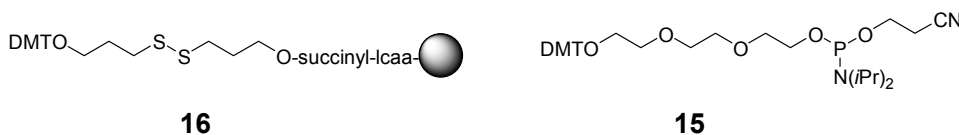


Abbildung 27: 3'-Thiomodifikation auf CPG 16, Polyethylenglycol-Spacer-Phosphoramidit 15.

Um dieses Problem zu umgehen, wurde zusätzlich zur Thiomodifikation der Abstandhalter **15** als Phosphoramidit während der DNS-Synthese in das Oligonukleotid eingeführt.

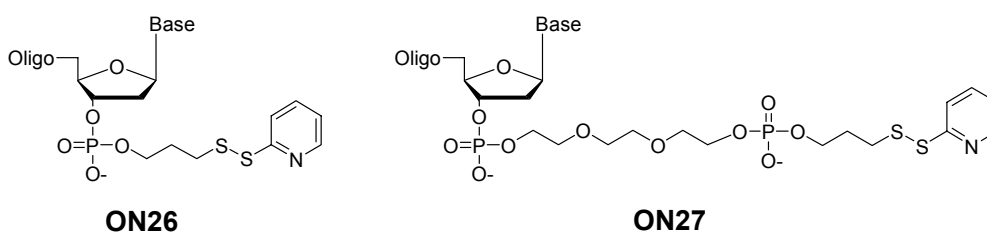


Abbildung 28: 3'-Modifikationen an Oligonukleotiden.

Immobilisierungen über das 3'-Ende wurden mit unterschiedlichen, mehrfach modifizierten Oligonukleotiden durchgeführt alle verliefen quantitativ (*Tabelle 7*).

Abbildung 29 zeigt HPLC-Chromatogramme der Immobilisierungsreaktion des Oligonukleotids **ON8B**. Wie auch schon in *Kapitel 5.2.1* wurde das Oligonukleotid **ON20** als interner Standard verwendet.

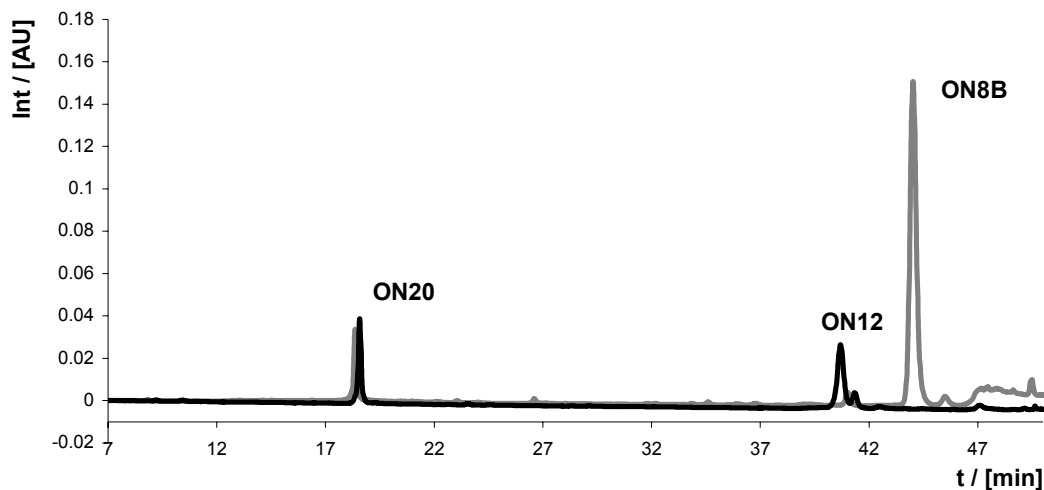


Abbildung 29: RP18-HPLC-Chromatogramme: Vor der Immobilisierungsreaktion (grau) und danach (schwarz).

Das in *Abbildung 29* gezeigte Chromatogramm nach der Immobilisierungsreaktion zeigte zwar, dass der zu immobilisierende Strang **ON8B** aus der Lösung verschwunden war, doch tauchte zusätzlich zum internen Standard (**ON20**) ein Strang bei einer Retentionszeit von 40.7 Minuten auf. Es handelte sich hier um das Photolyseprodukt **ON12**, welches unter Einwirkung von Tageslicht gebildet wurde. Die Menge an **ON12** variierte und musste beim Bestimmen der Oberflächenbeladung mitberücksichtigt werden.

Tabelle 7: Übersicht über die via 3'-Ende immobilisierten Systeme. a) die Stränge wurden in einem Verhältnis ~ 1:1 eingesetzt. b) Für die Oberflächenladung muss die Menge an **ON12** abgezogen werden, c) **ON10B-15** entspricht **ON10** jedoch ohne Polyethylenglycol-Abstandhalter.

| | SP | Oligonukleotid | Ausbeute / [%] |
|---|------|----------------------------------|-------------------|
| 1 | SP2 | ON5B | 100 |
| 2 | SP3 | ON6B | 100 |
| 3 | SP20 | ON8B/ON11B ^{a)} | 100 ^{b)} |
| 4 | SP21 | ON10B/ON10B-15 ^{a), c)} | 100 ^{b)} |
| 5 | SP4 | ON1B | 100 |
| 6 | SP22 | ON11B | 100 ^{b)} |
| 7 | SP23 | ON8B | 100 ^{b)} |

5.3 Zusammenfassung

Der mehrstufige Aufbau war zur Synthese des Systems zwar näherliegend, brachte aber die geringen Ausbeuten und das Fehlen einer Reinigungsmöglichkeit als zwei wesentliche Nachteile mit sich. Deshalb war der einstufige Aufbau die Methode der Wahl. Über die Disulfid-Austausch-Reaktion liessen sich Oligonukleotide sowohl über das 3'-Ende als auch über das 5'-Ende quantitativ auf die Festphase (Sephrose) immobilisieren. Dabei war die Methode mit allen zusätzlich in die Oligonukleotide eingeführten Modifikationen kompatibel. Auch der kürzere Abstandhalter, den die 3'-Thiomodifikation trägt, hatte auf die Immobilisierungseffizienz unter den verwendeten Bedingungen keinen negativen Einfluss.

6 Hybridisierungen

6.1 Einleitung

Die effiziente Hybridisierung zweier komplementärer DNS-Stränge ist eines der zentralen Elemente unserer Analysemethode. Die Hybridisierung muss quantitativ und selektiv sein. Der Mechanismus der Doppelstrangbildung wird als Kombination zweier Schritte beschrieben: der Kernbildung (*nucleation*) bestehend aus drei Basenpaaren und der weiterführenden Ausbildung des Doppelstranges (*zipping*).³⁴

Für die Doppelstrangbildung an fester Phase ist die Zugänglichkeit des freien Stranges zum immobilisierten Komplementärstrang für die Ausbildung eines Kerns entscheidend. Untersuchungen von Peterson *et al.* zeigen, dass die Oberflächendichte einen wesentlichen Einfluss auf diese Effizienz hat.⁴⁹ Die Effizienz der Doppelstrangbildung kann von 50 % bei einer Beladung von 3.0×10^{12} Strängen pro cm^2 auf 100 % erhöht werden, wenn man die Beladungsdichte halbiert. Doch nicht nur die Effizienz, sondern auch die Geschwindigkeit der Doppelstrangbildung wird durch die Oberflächendichte beeinflusst. Die Sättigung wird bei halber Beladung innerhalb einer Stunde erreicht, wohingegen bei der ursprünglichen Beladung 14 Stunden benötigt werden.

Die Zugänglichkeit lässt sich nicht nur durch Variation der Oberflächenbeladung beeinflussen, sondern auch durch das Einfügen von Abstandhaltern zwischen Festphase und 3'- bzw. 5'-Ende. Findet ein solcher Hybridisierungsvorgang in einem ungerührten System statt, so spielt die Diffusionsgeschwindigkeit der Einzelstränge eine weitere grosse Rolle. Die Gruppe um Haselton erreicht durch Mischen eine Steigerung der Hybridisierungseffizienz auf einem Microarray um das Vierfache.⁵⁰

6.2 Einfluss der Hybridisierungsbedingungen

Um die Hybridisierungseffizienzen zu bestimmen, wurden die Gegenstränge jeweils zusammen mit einem internen Standard zur festen Phase gegeben. Die Lösung wurde nach der Hybridisierung mittels RP-HPLC-Analysiert (*Abbildung 30*).

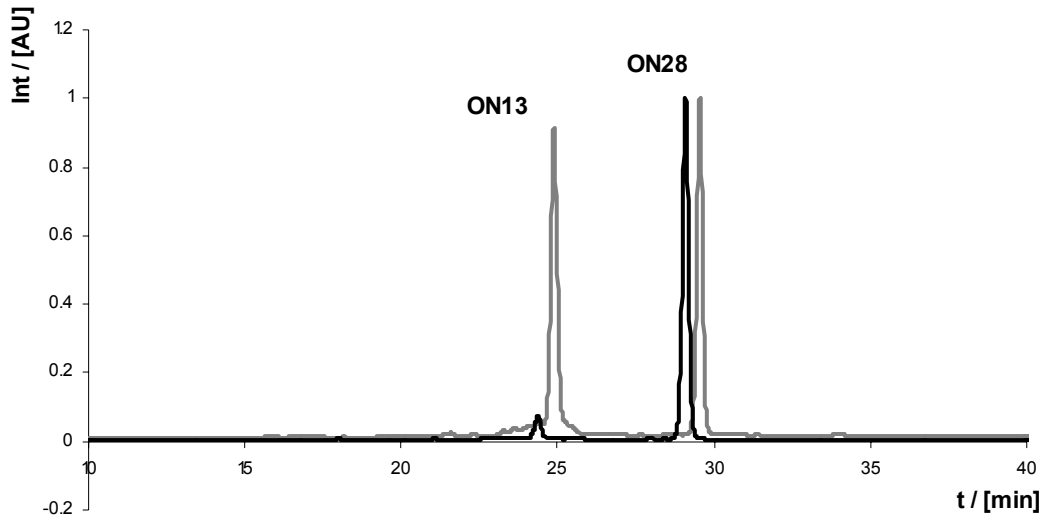


Abbildung 30: Chromatogramme der Hybridisierung von ON13 an SP20C. Bedingungen: 85 °C für 5 min., Abkühlen auf RT während 1.5 h. Blaue Linie: vor der Hybridisierung; Purpurne Linie: nach der Hybridisierung. Die Chromatogramme sind normiert (bzgl. Standard ON28).

Aus dem Verhältnis des in Lösung verbleibenden Gegenstranges und des internen Standards wurde die Ausbeute bestimmt. *Abbildung 31* zeigt die in diesem und den folgenden Abschnitten verwendeten Festphasensysteme. (siehe auch: *Faltblatt* am Ende der Arbeit.)

| | |
|---|-------------|
| 5'-DR1-CGT AGC TAG ATT CGA ATC GTA- Sp9 -SS-SP | SP3 |
| 5'-DR1-CGT AGC TAG ATNO ₂ T CGA ATC GTA-(Sp9) _{0,1} -SS-SP | SP20 |
| 5'-DR1-CGT AGC TAG ATNO ₂ T CGA ATC GTA- SS-SP | SP22 |
| 5'-DR1-CGT AGC TAG ATNO ₂ T CGA ATC GTA- Sp9 -SS-SP | SP23 |

Abbildung 31: Für Hybridisierungsexperimente verwendete Festphasensysteme.

Die Durchführung der Hybridisierungsexperimente unter verschiedenen Bedingungen, zeigte folgende Tendenzen: Die Hybridisierung an fester Phase lieferte unter Schütteln reproduzierbare Ergebnisse. Das Abkühlen durfte nicht zu schnell erfolgen, da sonst zu wenig Zeit für eine saubere Erkennung blieb, oder die Gegenstränge durch das schnelle Abkühlen auf der Festphase auf Grund polarer Wechselwirkungen gebunden wurden, woraus sich entweder geringe (48 %) oder übermässige (181 %) Hybridisierungsausbeuten ergaben (*Tabelle 8*). Eine Zeitspanne von eineinhalb Stunden schien als Abkühlungszeit für die Hybridisierung ideal zu sein. Unter diesen Bedingungen war es möglich, Gegenstränge quantitativ an die auf der Festphase fixierten Oligonukleotide zu hybridisieren.

Tabelle 8: Hybridisierungsexperimente zum Einfluss der Hybridisierungsbedingungen. Bedingungen: 3 min. bei 85 °C, unterschiedliche Abkühlzeiten. a) Gegenstrang: ON13; b) Die Ausbeuten beziehen sich auf die Beladung und sind Mittelwerte (siehe Kap. 18.5).

| | SP ^{a)} | Abkühlzeit | Beladung / [nmol / mg] | Ausbeute ^{b)} / [%] |
|---|------------------|------------|---------------------------|------------------------------|
| 1 | SP3 | ≥ 1.5 h | 0.78 | 116 |
| 2 | SP3 | 0.5 h | 0.78 | 48 |
| 3 | SP3 | ≥ 1.5 h | 0.29 | 96 |
| 4 | SP3 | 0.5 h | 0.29 | 71 |
| 5 | SP20 | ≥ 1.5 h | 0.42 | 96 |
| 6 | SP20 | ≤ 1 h | 0.42 | 181 |

6.3 Einfluss der Oberflächenbeladung

Die Oberflächenbeladung hat bei der Hybridisierung an fester Phase einen Einfluss (*Kap. 6.1*). Um zu überprüfen, ob in der hier verwendeten Grössenordnung ebenfalls ein Einfluss besteht, wurden zwei identische Systeme mit unterschiedlichen Beladungsdichten verwendet. Ein Vergleich mit den für DNS-Chips angegebenen Beladungsdichten ist nicht möglich. Die Angaben werden in Proben pro Fläche angegeben,⁴⁹ wohingegen hier die Angaben in Menge Oligonukleotid pro Masse Festphase erfolgen.

Tabelle 9: Hybridisierungsexperimente zum Einfluss der Beladungsdichte. Bedingungen: 3 min. bei 85 °C, Abkühlung während mind. 1.5 h; a) Gegenstrang: ON13; b) Die Ausbeuten beziehen sich auf die Beladung und sind Mittelwerte (siehe Kap. 18.5).

| | SP^{a)} | Beladung / [nmol / mg] | Ausbeute^{b)} / [%] |
|---|------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| 1 | SP3 | 0.78 | 118 |
| 2 | SP3 | 0.29 | 110 |

Die Versuche zeigten, dass im Bereich von 0.29 bis 0.78 nmol pro mg Festphase kein Einfluss der Beladungsdichte zu erkennen war (*Tabelle 9*). Bei vergleichbaren Bedingungen resultierten für die unterschiedlichen Beladungen gleiche Ausbeuten.

6.4 Einfluss des Abstandshalters

Eine weitere Möglichkeit, die Zugänglichkeit des immobilisierten Oligonukleotids für die Hybridisierung zu erhöhen, ist das Einfügen eines Abstandshalters. Dieser Abstandhalter soll das Oligonukleotid von der Oberfläche separieren.

Verglich man die erhaltenen Ergebnisse von Systemen mit (**SP20C**) und ohne (**SP22**) Distanzhalter **15**, war nur ein kleiner Effekt auszumachen (*Tabelle 10*). Jedoch konnte man sagen, dass sich die Anwesenheit von **15** eher positiv auf die Hybridisierungseffizienz auswirkte.

Tabelle 10: Hybridisierungsexperimente zum Einfluss des Abstandshalters. Bedingungen: 3 min. bei 85 °C, Abkühlung während mind. 1.5 h; a) Gegenstrang: ON13; b) Die Ausbeuten beziehen sich auf die Beladung und sind Mittelwerte (siehe Kap. 18.5); c) Beladungsmittelwert aus drei unterschiedlichen Immobilisierungen.

| | SP^{a)} | Gegenstrang | Beladung / [nmol / mg] | Ausbeute^{b)} / [%] |
|---|------------------------|--------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| 1 | SP20 | ON13 | 0.42 | 96 |
| 2 | SP22 | ON13 | 0.32 | 71 |
| 3 | SP23 | ON13 | 0.36 ^{c)} | 146 |

6.5 Hybridisierungsexperimente von Gegensträngen mit Fehlstellen

Einige Analysemethoden basieren auf der Tatsache, dass fehlgepaarte Sequenzen unter gewissen Bedingungen nicht gleich effizient Doppelstränge ausbilden, wie passende Komplementärstränge. So beschreibt Peterson die Sättigung durch den Gegenstrang mit 100 % für einen passenden Strang und mit 70 % und 50 % für eine bzw. zwei Fehlstellen im Gegenstrang.⁴⁹

Die während dieser Arbeit durchgeführten Hybridisierungsexperimente zeigten kein solches Verhalten (*Tabelle 11*). Von allen drei Fällen konnte angenommen werden, dass die Hybridisierung unter den verwendeten Bedingungen quantitativ verlief.

Tabelle 11: Vergleich der Hybridisierungseffizienz von Strängen mit unterschiedlicher Anzahl Fehlstellen. Bedingungen: 3 min. bei 85 °C, Abkühlung während mind. 1.5 h; a) Mittelwerte (siehe Kap. 18.5); b) Fehlstellen sind an unterschiedlichen Positionen im Gegenstrang.

| | SP | Anzahl Fehlstellen im Gegenstrang | Ausbeute ^{a)} / [%] |
|---|----------------|-----------------------------------|------------------------------|
| 1 | SP22C, SP23A/C | keine | 121 |
| 2 | SP22C, SP23A/C | 1 Fehlstelle ^{b)} | 111 |
| 3 | SP22C, SP23A/C | 2 Fehlstellen ^{b)} | 108 |

6.6 Ist ein Fischen der richtigen Sequenz möglich?

Wie verschiedene Hybridisierungsexperimente zeigten, liessen sich auch Gegenstränge mit Fehlstellen mit sehr guten Ausbeuten an den immobilisierten Strang hybridisieren. Da die Methode darauf ausgerichtet ist, die Anwesenheit einer bestimmten bekannten Sequenz anzuzeigen, stellte sich die Frage nach der Selektivität der Methode. Kann das System zwischen einer *match*-Sequenz und einer *mismatch*-Sequenz unterscheiden?

Um die Fähigkeit des Systems dahingehend zu untersuchen, wurden Hybridisierungsproben verwendet, die aus einem Gemisch zweier Stränge bestanden und die an **SP20C** hybridisiert wurden. Aus analytischen Gründen wurde jeweils eine 21mer Sequenz an beiden Enden mit der Homooligonukleotidsequenz **T₅** (*overhang*) verlängert (**ON29-31**).

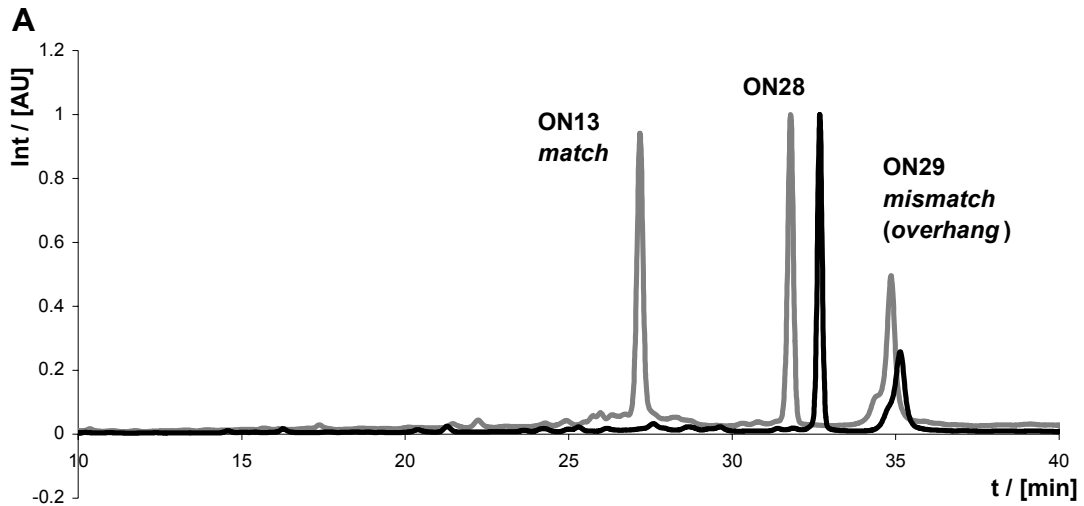


Abbildung 32: Chromatogramme der Hybridisierungsexperimente an SP20C mit dem Gegenstranggemisch A: ON13/ON29. Die grauen Linien zeigen die Verhältnisse vor der Hybridisierung und die schwarzen danach. Die Chromatogramme sind normiert (bzgl. Standard ON28).

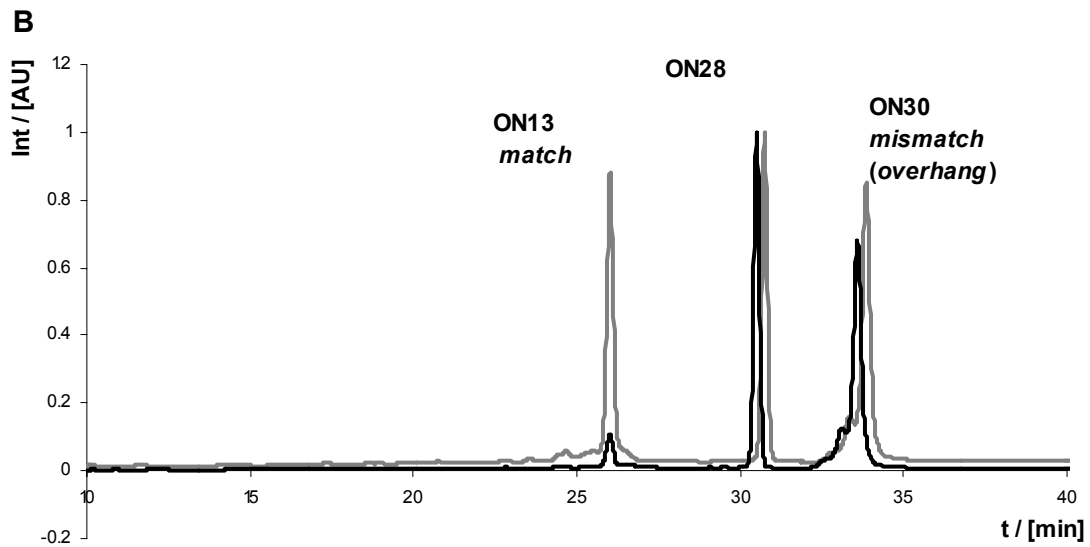


Abbildung 33: Chromatogramme der Hybridisierungsexperimente an SP20C mit dem Gegenstranggemisch B: ON13/ON30. Die grauen Linien zeigen die Verhältnisse vor der Hybridisierung und die schwarzen danach. Die Chromatogramme sind normiert (bzgl. Standard ON28).

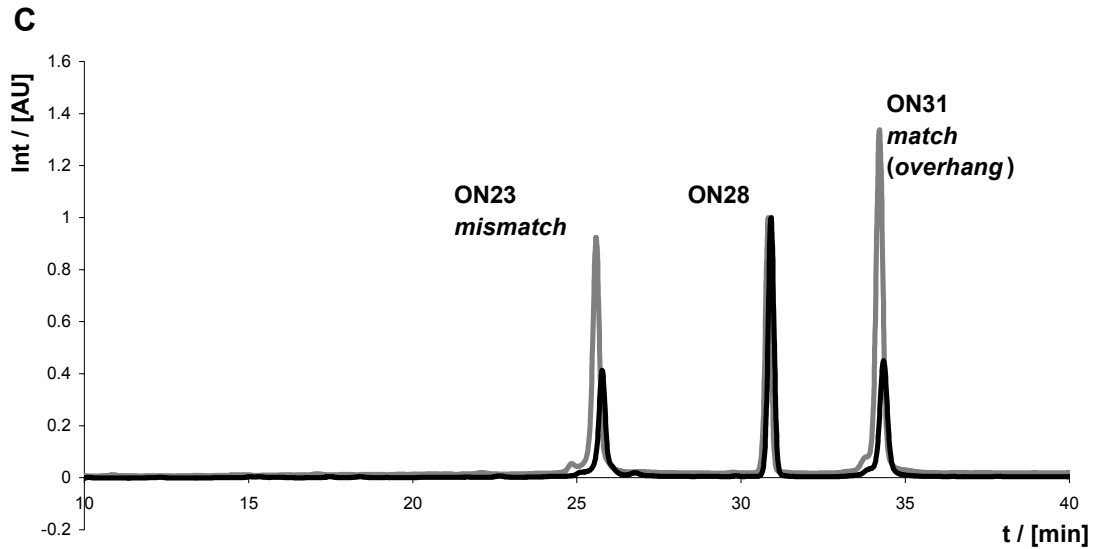


Abbildung 34: Chromatogramme der Hybridisierungsexperimente an SP20C mit dem Gegenstranggemisch C: ON23/ON31. Die grauen Linien zeigen die Verhältnisse vor der Hybridisierung und die schwarzen danach. Die Chromatogramme sind normiert (bzgl. Standard ON28).

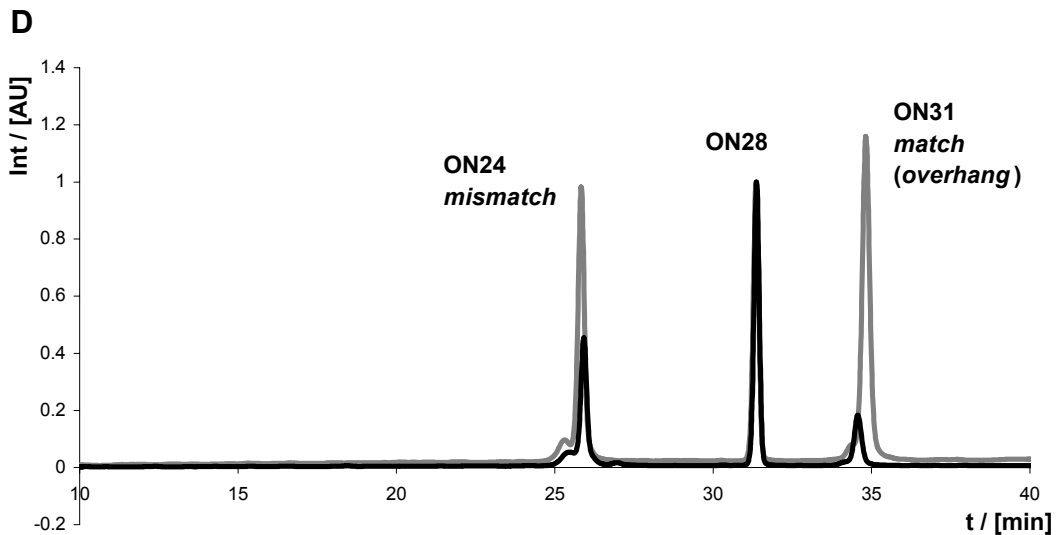


Abbildung 35: Chromatogramme der Hybridisierungsexperimente an SP20C mit dem Gegenstranggemisch D: ON24/ON31. Die grauen Linien zeigen die Verhältnisse vor der Hybridisierung und die schwarzen danach. Die Chromatogramme sind normiert (bzgl. Standard ON28).

In allen vier Experimenten wurde aus dem Gemisch ein grösserer Teil der passenden Sequenz an die Probe hybridisiert (*Tabelle 12*). Die grösste Selektivität zeigte dabei das System B (*Abbildung 33*), bei welchem der passende Gegenstrang (**ON13**) dieselbe Länge wie der Strang der Probe hatte und der Strang mit zwei Fehlstellen (**ON30**) die verlängerten Enden trug.

Dass jedoch nicht nur die Verlängerung der Enden einen negativen Einfluss auf die Selektivität hatte, zeigte der Fall D (*Abbildung 35*). Hier wurde mehr von der passenden Sequenz an die Probe hybridisiert, obwohl diese die verlängerten Enden trug. Die Fälle A und C zeigten ebenfalls eine Selektivität für die passenden Stränge **ON13** und **ON31** der Effekt war aber kleiner (*Abbildung 32* und *Abbildung 34*).

Tabelle 12: Hybridisierungsexperimente mit unterschiedlichen Gegenstranggemischen. Bedingungen: 5 min. bei 85 °C, Abkühlung während 1.5 h; a) Die Ausbeuten beziehen sich auf die Beladung von 0.42 nmol / mg.

| | SP | Gegenstrang | Anzahl Fehlstellen | Ausbeute ^{a)} / [%] |
|---|-------|-------------|--------------------|------------------------------|
| 1 | SP20C | ON13 | 0 | 107 |
| | | ON29 | 1 | 64 |
| 2 | SP20C | ON13 | 0 | 97 |
| | | ON30 | 2 | 42 |
| 3 | SP20C | ON23 | 1 | 58 |
| | | ON31 | 0 | 67 |
| 4 | SP20C | ON24 | 2 | 55 |
| | | ON31 | 0 | 84 |

6.7 Zusammenfassung

Die durchgeführten Hybridisierungsexperimente zeigten, dass mit den geeigneten Bedingungen (85 °C für 3 min., Abkühlen unter ständigem Schütteln während mind. 1.5 h) während der Hybridisierung Gegenstränge quantitativ Doppelhelizes mit immobilisierten Strängen ausbilden können. Dabei zeigte sich, dass der Abstandhalter einen positiven Einfluss auf die Effizienz hat und dass die Oberflächenbeladung im hier verwendeten Bereich keinen Einfluss zeigt. Auch zeigte sich eine Selektivität der Anordnung zum Herausfischen der Sequenz von Interesse aus einer Lösung.

7 Photolysen

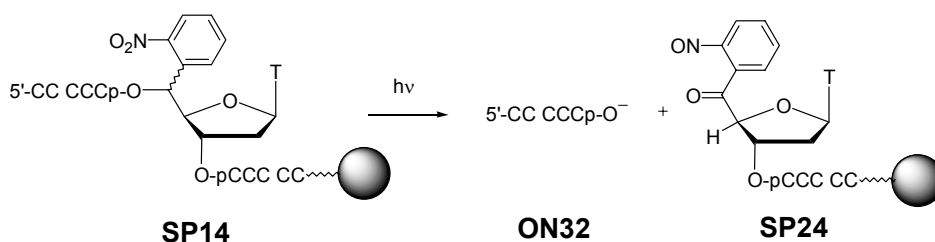
7.1 Einleitung

Mit den ersten hier durchgeführten Bestrahlungen sollten wesentliche Punkte abgeklärt werden. Die Bestrahlungen von Einzelstrangsystemen sollte die Effizienz des Strangbruchs zeigen. Für die nicht nur qualitative, sondern quantitative Verwendbarkeit der Methode, ist ein reproduzierbarer, quantitativer Strangbruch notwendig. Für den Strangbruch in Lösung wurde die quantitative Spaltung bereits gezeigt.²⁸ In Doppelstrangbestrahlungen, mit unterschiedlichen Gegensträngen (*match* und *mismatch*), sollte gezeigt werden, dass das System über den so genannten Gegenstrangeffekt verfügt.

7.2 Einzelstrangsysteme

7.2.1 Mehrstufig aufgebaute Systeme

Bei den mehrstufig aufgebauten Systemen (*Kap. 5.1*) ist nach der Photolyse eines Einzelstrangsystems **SP14** nur das 3'-Phosphat **ON32** als Produkt in der Lösung zu erwarten, da dieses System über das 3'-Ende an die Festphase gebunden ist (vgl. *Schema 6*).



Schema 14: Bestrahlung des schrittweise aufgebauten Systems **SP14**. Festphase: CPG, Tentagel.

Die Bestrahlung des Systems **SP14** zeigte jedoch mehr Produkte als nur das erwartete **ON32**. Zusätzlich zu diesem Spaltprodukt wurden noch zwei weitere Stränge in Lösung detektiert, wie dies im HPLC-Chromatogramm der Bestrahlungslösung zu sehen ist (*Abbildung 36*).

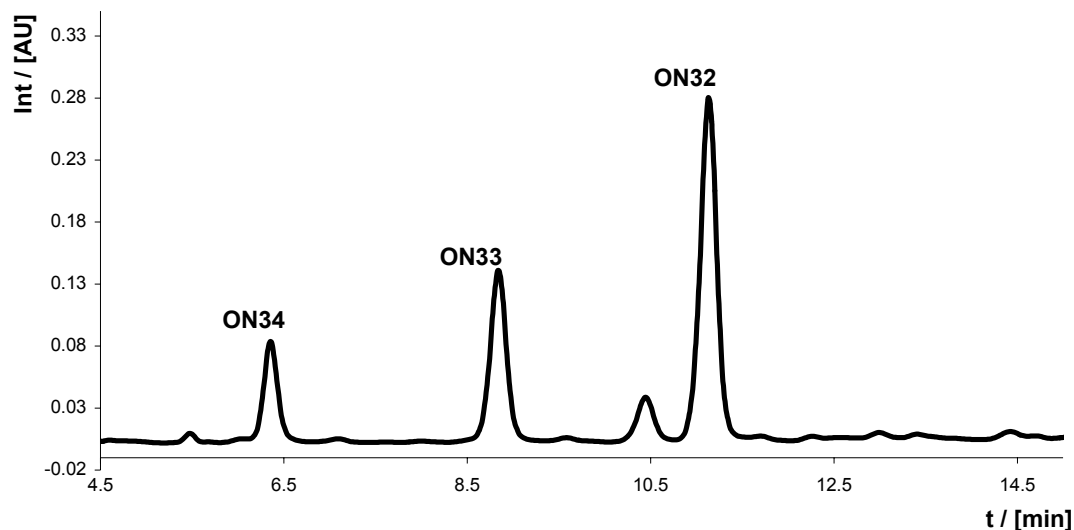


Abbildung 36: RP18-Chromatogramm einer Photolyse von SP14; Bestrahlungsbedingungen: 360 nm, 15 °C, 15 min., 500 W.

Die Isolierung und anschließende Analyse der Stränge mittels MALDI-ToF-MS ergab, dass es sich dabei um Phosphate handelte, die jeweils um eine (**ON33**) bzw. zwei (**ON34**) Basen im Bezug auf **ON32** verkürzt waren. Dies liess sich einfach erklären. Während der DNS-Synthese wurden Sequenzen, an welche kein Monomer gekuppelt wurde, als Acetate für die weiteren Syntheseschritte deaktiviert. Der letzte Schritt der automatisierten DNS-Synthese ist die vollständige Entschützung des DNS-Stranges mit Base (*Kap. 18.1*). Hierbei wurde die Acetatgruppe ebenfalls von allen maskierten Enden entfernt. Befanden sich diese Enden nach der photolabilen Gruppe **1** in Richtung 5'-Ende, wurden sie nach der Bestrahlung als verkürzte Phosphate in der Lösung detektiert. Somit waren auch Aussagen über die Bestrahlungsausbeuten nicht relevant, da diese verkürzten Sequenzen bei der Bestimmung der Oberflächenbeladung, auf welcher die Ausbeute beruht, nicht erfasst wurden (*Tabelle 13*).

Tabelle 13: Einzelstrangbestrahlungen; a) Summe aller detektierten Spaltprodukte, Ausbeute bzgl. Oberflächenbeladung von SP14/16 (Tentagel) rsp. SP11/13 (CPG).

| | Sequenz | | Ausbeute ^{a)} / [%] |
|---|--|-------------|------------------------------|
| 1 | CCC CCTNO ₂ CCC CC – Tentagel | SP14 | 7 – 29 |
| 2 | CCC CCTNO ₂ CCC CC – CPG | SP11 | 130 -900 |
| 3 | TTT TTT TTT TTNO ₂ T TTT TTT TTT – Tentagel | SP16 | 135 – 200 |
| 4 | TTT TTT TTT TTNO ₂ T TTT TTT TTT – CPG | SP13 | 100 |

Mit den verbesserten Synthesen von polyT-Strängen (**SP16** und **SP13**) konnte erreicht werden, dass nur minimale Mengen der verkürzten Sequenz **ON36** nach der Bestrahlung von **SP13** in der Lösung auftraten (*Abbildung 37*). Die Ausbeuten, die mit diesem System erreicht wurden, zeigten, dass die Strangspaltung auf den Festphasen CPG und Tentagel quantitativ verliefen.

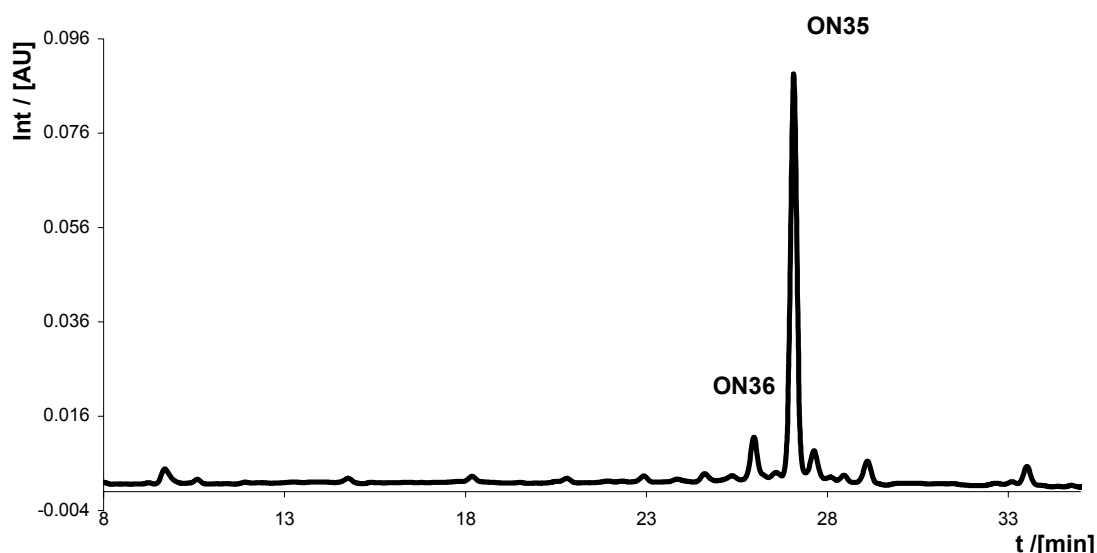
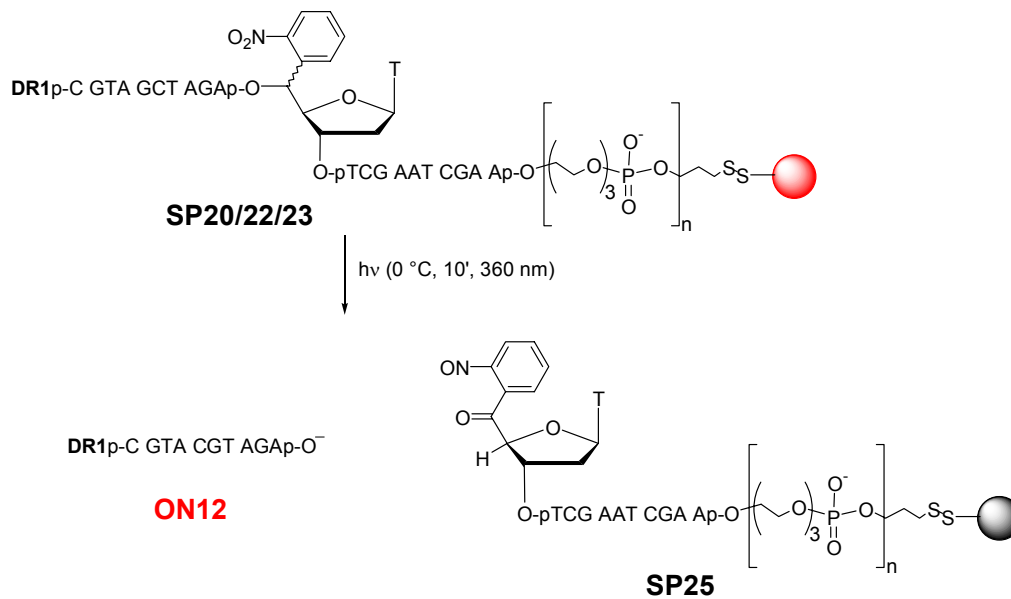


Abbildung 37: RP18- HPLC - Chromatogramm einer Photolyse von **SP13**; Bestrahlungsbedingungen: 360 nm, 15 °C, 1 h, 500 W.

7.2.2 Einstufig aufgebaute Systeme

Im Vergleich zu den in Kapitel 7.2.1 beschriebenen Photolysen, wurde hier Agarose als Festphase verwendet. Aus der Literatur ist bekannt, dass die photolytische Spaltung einer Nitrobenzyl-Gruppe auf Agarose quantitativ verläuft.⁵¹

Bei einstufig aufgebauten Systemen, die über das 3'-Ende an die Festphase geknüpft worden sind, ist das einzige erwartete Photolyseprodukt das 3'-Phosphat **ON12**. Bei 5'-immobilisierten Systemen ist die Situation anders. Hier können das 5'-Phosphat **6** und die von **5** ausgehenden Folgeprodukte in der Bestrahlungslösung vorhanden sein (*Schema 6*), wobei das 5'-Phosphat **6** mit einer erwarteten Ausbeute von etwa 50 % den grössten Anteil ausmachen sollte.²⁷



Schema 15: Photolyse von immobilisierten Oligonukleotidsystemen, welche mit Dispers Rot 1 markiert sind. (n = 0: SP22, n = 0,1: SP20C, n = 1: SP23).

Die in *Tabelle 14* aufgeführten Resultate zeigen, abgesehen von **SP22**, die erwarteten Ausbeuten an 5'-Phosphat **ON12**. Die geringe Ausbeute bei **SP22** deutete auf eine Wechselwirkung der Festphasenoberfläche mit dem immobilisierten DNS-Strang oder aber mit dem abgespaltenen Photolyseprodukt **ON12** hin. Die Einführung des Abstandhalters **15** in den Systemen **SP20** und **SP23** hatte hier erneut einen positiven Einfluss. Die immobilisierten Stränge befanden sich durch den Abstandhalter **15** in ausreichender Entfernung von der Oberfläche, um sich analog dem System in Lösung zu verhalten. Wie bei der Bestrahlung des Systems **SP20**, das aus einer Mischung (~ 1:1) von Oligonukleotiden bestand, zu sehen war, reichte ein Anteil von etwa 50 % vom Abstandhalter, um die Oberfläche für Wechselwirkungen mit den Oligonukleotiden abzuschirmen. Die Bestrahlungen zeigten, dass die photolytische Spaltung eines Einzelstrangs auf der Festphase nahezu quantitativ verläuft.

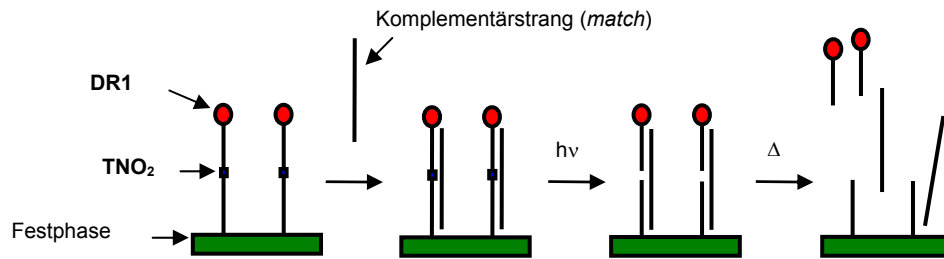
Tabelle 14: Einzelstrangbestrahlungen: a) Mittelwerte (siehe Kap. 18.5), über freigesetzte Menge ON12 bezogen auf die Oberflächenladung mittels RP18-HPLC bestimmt; b) n = 0, 1 (Gemisch 1:1), c) über freigesetzte Menge ON22 bezogen auf die Oberflächenladung mittels RP18-HPLC bestimmt.

| | Sequenz (5' → 3') | Ausbeute^{a)} / [%] |
|---|--|------------------------------------|
| 1 | DR1 -pCGT AGC TAG ATNO ₂ T CGA ATC GTAp-O-(CH ₂) ₃ -SS-SP SP22 | 35 |
| 2 | DR1 -pCGT AGC TAG ATNO ₂ T CGA ATC GTAp-(O-(C ₂ H ₄ O) ₃) _n - PO ₂ -O-(CH ₂) ₃ -SS-SP SP20C^{b)} | 95 |
| 3 | DR1 -pCGT AGC TAG ATNO ₂ T CGA ATC GTAp-O-(C ₂ H ₄ O) ₃ -PO ₂ - O-(CH ₂) ₃ -SS-SP SP23 | 98 |
| 4 | SP-SS-(CH ₂) ₆ -pCAG TTC ATC GTT ACG TNO₂CT AAG GTC TTG CAT G SP19 | 54 ^{c)} |

7.3 Match-Sequenzen

7.3.1 Einleitung

Die Bestrahlung von Einzelsträngen an der Festphase hat gezeigt, dass die Photolyse nahezu quantitativ verläuft. Hybridisierte man nun einen Komplementärstrang an den immobilisierten Strang (**SP20/22/23**) und bestrahlte dieses Doppelstrangsystem, so sollte das abgespaltene 3'-Phosphat **ON12** durch die Basenpaarung mit dem Gegenstrang auf der Festphase verbleiben (vgl. *Schema 15*). Als Kontrolle wurden die Festphasen nach der Bestrahlung auf 85 °C erwärmt. Dabei schmolz der Doppelstrang und das Photolyseprodukt wurde freigesetzt (*Schema 16*). Verhielte sich ein System so, dass direkt nach der Bestrahlung nur wenig und nach der Wärmebehandlung viel **ON12** in der Lösung nachzuweisen war, zeigte das System den für die Methode notwendigen Gegenstrangeffekt.



Schema 16: Auswirkung des Gegenstranges auf die Freisetzung des Photolyseprodukts. Hybridisierung, Bestrahlung (10 °C, ≥ 360 nm, 10 min., 500 W) und Wärmebehandlung (filtrieren bei 85 °C).

7.3.2 Der Gegenstrangeffekt

Um den gewünschten Gegenstrangeffekt zu messen, wurden verschiedene Doppelstrangsysteme bestrahlt. Bei allen gemessenen Doppelstrangsystemen war der Gegenstrang ein Komplementärstrang gleicher Länge (**ON13**). Um den Effekt zu erkennen, wurden die Ergebnisse jeweils mit denjenigen für die analogen Einzelstrangsysteme verglichen (*Kapitel 7.2*).

Abbildung 38 zeigt, dass für die Systeme **SP20C** und **SP23** der Doppelstrangeffekt eindeutig zu erkennen war. Nach der Photolyse wurden nur 24 % respektive 14 % **ON12** in der Lösung detektiert. Nach der Wärmebehandlung wurde in beiden Systemen so viel **ON12** freigesetzt, dass Gesamtausbeuten von 78 % resp. 82 % resultierten. Für das System **SP22** galt dies nicht. Einerseits wurden nach der Bestrahlung ebenfalls nur 22 % **ON12** freigesetzt, andererseits betrug die Gesamtausbeute nur 52 %. Dies bedeutete, dass der Unterschied in der freigesetzten Menge nur 8 % betrug, weshalb hier nicht von einem eindeutigen Effekt die Rede sein konnte. Der abwesende Distanzhalter **15** und die damit einhergehende leicht geringere Hybridisierungsausbeute wurden für diesen fehlenden Effekt verantwortlich gemacht.

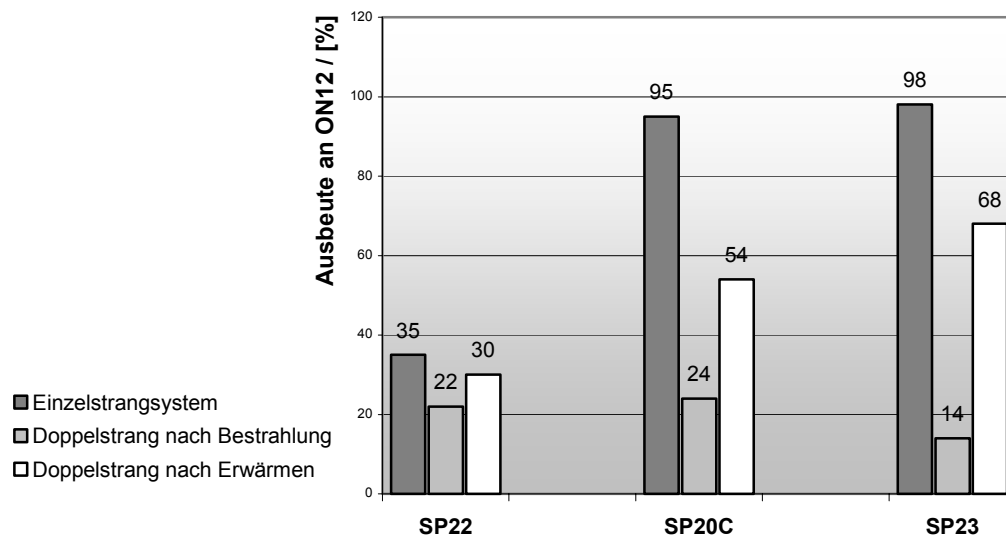


Abbildung 38: Vergleich von Einzelstrang- mit Doppelstrangexperimenten; RP18-HPLC-Detektion der freigesetzten Mengen an ON12 in der Bestrahlungslösung (hellgrau) und nach der zusätzlichen Wärmebehandlung (weiss) der Festphase. Die Ausbeuten beziehen sich auf die Oberflächenbeladungen der Festphasen und sind Mittelwerte (siehe Kap. 18.5).

7.3.3 Wie lang muss die Erkennungssequenz sein?

Wie oben beschrieben wurde, konnte mit den Systemen **SP20C** und **SP23** und einem passenden 21mer-Gegenstrang **ON13** der für die Methode benötigte Doppelstrangeffekt erzielt werden. Nun stellte sich die Frage nach der minimalen Stranglänge, die für einen eindeutigen Doppelstrangeffekt nötig wäre. Dazu wurden Doppelstrangsysteme **SP23** bestrahlt, bei welchen die Länge des Gegenstranges verkürzt wurde. Eingesetzt wurde ein 19mer Strang **ON37**, an dessen Enden je eine Base fehlte, und ein 17mer-Strang **ON38**, an dessen Enden je zwei Basen fehlten (*Abbildung 39*). Die Ergebnisse sind in *Abbildung 40* abgebildet und zeigen, dass mit dem 17mer Gegenstrang kein Doppelstrangeffekt zu sehen war. Das System verhielt sich also wie ein Einzelstrangsystem. Mit dem 19mer-Gegenstrang war der Doppelstrangeffekt tendenziell erkennbar. Für ein eindeutiges Ergebnis wurde jedoch der schon zuvor verwendete 21mer-Gegenstrang benötigt.

| | |
|-----------------------------------|-------------|
| 5'-TAC GAT TCG AAT CTA GCT ACG-3' | ON13 |
| 5'- AC GAT TCG AAT CTA GCT AC -3' | ON37 |
| 5'- C GAT TCG AAT CTA GCT A -3' | ON38 |

Abbildung 39: Verwendete Gegenstränge mit unterschiedlichen Längen der Erkennungssequenz.

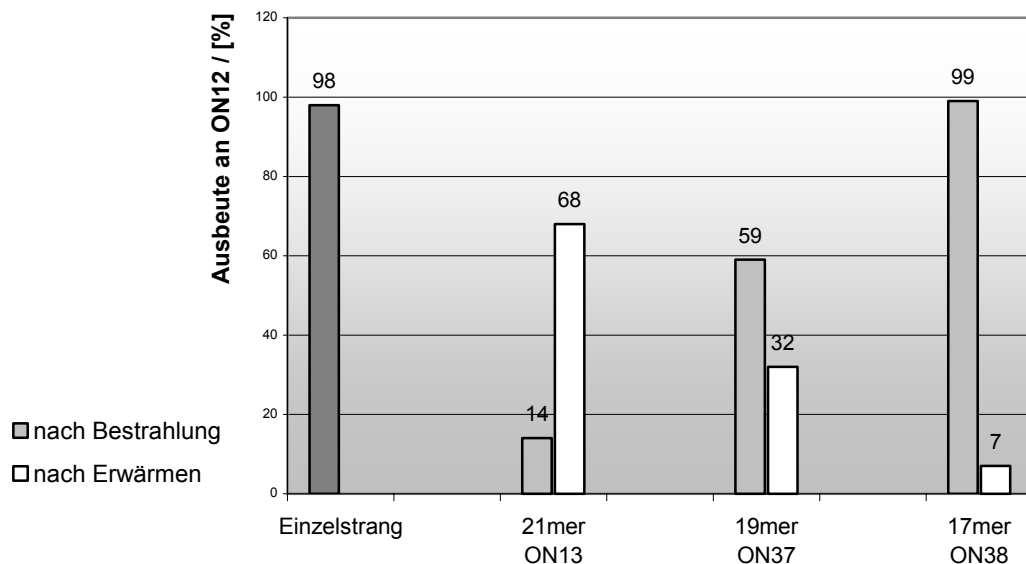


Abbildung 40: Vergleich von Doppelstrangexperimenten SP23: Unterschiedliche Gegenstranglängen. RP18-HPLC-Detektion der freigesetzten Mengen an ON12 in der Bestrahlungslösung (hellgrau) und nach der zusätzlichen Wärmebehandlung (weiss) der Festphase. Die Ausbeuten beziehen sich auf die Oberflächenbeladungen der Festphasen und sind Mittelwerte (siehe Kap. 18.5).

7.3.4 Toleranz gegenüber Überlänge

Der Doppelstrangeffekt konnte, wie im vorangegangenen Kapitel gezeigt wurde, mit Doppelsträngen von 21 bp Länge erreicht werden. Soll diese Methode zur Anwendung gelangen, werden biologische Proben untersucht werden. Diese Sequenzen haben dann nur in seltenen Fällen die ideale Länge. Um zu überprüfen, ob der Doppel-

strangeffekt auch mit zu langen Strängen bestehen bleibt, wurden Doppelstrangsysteme untersucht, die aus der 21 bp langen Erkennungssequenz bestanden. Der Gegenstrang wurde an beiden Enden um die Homooligosequenz T₅ (*overhang*) verlängert (*Abbildung 41*). Die Ergebnisse zeigten, dass eine 21mer-Erkennungssequenz auch mit verlängerten Strängen den gewünschten Effekt aufwies (*Abbildung 42*).

5'-TAC GAT TCG AAT CTA GCT ACG-3'

ON13

5'-TT TTT TAC GAT TCG AAT CTA GCT ACG TTT TT-3'

ON31

Abbildung 41: Verwendete Stränge: Toleranz gegenüber Überlänge.

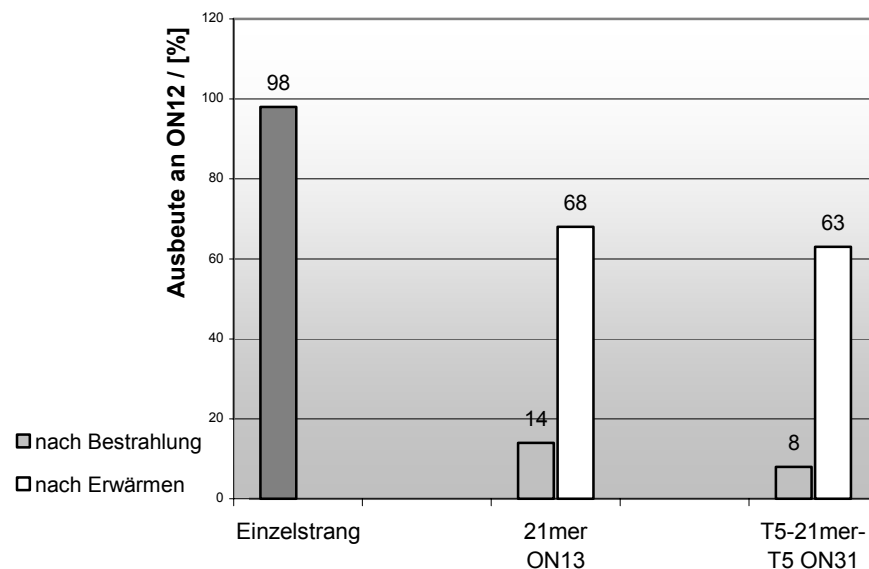
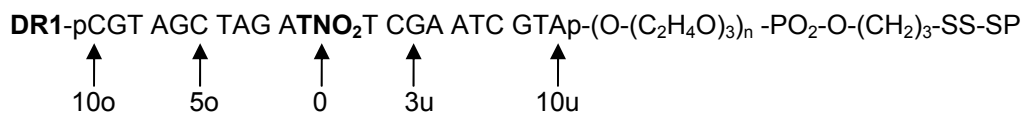


Abbildung 42: Vergleich von Doppelstrangexperimenten an SP23: Toleranz des Systems gegenüber Strängen mit Überlänge. RP18-HPLC-Detektion der freigesetzten Mengen an ON12 in der Bestrahlungslösung (hellgrau) und nach der zusätzlichen Wärmebehandlung (weiss) der Festphase. Die Ausbeuten beziehen sich auf die Oberflächenbeladungen der Festphasen und sind Mittelwerte (siehe Kap. 18.5).

7.4 Sequenzen mit Fehlpaarungen

7.4.1 Einleitung

Als nächster Schritt wurden Systeme bestrahlt, an welche Gegenstränge mit Fehlstellen hybridisiert wurden. Das System soll dann so empfindlich sein, dass zwischen *match*- und *mismatch*-Situationen unterschieden werden kann. Es wurden eine und zwei Fehlstellen eingeführt. Die Positionen wurden variiert, um allfällige Tendenzen zu erkennen. Für die Positionsbezeichnung der Fehlstellen wurde die in *Abbildung 43* gezeigte Nomenklatur verwendet.



SP20C: n = 0,1

SP23 : n = 1

Abbildung 43: Nomenklatur für die Positionen der Fehlstellen.

Die Position von **TNO₂** wurde als Position „0“ bezeichnet. Von dieser Position aus wurden die Basen von 1 bis 10 durchnummeriert. Oberhalb von **TNO₂** in Richtung 5'-Ende und unterhalb in Richtung 3'-Ende wurden zusätzlich die Bezeichnungen „o“ bzw. „u“ angegeben. Position „3u“ bezeichnet demnach die dritte Base nach **TNO₂** in der 3'-Richtung.

7.4.2 Sequenzen mit zwei Fehlpaarungen

Die Bestrahlungsergebnisse sind in *Abbildung 44* gezeigt. Alle bestrahlten Systeme zeigten ein dem Einzelstrangsystem ähnliches Verhalten. Es wurde direkt nach der Bestrahlung die grösste Menge **ON12** freigesetzt. Nach der Hitzebehandlung konnte zwar in allen Fällen noch zusätzlich **ON12** detektiert werden, die Menge war aber klein. Somit konnte auf Grund der hier durchgeführten Versuche angenommen werden, dass die Detektion zweier Fehlpaarungen möglich ist. Wie sich das System verhält, wenn

man die Positionen der Fehlstellen maximal voneinander trennt (10o/10u), muss in weiteren Arbeiten geprüft werden.

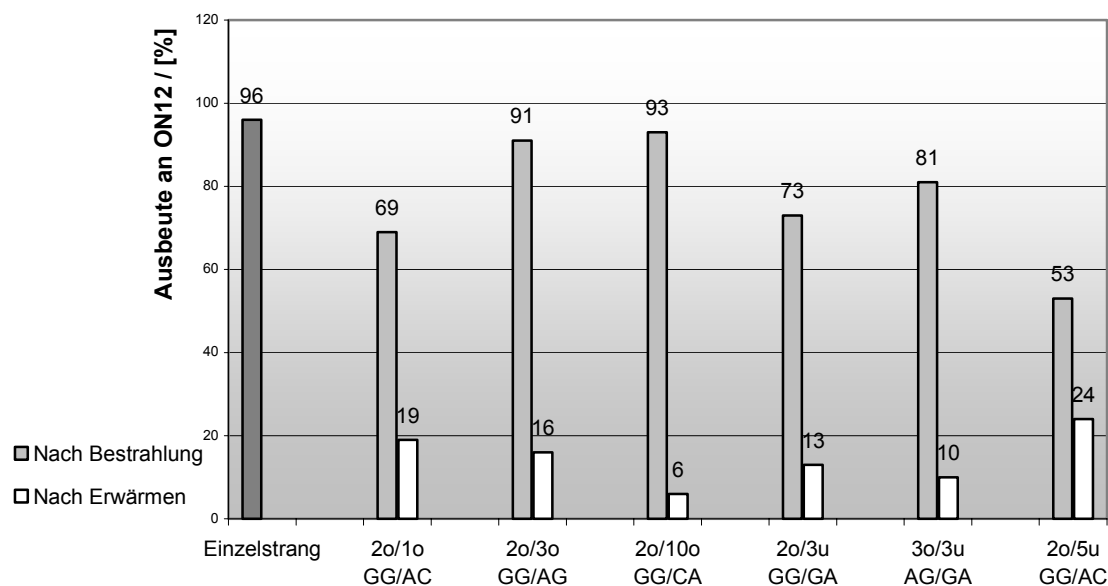


Abbildung 44: Bestrahlungsergebnisse von Doppelstrangsystemen (SP23, SP20C) mit zwei Fehlstellen im Gegenstrang. RP18-HPLC-Detektion der freigesetzten Mengen an ON12 in der Bestrahlungslösung (hellgrau) und nach der zusätzlichen Wärmebehandlung (weiss) der Festphase. Die Ausbeuten beziehen sich auf die Oberflächenbeladungen der Festphasen und sind Mittelwerte (siehe Kap. 18.5).

7.4.3 Sequenzen mit einer Fehlpaarung

Die in *Kapitel 7.4.2* gezeigten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass das hier vorgestellte System zur Detektion von zwei Fehlstellen in einer 21 bp langen Oligonukleotidsequenz verwendet werden kann. Mutationen wie sie in *Kapitel 1.2* beschrieben sind, generieren meist nur eine Punktmutation, also nur eine Fehlstelle in einer Sequenz. Ziel ist es, diese Sequenzen von intakten Sequenzen unterscheiden zu können.

Bestrahlungen von Systemen mit einer Fehlpaarung in der Sequenz oberhalb der photolabilen Stelle **TNO₂** zeigten, dass nur eine bestimmte Stelle als fehlgepaart erkannt wurde (*Abbildung 45 A*). Es handelte sich dabei um eine C-T-Paarung anstelle einer G-C-Paarung an der Position 5. Eine erste Interpretation wäre, dass die Position ausschlaggebend für dieses Ergebnis ist. Vergleicht man jedoch die Ergebnisse aus den Bestrahlungen für Fehlstellen unterhalb von **TNO₂**, sieht man, dass hier

ausgerechnet die Position 5 nicht erkannt wurde. Dafür wurden die Positionen 3, in zwei von drei Fällen, und 7 erkannt

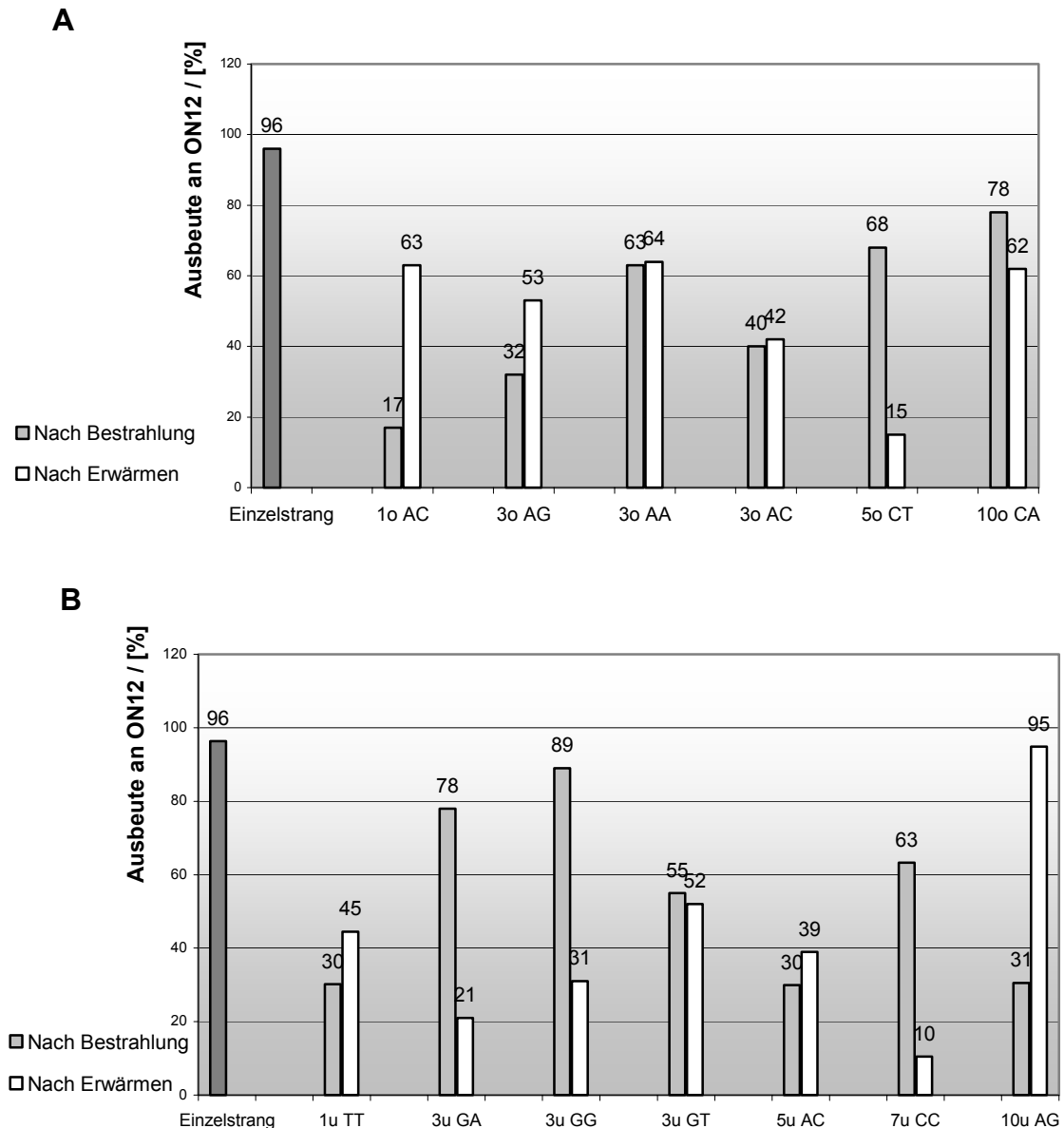


Abbildung 45: Bestahlungsergebnisse für Doppelstrangsysteme (SP23, SP20C) mit einer Fehlstelle. A: Fehlstellen oberhalb von TNO₂ (in Richtung 5'-Ende); B: Fehlstellen unterhalb von TNO₂ (in Richtung 3'-Ende). RP18-HPLC-Detektion der freigesetzten Mengen an ON12 in der Bestrahlungslösung (hellgrau) und nach der zusätzlichen Wärmebehandlung (weiss) der Festphase. Die Ausbeuten beziehen sich auf die Oberflächenbeladungen der Festphasen und sind Mittelwerte (siehe Kap. 18.5).

Betrachtet man die Positionen 3o/AG und 3u/GA genauer, wird deutlich, dass es sich hier nicht nur um die gleiche Position handelte, sondern auch noch die gleiche

Fehlpaarung bestand. Weshalb nun wurde die Position 3u erkannt und 3o nicht? Die zwei Positionen unterschieden sich zusätzlich noch durch folgende drei Parameter: Zusätzliches Vorhandensein der Basenpaarung **TNO₂-A** im Fall von 3u/GA, Nähe zur Oberfläche und ihre nächsten Nachbarn. Nahm man das Ergebnis von 3o/AA hinzu, zeigte sich, dass diese Fehlpaarung an Position 3o zwar ebenfalls nicht erkannt wurde, dass sie sich aber leicht anders verhielt als 3o/AG. Betrachtung der Position 3u zeigte, dass die Art der Fehlpaarung einen Einfluss hatte, so wurden 3u/GA und 3u/GG erkannt, 3u/GT zeigte jedoch kein eindeutiges Resultat. Diese Tatsache erklärt demnach die Resultate von 5o/CT und 5u/AC. Hier fanden sich zwei unterschiedliche Fehlpaarungen. Da unterschiedliche Fehlpaarungen unterschiedlich stabil sein können,⁵² ist die Art der Fehlpaarung für die Erkennung einer einzelnen Fehlgepaarten Stelle von grosser Bedeutung.

Die Interpretation der Ergebnisse liess sich nicht auf einzelne eindeutig definierbare Faktoren reduzieren. Die hier durchgeführten Arbeiten erlaubten noch keine eindeutigen Interpretationen. Sie zeigten allerdings, dass für einige ausgewählte Positionen eine Erkennung möglich ist.

7.5 Zusammenfassung

Sowohl die optimierten, mehrstufig aufgebauten Systeme als auch die einstufig aufgebauten Systeme zeigten nach Bestrahlung die gewünschte nahezu quantitative Strangspaltung auf fester Phase. Für die qualitative und quantitative Detektion von Sequenzen besitzt das System somit die notwendigen Eigenschaften. Wie auch schon bei den Hybridisierungsexperimenten beobachtet werden konnte, hatte die Einführung des Abstandhalters einen positiven Einfluss auf die Bestrahlungsausbeuten. Die Bestrahlungen der Doppelstrangsysteme **SP20C** und **SP23** mit einem 21bp langen passenden Komplementärstrang zeigten den gewünschten Doppelstrangeffekt. Ebenfalls tolerierte das System *overhangs* an der zu erkennenden Sequenz. Für die Detektion von nur einer Fehlstelle scheint das System noch zu wenig sensibel, denn eine Diskriminierung fand nur an bestimmten Stellen statt. Dagegen wurden die gemessenen Kombinationen von zwei Fehlstellen alle erkannt.

8 Alternative Analytik

8.1 Einleitung

Die bisher mittels HPLC-Analysen durchgeführten Experimente hatten den Vorteil, dass sie kombiniert mit MALDI-ToF-MS mehr Informationen boten. Für die HPLC-Analysen war die Anwesenheit des Farbstoffs **DR1** nicht notwendig. Auf Grund der Tatsache, dass die hier vorgestellte Methode eine rasche und einfache Analytik erlauben soll und HPLC-Analysen wiederum mit einem grösseren apparativen Aufwand verknüpft sind, wurden in dieser Arbeit noch andere Möglichkeiten der Analytik, die auf Eigenschaften des Farbstoffs basieren, auf ihre Anwendbarkeit in der Praxis überprüft. Die Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten erläutert.

8.2 UV/Vis –Spektroskopie

Analog der HPLC-Analytik soll die Lösung nach erfolgter Bestrahlung mittels UV/Vis-Spektroskopie untersucht werden. Es wurde die Absorption der Lösungen bei 520 nm gemessen. Der Fokus lag dabei auf der Absorption des Farbstoffes. Bei den HPLC-Analysen erfolgte die Detektion bei 260 nm, der Wellenlänge, bei welcher sowohl der Farbstoff als auch die Nukleobasen absorbieren. Hier war somit die Anwesenheit des Farbstoffes für die UV/Vis-Detektion notwendig.

Wie Messungen einer Verdünnungsreihe zeigten, liegt die untere Grenze für die Konzentrationen, die noch reproduzierbar vermessen werden konnten, bei etwa 3 μM (vgl. *Kap. 18.4*). Bei den durchgeführten Bestrahlungsexperimenten konnte bei quantitativer Freisetzung des Photolyseprodukts eine maximale Konzentration um 2.5 μM erwartet werden. Da dies die maximal zu erwartende Konzentration war, befand man sich also unterhalb der Messgrenze.

Direkte Messungen der Bestrahlungslösung waren deshalb nicht möglich. Um dennoch Messungen durchführen zu können, wurden die Proben um einen Faktor zehn aufkonzentriert. Die Messungen zeigten, dass die erhaltenen Ausbeuten für das Einzelstrangexperiment und auch für die Doppelstrangexperimente mit passenden Gegensträngen den Ergebnissen aus *Kapitel 7* entsprachen (*Abbildung 46*). Der Doppelstrangeffekt konnte auch durch UV/Vis-Messungen gezeigt werden.

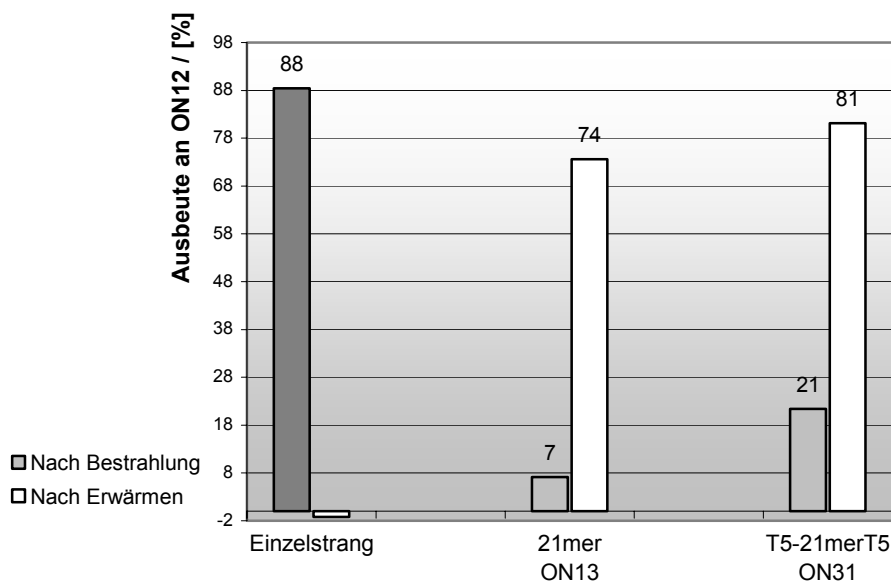


Abbildung 46: UV/Vis-Ergebnisse der Bestrahlungen von SP23. Einzelstrang- und Doppelstrangsysteme ON13 und ON31. UV/Vis-Detektion der freigesetzten Mengen an ON12 in der Bestrahlungslösung (hellgrau) und nach der zusätzlichen Wärmebehandlung (weiss) der Festphase. Die Ausbeuten beziehen sich auf die Oberflächenbeladungen der Festphasen und sind Mittelwerte aus zwei Experimenten.

Betrachtete man die Doppelstrangbestrahlungen mit einer Fehlstelle, so stellte man fest, dass nur zwei Positionen eindeutig als fehlgepaart erkannt wurden. Es handelte sich dabei um die Positionen 5o/CT und 7u/CC, die beide auch durch die HPLC-Analysen erkannt wurden. Ein nicht eindeutiges Ergebnis lieferte die Fehlpaarung 3u/GA. Diese Fehlpaarung wurde durch die HPLC-Analysen erkannt (*Abbildung 47*). Der Vergleich der Ergebnisse, die mittels UV/Vis-Spektroskopie erhalten wurden, mit denjenigen aus der HPLC-Analytik, zeigten, dass man sich tatsächlich an der Schwelle der Reproduzierbarkeit befand. Die Extinktion des Farbstoffes reichte nicht aus, um Konzentrationen, die kleiner sind als die hier verwendeten, mittels UV-Vis-Spektroskopie verlässlich zu vermessen. Mit einem anderen, empfindlicheren Marker, der eine höhere Extinktion aufweist, konzentrierteren Proben oder Fluoreszenzfarbstoffen müssten reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden könnten.

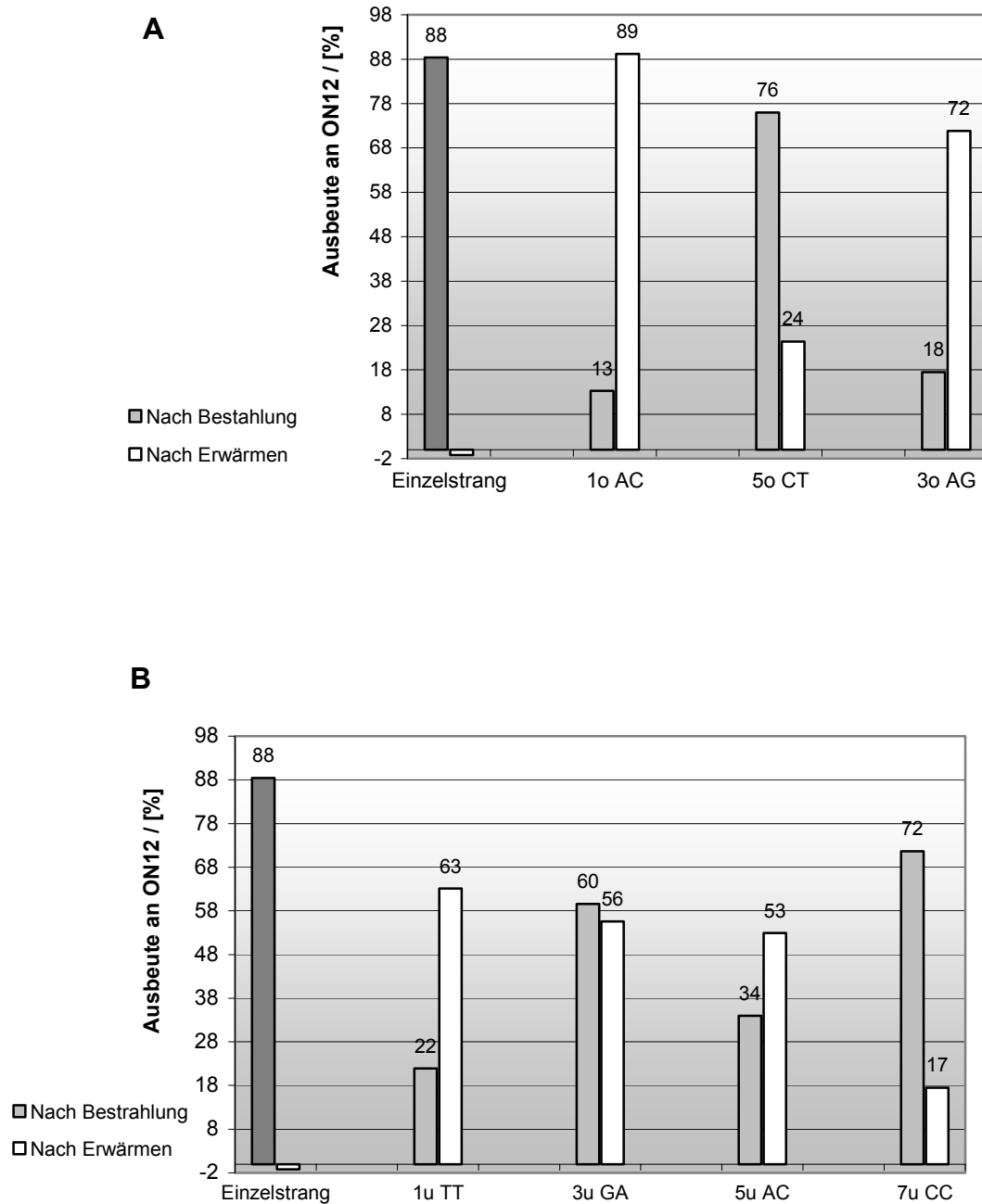


Abbildung 47: UV/Vis-Ergebnisse der Doppelstrangbestrahlungen mit einer Fehlstelle (SP23). A: Fehlstellen sitzen oberhalb von TNO₂ (in Richtung 5'-Ende); B: Fehlstellen sitzen unterhalb von TNO₂ (in Richtung 3'-Ende). UV/Vis-Detektion der freigesetzten Mengen an ON12 in der Bestahlungslösung (hellgrau) und nach der zusätzlichen Wärmebehandlung (weiss) der Festphase. Die Ausbeuten beziehen sich auf die Oberflächenbeladungen der Festphasen und sind Mittelwerte aus zwei Experimenten.

8.3 Betrachtung der Festphase (Mikroskopie)

Im Gegensatz zum Betrachten der Bestrahlungslösung, bestand beim Blick auf die Festphase die Möglichkeit, das Verbleiben des Farbstoffes unter dem Mikroskop zu betrachten. Hier war jedoch nur die Unterscheidung von ‚farbig‘ und ‚nicht farbig‘ möglich. Die Möglichkeit der quantitativen Auswertung fiel weg. Bei der Betrachtung der festen Phase liesse sich die Nachweisgrenze im Vergleich zur HPLC- und UV/Vis-Analytik weiter herabsetzen, da geringere Mengen eingesetzt werden könnten. Erste qualitative Versuche wurden durchgeführt.

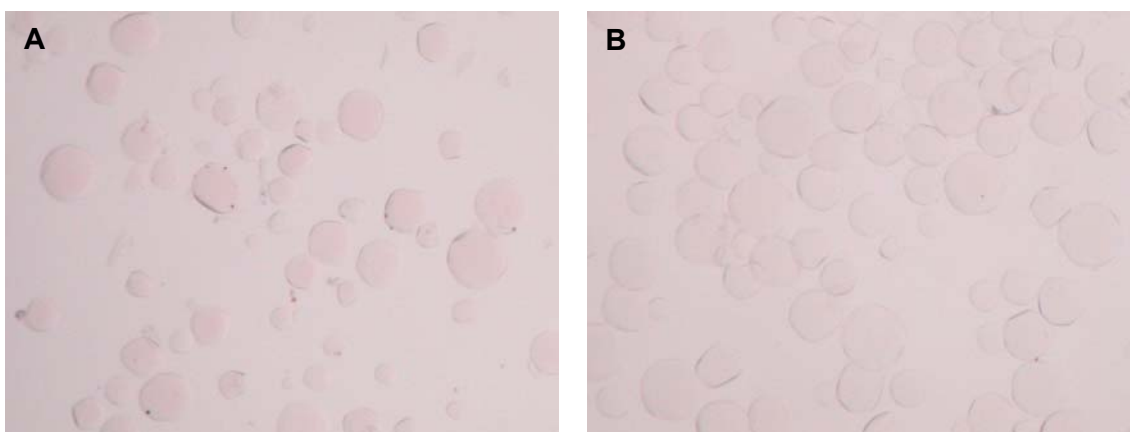


Abbildung 48: Betrachtung der Photolyse von SP23A (0.37 nmol/mg) unter dem Mikroskop. A. vor der Bestrahlung; B. nach der Bestrahlung (10 min., ≥ 360 nm, 10 °C, 500 W); auf Grund von Abbildungsproblemen ist die Entfärbung der Festphase nicht deutlich ersichtlich.

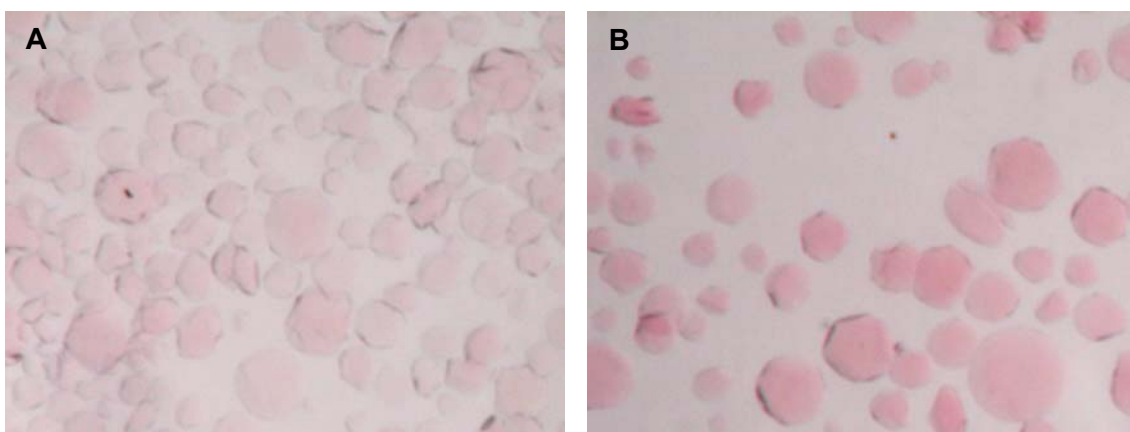


Abbildung 49: Vergleich zweier Festphasen mit unterschiedlicher Beladung unter dem Mikroskop. A: SP3B, 0.29 nmol/mg; B: SP3A, 0.78 nmol/mg.

Diese Versuche zeigten, dass die Entfärbung der Festphase unter dem Mikroskop beobachtet werden konnte (Abbildung 48). Aufgrund der geringen Oberflächenbeladung

dung war die Färbung der Festphase jedoch sehr gering, was eine eindeutige Unterscheidung zwischen gefärbt und entfärbt erschwerte. Das Erhöhen der Beladung führte zu einer stärkeren Färbung der Festphase wie der Vergleich der Festphasen **SP3B** (Beladung: 0.29 nmol/mg) und **SP3A** (0.78 nmol/mg) zeigt (*Abbildung 49*). Mit einer grösseren Beladung kann also das System dahingehend verändert werden, dass eine eindeutige Unterscheidung möglich wird.

8.4 Zusammenfassung

Durch das Aufkonzentrieren der UV/Vis-Proben konnten Ergebnisse erzielt werden, die mit den HPLC-Resultaten vergleichbar waren. Die Empfindlichkeit der UV/Vis-Spektroskopie ist mit Dispers Rot 1 als Marker jedoch begrenzt ($c = 2 \mu\text{M}$, $V = 4 \mu\text{L}$). Mit einem empfindlicheren Marker dürfte sich die Sensitivität der Methode noch erhöhen lassen.

Die benötigte Menge Analyt kann mit dem verwendeten System durch die Betrachtung der Festphase herabgesetzt werden. Genaue Mengen wurden hier nicht bestimmt. Die Ergebnisse zeigten aber deutlich, dass es möglich war, mit optischen Systemen eine Unterscheidung zu erreichen, die sich unter dem Mikroskop beobachten liesse und somit die Grundlage für eine Anwendung als Teststreifen bildete.

9 Ausblick

Mit den hier präsentierten Resultaten konnte gezeigt werden, dass das Prinzip zur Detektion von DNS-Sequenzen funktioniert. Die Strangspaltung auf fester Phase verlief quantitativ und mit einem Komplementärstrang wurde der Doppelstrangeffekt erzielt. Aus den Doppelstrangbestrahlungen mit zwei eingefügten Fehlstellen ging hervor, dass die Detektion von zwei Fehlstellen in einer 21 bp langen Sequenz möglich war. Es bleibt zu zeigen, wie weit die Fehlstellen voneinander entfernt sein dürfen, um ein eindeutiges Resultat zu erzielen. Als Sonde für die Detektion von einzelnen Fehlstellen birgt der Aufbau durchaus Potenzial. Es ist denkbar, dass sich die Selektivität, mit welcher einzelne Fehlstellen erkannt werden, durch Erhöhung der Bestrahlungstemperatur realisieren liesse. Mit der richtigen Temperatur und der geeigneten Position der Fehlpaarung innerhalb der Sequenz sollte sich für bestimmte Anwendungen das System so anpassen lassen, dass eine Analyse möglich wird. Für eine höhere Empfindlichkeit des Systems müssen betrachtet man die Lösung andere Markierungen z.B. Fluorophore eingesetzt werden. Die Betrachtung der Festphase für eine Anwendung als Teststreifen muss noch weiter untersucht werden. Wie liesse sich so ein System effektiv bestrahlen? Wie gross muss die Beladung der Festphase sein, um einen eindeutige Unterscheidung zu erkennen? Für weitere Arbeiten bleiben nicht nur offene Fragen, die das Analysensystem direkt betreffen, sondern auch Fragen allgemeiner Art, die sich während dieser Arbeit ergaben. Zum Beispiel was für eine Wechselwirkung genau zwischen **DR1** und der DNS besteht?

Experimenteller Teil

10 Geräte und Materialien

10.1 Verwendete Geräte und Materialien

| | |
|---|---|
| Anlage für <i>nanopur</i> Wasser | <i>Barnstead</i> , ultrapure water system |
| Bestrahlungsapparatur | <i>Oriel</i> , 68810 |
| Bestrahlungslampe | <i>Osram</i> , HBO 500 W/2 |
| Dialysefilter | <i>Millipore</i> , Porengrösse 0.025 μm , Durchmesser 13 mm |
| Digitale Photokamera (zum Mikroskop) | <i>OLYMPUS</i> Camera Camedia C-3000 Zoom |
| DNS-Synthesizer | <i>PerSeptive Biosystems</i> , Expedite |
| Festphase zur Immobilisierung | <i>Pharmacia Biotech AB</i> , Thiopropyl Sephrose 6B |
| Festphasen für Oligonukleotidsynthese | <i>Eurogentec</i> , CPG 500 Å |
| Gelelektrophoreseapparatur (PAGE) | <i>Life Technologies</i> , Model V15-17 |
| HPLC | <i>Waters</i> , Alliance 2690 Separations Modul, 2680 Dual Mode Detector |
| Küvetten (Bestrahlung) | <i>Semadeni</i> , PMMA |
| Küvetten (Quantifizierung) | <i>Hellma</i> , Quarz |
| Lyophilisator | <i>Savant</i> , Speed Vac Plus |
| MALDI-ToF-Massenspektrometer | <i>Applied Biosystems</i> , Voyager DE PRO |
| Mikroküvette | <i>Hellma</i> , Traycell |
| Mikroskop | <i>OLYMPUS</i> Mikroskop SZX12 |
| NAP TM -Säulen | <i>Amersham Biosciences</i> , NAP TM -25 und NAP TM -5 Säulen |
| Netzteil für Gelelektrophorese | <i>Pharmacia Biotech</i> , Electrophoresis Power Supply EPS 500 |
| NMR | <i>Bruker</i> DPX-400 |
| Pipetten | <i>Gilson</i> , Pipetman (200 μL & 1 mL) <i>Socorex</i> , (10 μL) |
| RP18- Säule | <i>Merck</i> , Lichrospher 100, 250-4 (5 μm) und Lichrospher 100, 250-10 (10 μm) |
| Säulen für DNS-Synthese | <i>Eurogentec</i> , leere Synthesensäulen (1 μM & 15 μM) |
| Steilkanten-Filter für Bestrahlungen (<i>cut-off</i>) | <i>Schott</i> , 360 nm |

| | |
|---|--|
| Temperaturregler für Schmelzpunkt-messungen | <i>Perkin-Elmer</i> , PTP-6-Temperaturregler |
| Thermoshaker | <i>Eppendorf</i> , Modelle: compact, comfort, 5436 |
| UV-Gerät | <i>Perkin-Elmer</i> , Lambda Bio 40 |
| Vortexer | <i>Scientific Industries</i> , Vortex-Genie 2 |
| Zentrifugen | <i>Stratagene</i> , PicoFuge <i>Eppendorf</i> , Centrifuge 5415 D |
| Zentrifugenfilter | <i>Sigma</i> , SpinX 500 μ L, 0.45 μ m, Zelluloseacetat |

10.2 Verwendete Lösungsmittel und Chemikalien

10.2.1 Allgemeine Chemikalien

Die für Pufferlösungen oder Synthese verwendeten Chemikalien wurden bei *Fluka*, *Acros* und *Aldrich* in den entsprechenden Qualitäten bestellt.

10.2.2 Chemikalien zur DNS-Synthese

Die Reagenzien zur DNS-Synthese, Phosphoramidite und modifizierte Festphasen wurden bei der Firma *Eurogentec* bestellt.

10.2.3 HPLC-Laufmittel

Für RP18-HPLC wurde Wasser aus einer *Nanopur*-Anlage verwendet, die Stammlösung TEAA-Puffer (1 M) wurde bei *Fluka* bestellt und Acetonitril wurde in HPLC-Qualität von *Merck* oder *Romil* verwendet.

10.3 Oligonukleotide

Oligonukleotide, welche nicht mit 5'-Nitrophenylthymidin **1** und/oder Dispers Rot 1 **11** modifiziert wurden, wurden teilweise bei der Firma *Microsynth* PAGE-, bzw. HPLC gereinigt bestellt. Die Oligonukleotide wurden nach Erhalt noch einmal per RP18-HPLC gereinigt und anschliessend mittels MALDI-ToF-MS charakterisiert.

Die übrigen Oligonukleotide wurden mit Hilfe eines DNA Synthesizers an fester Phase hergestellt. Die Reinigung dieser Oligonukleotide erfolgte unter Verwendung von PAGE und/oder RP18-HPLC, anschliessende Charakterisierung erfolgte ebenfalls mittels MALDI-ToF-MS.

10.4 Pufferlösungen

TEAA-Laufmittel: 0.1 M TEAA + 0.1 % CH₃CN

Immobilisierungs-Puffer: 370 mM NaOAc, 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 4.4 (eingestellt mit AcOH)

Reduktions-Puffer: 100 mM DTT, 40 mM Tris, 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.3

Cap-Lösung 1: 60 mM S-(2-Thiopyridyl)-2-mercaptoethanol **19**, 40 mM MES, 40 mM MgCl₂, 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA

Cap-Lösung 2: 200 mM S-(2-Thiopyridyl)-2-mercaptoethanol **19** in Ethanol

Phosphat-Puffer 1: 10 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.0

Phosphat-Puffer 2: 10 mM KH₂PO₄, 0.5 M NaCl, pH 7.0

Lade-Puffer (PAGE) 800 µl Formamid, 20 µl 0.5 M EDTA pH 8.0, 180 µl H₂O, 0.5 M EDTA-Lösung pH 8 (eingestellt mit 10 M NaOH)

Elektrolyt-Puffer (10xTBE): 0.9 M Tris, 0.9 M Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8.0

Elektrolyt-Puffer (1xTBE): 90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 0.2 mM EDTA, pH 8.0

10.5 Übersicht über verwendete DNS-Sequenzen

Tabelle 15: Übersicht über die verwendeten DNS-Sequenzen. ϵ in [$\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$], MW in [g mol^{-1}] angegeben; a) Synthesen direkt auf der Festphase durchgeführt. b) wurden als externe Kalibrierungsstandards für MALDI-ToF-MS verwendet, berechnete Masse gleich gemessene Masse. In den Sequenzen sind ausser den Modifikationen die *mismatch* Positionen in den Gegensträngen fett hervorgehoben.

| Name | Sequenz (5'--> 3') | ϵ | MW _{ber} | MW _{gem} |
|------|--|------------|-------------------|-------------------|
| ON1A | CGT AGC TAG ATT CGA ATC GTA p-(CH ₂) ₃ -SS-(CH ₂) ₃ -OH | 208 530 | 6689.9 | 6687.8 |
| ON1B | CGT AGC TAG ATT CGA ATC GTA p-(CH ₂) ₃ -SSPy | 215 946 | 6708.4 | 6710.0 |
| ON1C | CGT AGC TAG ATT CGA ATC GTA p-(CH ₂) ₃ -SH | 208 530 | 6599.4 | |
| ON2 | CGT AGC TAG AT TNO ₂ T CGA ATC GTA | 208 530 | 6566.4 | 6566.0 |
| ON3A | HO-(CH ₂) ₆ -SS-(CH ₂) ₆ -pCGT AGC TAG ATT CGA ATC GTA | 208 530 | 6773.7 | 6770.1 |
| ON3B | Py-SS-(CH ₂) ₆ -pCGT AGC TAG ATT CGA ATC GTA | 215 946 | 6750.7 | 6748.8 |
| ON3C | SH-(CH ₂) ₆ -pCGT AGC TAG ATT CGA ATC GTA | 208 530 | 6641.6 | 6645.0 |
| ON4A | HO-(CH ₂) ₆ -SS -(CH ₂) ₆ -pCAG TTC ATC GTT ACG TNO ₂ CT AAG GTC TTG CAT G | 288 360 | 9941.8 | 9927.2 |
| ON4B | Py-SS-(CH ₂) ₆ -pCAG TTC ATC GTT ACG TNO ₂ CT AAG GTC TTG CAT G | 295 776 | 9918.8 | 9922.7 |
| ON4C | SH-(CH ₂) ₆ -pCAG TTC ATC GTT ACG TNO ₂ CT AAG GTC TTG CAT G | 288 360 | 9809.7 | |
| ON5A | CGT AGC TAG ATT CGA ATC GTA p-O(C ₂ H ₄ O) ₃ -PO ₂ -O-(CH ₂) ₃ - SS-(CH ₂) ₃ -OH | 208 530 | 6901.8 | 6897.0 |
| ON5B | CGT AGC TAG ATT CGA ATC GTA p-O(C ₂ H ₄ O) ₃ -PO ₂ -O-(CH ₂) ₃ -SSPy | 215 946 | 6920.3 | 6920.9 |
| ON5C | CGT AGC TAG ATT CGA ATC GTA p-O(C ₂ H ₄ O) ₃ -PO ₂ -O-(CH ₂) ₃ -SH | 208 530 | 6811.3 | |
| ON6A | DR1 -pCGT AGC TAG ATT CGA ATC GTA p-O(C ₂ H ₄ O) ₃ -PO ₂ -O-(CH ₂) ₃ - SS-(CH ₂) ₃ -OH | 217 330 | 7278.2 | 7273.4 |
| ON6B | DR1 -pCGT AGC TAG ATT CGA ATC GTA p-O(C ₂ H ₄ O) ₃ -PO ₂ -O-(CH ₂) ₃ -SSPy | 224 746 | 7296.7 | 7292.3 |
| ON6C | DR1 -pCGT AGC TAG ATT CGA ATC GTA p-O(C ₂ H ₄ O) ₃ -PO ₂ -O-(CH ₂) ₃ -SH | 217 330 | 7187.7 | |
| ON7 | DR1 -pCGT AGC TAG ATT CGA ATC GTA | 217 330 | 6821.7 | 6818.4 |
| ON8A | DR1 -pCGT AGC TAG AT TNO ₂ T CGA ATC GTA p-O(C ₂ H ₄ O) ₃ -PO ₂ -O-(CH ₂) ₃ - SS-(CH ₂) ₃ -OH | 217 330 | 7399.0 | 7395.0 |

Fortsetzung der Tabelle 15:

| | | | | |
|--------------|---|---------|--------|--------|
| ON8B | DR1 -pCGT AGC TAG ATNO₂T CGA ATC GTAp-O(C ₂ H ₄ O) ₃ -PO ₂ -O-(CH ₂) ₃ -SSPy | 224 746 | 7418.5 | 7416.9 |
| ON8C | DR1 -pCGT AGC TAG ATNO₂T CGA ATC GTAp-O(C ₂ H ₄ O) ₃ -PO ₂ -O-(CH ₂) ₃ -SH | 217 330 | 7308.5 | |
| ON9 | DR1 -pCGT AGC TAG ATNO₂T CGA ATC GTA | 217 330 | 6942.3 | 6940.5 |
| ON10A | CGT AGC TAG ATNO₂T CGA ATC GTAp-O(C ₂ H ₄ O) ₃ -PO ₂ -O-(CH ₂) ₃ -SS-(CH ₂) ₃ -OH | 208 530 | 7023.0 | 7021.0 |
| ON10B | CGT AGC TAG ATNO₂T CGA ATC GTAp-O(C ₂ H ₄ O) ₃ -PO ₂ -O-(CH ₂) ₃ -SSPy | 215 946 | 7042.5 | 7044.0 |
| ON10C | CGT AGC TAG ATNO₂T CGA ATC GTAp-O(C ₂ H ₄ O) ₃ -PO ₂ -O-(CH ₂) ₃ -SH | 208 530 | 6932.5 | |
| ON11A | DR1 -pCGT AGC TAG ATNO₂T CGA ATC GTAp-(CH ₂) ₃ -SS-(CH ₂) ₃ -OH | 217 330 | 7187.0 | 7185.0 |
| ON11B | DR1 -pCGT AGC TAG ATNO₂T CGA ATC GTAp-(CH ₂) ₃ -SSPy | 224 746 | 7206.5 | 7205.5 |
| ON11C | DR1 -pCGT AGC TAG ATNO₂T CGA ATC GTAp-(CH ₂) ₃ -SH | 217 330 | 7096.5 | |
| ON12 | DR1 -pCGT AGC TAG Ap | 110 410 | 3508.1 | 3507.3 |
| ON13 | TAC GAT TCG AAT CTA GCT ACG | 204 840 | 6405.3 | 6400.4 |
| ON14 | CAG TTC ATC GTT ACG TCT AAG GTC TTG CAT G | 288 360 | 9492.4 | 9492.2 |
| ON15 | CAT GCA AGA CCT TAG ACG TAA CGA TGA ACT G | 318 510 | 9537.5 | 8530.6 |
| ON16 | CAT GCA AGA CAT TAG ACG TAC CGA TGA ACT G | 318 510 | 9537.5 | 9539.0 |
| ON17 | CAT GCC AGA CAT TAG ACG TAC CGA TTA ACT G | 308 790 | 9488.4 | 9484.3 |
| ON18 | CAG TTC ATC GTT ACGp | 138 420 | 4623.0 | 4619.2 |
| ON19 | pCTA AGG TCT TGC ATG | 142 110 | 4663.1 | 4662.0 |
| ON20 | CGT AGC TAG ATT CGA ATC GTA | 208 530 | 6445.4 | 6441.7 |
| ON21 | CGT AGC TAG Ap | 101 610 | 3132.1 | 3182.8 |
| ON22 | pTCG AAT CGT A | 99 090 | 3107.8 | 3109.0 |
| ON23 | TAC GAT TCG AGT CTA GCT ACG | 201 330 | 6421.3 | 6418.8 |
| ON24 | TAC GAT TAG AAT CGA GCT ACG | 214 560 | 6454.4 | 6451.9 |
| ON28 | TTT TTT TTT TT | 86 130 | 3284.2 | 3282.0 |

Fortsetzung der Tabelle 15:

| | | | | |
|-------------|---|---------|--------|--------|
| ON29 | TTT TTT ACG ATT CGA GTC TAG CTA CGT TTT T | 279 630 | 9463.3 | 8462.4 |
| ON30 | TTT TTT ACG ATT AGA ATC GAG CTA CGT TTT T | 292 860 | 9496.4 | 9493.5 |
| ON31 | TTT TTT ACG ATT CGA ATC TAG CTA CGT TTT T | 283 140 | 9447.3 | 9448.0 |
| ON32 | CCC CCp | 33300 | 1463.9 | 1470.4 |
| ON33 | CCC Cp | 26640 | 1174.7 | 1177.7 |
| ON34 | CCCp | 19980 | 885.5 | 887.4 |
| ON35 | TTT TTT TTT Tp | 78300 | 3060.0 | 3055.6 |
| ON36 | TTT TTT TTTp | 70470 | 2755.8 | 2754.9 |
| ON37 | ACG ATT CGA ATC TAG CTA C | 186 660 | 5771.9 | 5769.5 |
| ON38 | CGA TTC GAA TCT AGC TA | 166 140 | 5169.5 | 5167.9 |
| ON39 | TAC GAT TCG AAC GTA GCT ACG | 207 360 | 6430.3 | 6426.0 |
| ON40 | TAC GAT TCG AAT GGA GCT ACG | 211 050 | 6470.4 | 6468.0 |
| ON41 | TAC GAT TCG AAT GTA GCT ACA | 212 040 | 6429.4 | 6422.0 |
| ON42 | TAC GAT TAG AAT GTA GCT ACG | 215 730 | 6469.4 | 6466.0 |
| ON43 | TAC GAC TCG AAT GTA GCT ACG | 207 360 | 6430.3 | 6426.0 |
| ON44 | TAC GAT TCG AAC CTA GCT ACG | 203 670 | 6390.3 | 6391.0 |
| ON45 | TAC GAT TCG AAT CGA GCT ACG | 207 360 | 6430.3 | 6427.3 |
| ON46 | TAC GAT TCG AAT CAA GCT ACG | 210 870 | 6414.3 | 6408.0 |
| ON47 | TAC GAT TCG AAT CTA TCT ACG | 202 320 | 6380.3 | 6379.0 |
| ON48 | TAC GAT TCG AAT CTA GCT ACA | 208 350 | 6389.3 | 6387.0 |
| ON49 | TAC GAT TCG TAT CTA GCT ACG | 198 810 | 6396.3 | 6394.5 |
| ON50 | TAC GAT TAG AAT CTA GCT ACG | 212 040 | 6429.4 | 6426.3 |
| ON51 | TAC GAC TCG AAT CTA GCT ACG | 203 670 | 6390.3 | 6385.0 |

Fortsetzung der Tabelle 15:

| | | | | |
|-------------|---|-----------------|-----------------|-----------------|
| ON52 | TAC CAT TCG AAT CTA GCT ACG | 201 150 | 6365.3 | 6369.0 |
| ON53 | GAC GAT TCG AAT CTA GCT ACG | 207 360 | 6430.3 | 6428.0 |
| ON54 | pTCT AGC TAC G | 91 890 | 3083.0 | 3082.0 |
| ON56 | CCC CCC CC | 53 280 | 2251.5 | 2249.5 |
| ON57 | TAC GAT TCG Ap | 99 090 | 3107.0 | |
| ON58 | CCC CCC CCC C | 66 600 | 2829.9 | 2837 |
| ON59 | TAC GAT TCG AAT CCA GCT ACG | 203 670 | 6390.3 | 6387.0 |
| ON60 | TAC GAT TGG AAT CTA GCT ACG | 208 530 | 6445.4 | 6440.0 |
| ON61 | TAC GAT TTG AAT CTA GCT ACG | 206 010 | 6420.3 | 6416.0 |
| ON62 | TAC GAT TCG AAT CTA CCT ACG | 201 150 | 6365.3 | 6365.0 |
| ON63 | GAT TCG AAT CTA GCT | 145 620 | 4567.1 | 4562.5 |
| ON64 | TAC GAT TCG AAT CCA GCT ACG | 203 670 | 6390.3 | 6387.0 |
| ON65 | TAC GAT TGG AAT CTA GCT ACG | 208 530 | 6445.4 | 6440.0 |
| ON66 | TAC GAT TTG AAT CTA GCT ACG | 206 010 | 6420.3 | 6416.0 |
| ON67 | TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT | 258 390 | 9976.6 | - ^{b)} |
| ON68 | TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT | 156 600 | 6022.0 | - ^{b)} |
| ON69 | TTT TTT TTT TTT TT | 109 620 | 4196.8 | - ^{b)} |
| ON70 | TTT TTT TTT T | 78 300 | 2980.0 | - ^{b)} |
| ON71 | TTT TTT | 46 980 | 1763.2 | - ^{b)} |
| SP11 | CCC CCTNO₂ CCC CC-O(CH ₂) ₃ CONH-CPG | - ^{a)} | - ^{a)} | |
| SP12 | CGT AGC TAG ATNO₂T CGA ATC GTA - O(CH ₂) ₃ CONH-CPG | - ^{a)} | - ^{a)} | |
| SP13 | TTT TTT TTT TTNO₂T TTT TTT TTT-O(CH ₂) ₃ CONH- CPG | - ^{a)} | - ^{a)} | |
| SP14 | CCC CCTNO₂ CCC CC-O(CH ₂) ₃ CONH-Tenta | - ^{a)} | - ^{a)} | |
| SP15 | CGT AGC TAG ATNO₂T CGA ATC GTA - O(CH ₂) ₃ CONH-Tenta | - ^{a)} | - ^{a)} | |
| SP16 | TTT TTT TTT TTNO₂T TTT TTT TTT-O(CH ₂) ₃ CONH- Tenta | - ^{a)} | - ^{a)} | |

Zur Berechnung wurden folgende Massen verwendet:

A: 249.2 g/mol

G: 265.2 g/mol

T: 240.2 g/mol

C: 225.2 g/mol

TNO₂: 361.2 g/mol

Phosphat: 64.0 g/mol

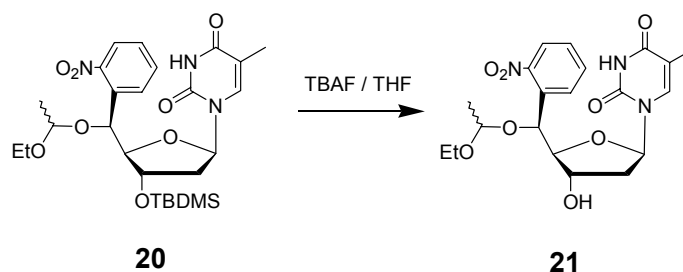
DR1: 313.1 g/mol

11 Synthese der DNS-Synthesizer kompatiblen Bausteine

11.1 Synthese des Phosphoramidites von 5'-C-(2-Nitrophenyl)-thymidin

Hier dargestellt ist die Synthese des S-Diastereomers. Die Synthesen des R-Diastereomers und des racemischen Edukts sind analog durchgeführt worden.

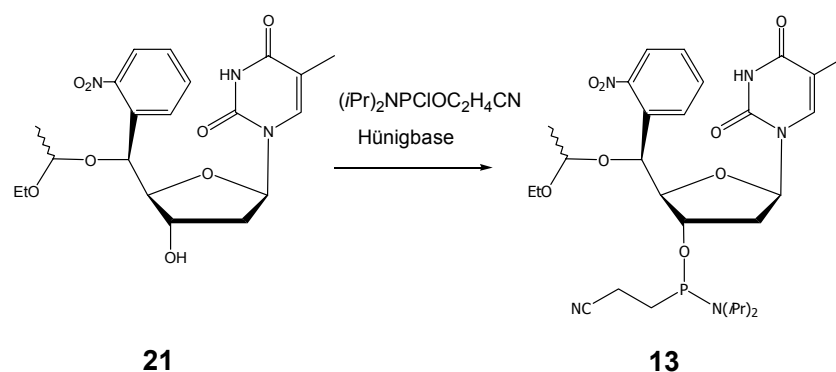
11.1.1 5'-O-(Ethoxyethyl)-(5'S)-C-(2-nitrophenyl)-thymidin



Das geschützte Nukleosid **20** (200 mg, 0.36 mmol) wurde unter Argonatmosphäre in absolutem THF (15 mL) gelöst und mit 1 M TBAF/THF-Lösung (1.82 mL, 1.82 mmol) versetzt. Nach 30 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von Wasser beendet. Nach Extraktion mit AcOEt wurden die vereinigten organischen Phasen mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Reinigung mittels Flashchromatographie (AcOEt) ergab 136.6 mg (86 %) des 3'-Alkohols **21** als blass-gelben Schaum.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.96, 7.81, 7.76, 7.65, 7.74 (m, 5 H, C(6)-H, CH_{arom}), 6.38 (m, 1 H, C(1')-H), 5.69 (d, 1 H, ³J = 2.1 Hz, C(5')-H_a), 5.56 (d, 1 H, ³J = 2.5 Hz, C(5')-H_b), 4.81, 4.65 (2m, 1 H, C(3')-H_{a,b}), 4.48 (m, 1H, CH_{a,b}O₂), 4.27, 4.21 (m, 1 H, C(4')-H_{a,b}), 3.49 (m, 2 H, CH₂O), 2.30 (m, 2 H, C(2')-H), 1.98, 1.97 (2d, 3 H, ³J = 1.2 Hz, C(5)-CH_{3a,b}), 1.38, 1.34 (2 d, 3 H, ³J = 5.2 Hz, CH₃-CH₂O_{a,b}), 1.17, 0.88 (2t, 3 H, ³J = 7.0 Hz, CH₃-CH₂O_{a,b}).

11.1.2 5'-O-(Ethoxyethyl)-(5'R/S)-C-(2-nitrophenyl)-thymidin 3'-O-(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidit

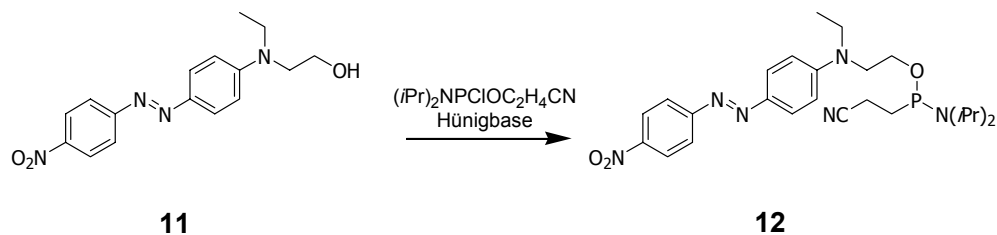


Der 3'-Alkohol **21** (167.0 mg, 0.38 mmol) wurde unter Argonatmosphäre in absolutem Dichlormethan (10 mL) gelöst und unter Eiskühlung mit Hünigbase (308 μ L, 1.91 mmol) gefolgt von 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylaminochlorophosphit (243 μ L, 1.15 mmol) versetzt. Danach wurde die Lösung zwei Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde direkt mittels Flashchromatographie (AcOEt/Pentan 2:1, +NEt₃ (pH 7)) gereinigt. Man erhielt 145.1 mg (60 %) des Phosphoramidits **13** als blass-gelben Schaum.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.14 (s, 1 H, N-H), 7.96, 7.91, 7.81, 7.63, 7.46 (m, 5 H, C(6)-H, CH_{arom}), 6.42, 6.33 (m, 1 H, C(1')-H), 5.65 (m, 1 H, C(5')-H_a), 5.48 (m, 1 H, C(5')-H_b), 4.82 - 4.70 (m, 1 H, C(3')-H_{a,b}), 4.57, 4.43, 4.39, 4.32 (m, 2 H, CHO₂, C(4')-H), 3.70 - 3.15 (m, 8 H, CH₃CH₂O, CH₂CH₂O, 2 CHCH₃, CH₂CN), 2.43, 2.24 (2m, 2 H, C(2')-H), 2.02, 2.01 (2d, 3 H, ³J = 1.2 Hz, C(5)-CH_{3a,b}), 1.37, 1.29 - 1.15, (m, 18 H, CH₃-CH₂O, CH₃-CH, (CH₃)₂CH).

³¹P-NMR (164 MHz, CDCl₃): δ = 146.7, 146.5, 146.3, 145.9 (P^{III}).

11.2 Dispers Rot 1-*O*-(2-cyanoethyl)-*N,N*-diisopropylphosphoramidit



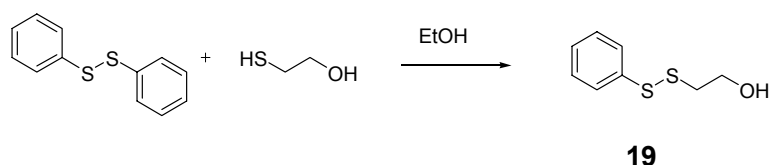
Der Farbstoff Dispers Rot 1 **11** (33.3 mg, 0.11 mmol) wurde unter Argonatmosphäre in absolutem Dichlormethan (2.5 mL) gelöst und mit Hünigbase (90.9 μl , 0.53 mmol) gefolgt von 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylaminochlorophosphit (70.0 μl , 0.32 mmol) versetzt. Die Lösung wurde mindestens zwei Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde direkt mittels Flashchromatographie (AcOEt/Pentan 1:2) gereinigt. Man erhielt 43 mg (78 %) **12** als roten amorphen Feststoff.

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3): $\delta = 8.30$ (d, $^3J = 9.1$ Hz, 2 H, CH_{arom}), 7.91 (d, 2 H, $^3J = 9.3$ Hz CH_{arom}), 7.88 (d, 2 H, $^3J = 9.1$ Hz CH_{arom}), 6.77 (d, $^3J = 9.3$ Hz, 2 H, CH_{arom}), $3.90 - 3.60$ (m, 10 H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-N}$, $\text{N-(CH}_2\text{)}_2\text{-}$, 2 N $\text{CH(CH}_3\text{)}$, $\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$), 2.60 (t, $^3J = 6.3$ Hz, 2 H, $\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$), 1.25 (t, $^3J = 7.1$ Hz, 3 H, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-N}$), 1.18 (d, $^3J = 7.2$ Hz, 6 H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH-N}$), 1.16 (d, $^3J = 6.8$ Hz, 6 H, $(\text{CH}_3)_2\text{CH-N}$).

$^{31}\text{P-NMR}$ (164 MHz, CDCl_3): $\delta = 145.2$ (P^{III}).

12 Synthese des Capreagenzes⁵³

12.1 S-(2-Thiopyridyl)-2-mercaptoethanol



2,2'-Dithiopyridin (1.37 g, 6.22 mmol) wurde unter Argonatmosphäre in absolutem, mit Argon deoxygeniertem Ethanol (2.0 mL) gelöst. Nach langsamer Zugabe von Mercaptoethanol (0.41 mL, 5.93 mmol) in deoxygeniertem Ethanol (2.0 mL), wurde die Reaktionsmischung 2 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde unter vermindertem Druck von einem Teil des Lösungsmittels befreit und anschließend mittels Flashchromatographie (AcOEt/Pentan 1:3 200 mL, AcOEt/Pentan 1:2 300 mL, AcOEt/Pentan 1:1 400 mL) gereinigt. Man erhielt 0.60 g (54 %) **19** als blass-gelbes Öl.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.46 (m, 1 H, C(6)), 7.55 (m, 1 H, C(4)), 7.39 (m, 1 H, C(3)), 7.11 (m, 1 H, C(5)), 5.35 (s, 1 H, -OH), 3.77 (t, ³J = 5.3 Hz, 2 H, C(2')), 2.91 (t, ³J = 5.3 Hz, 2 H, C(1')).

¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 159.0 (1 C, C(2)), 149.6 (1 C, C(6)), 136.8 (1 C, C(4)), 121.7 (1 C, C(5)), 121.3 (1 C, C(3)), 58.2 (1 C, C(2')), 42.5 (1 C, C(1')).

ESI-MS: 187.3 [M⁺]

13 Oligonukleotide

13.1 Oligonukleotidsynthesen

Die Synthesen der Oligonukleotide wurden nach der Phosphoramiditmethode an fester Phase durchgeführt.¹⁵ Die Synthesen wurden unter Verwendung eines DNS-Synthesizers von *Applied Biosystems (Expedite 8909)* durchgeführt. Für die Einführung der verschiedenen Modifikationen in die Oligonukleotide wurden entweder unterschiedliche feste Phasen (3'-Modifikation) oder Phosphoramidite der entsprechenden Modifikationen (5'- oder interne Modifikation) verwendet. Neben den Standardmethoden zur Kupplung einzelner Monomere wurden auch veränderte Kupplungszyklen verwendet. *Tabelle 16* zeigt eine Übersicht über die verwendeten Modifikationen und die verwendeten Bedingungen. Standardphosphoramidite der natürlichen Basen wurden als 0.1 M Lösungen in Acetonitril verwendet. Die Synthesen wurden sowohl nach der TritylON-, als auch nach der TritylOFF-Prozedur durchgeführt. Die Kupplung des Farbstoffes **11** wurde ausserhalb des Synthesizers von Hand durchgeführt. Nach Beendigung der DNS-Synthesen wurden die festen Phasen mit 1 mL konzentrierter wässriger Ammoniaklösung (1 mL, 8 h, 55 °C) versetzt. Nach der Inkubation wurden die Proben für 20 Minuten im Tiefkühlfach gelagert, lyophilisiert und in *nanopur*-Wasser gelöst. Anschliessend wurden die Stränge mittels RP18-HPLC oder PAGE aufgereinigt (siehe *Kap. 13.2*) und mittels MALDI-ToF-MS charakterisiert (siehe *Kap. 13.3*).

Tabelle 16: Übersicht über die verwendeten Modifikationen und die Bedingungen für deren Einbau in Oligonukleotide.

| Modifikation (Amidit) | Kupplungszeit / [min.] | Entschützungszeit / [min.] | Bemerkungen |
|----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|--|
| T(NO ₂) (13) | 15 | 10 | Verlängerung der Kupplungszeit für die nachfolgende Base c = 0.05 – 0.1 M |
| 5'-thio (14) | Standard | Standard | TritylOFF Synthesen c = 0.067 M |
| 3'-thioSP (16) | -- | Standard | Direkt auf fester Phase eingesetzt c = 0.067 M |
| Spacer9 (15) | 15 | Standard | c = 0.067 M |
| Dispers Rot 1 (12) | 10 | -- | Wurde von Hand gekuppelt c = 0.05 – 0.1 M |

Kupplung von Hand: Nachdem die Säule aus dem Synthesizer entfernt wurde (TritylOFF-Synthese) wurden folgende Schritte durchgeführt:

Spülen: CH₃CN (2 mL), Aktivatorlösung (1 mL)

Kupplung: 10 min. mit Monomerlösung (0.3 - 0.5 mL) und Aktivatorlösung (0.5 mL) inkubiert. Zugabe von 0.5 mL frischer Aktivatorlösung.

Spülen: CH₃CN

Oxidation: Oxidations-Lösung (2 mL)

Spülen: CH₃CN (5 mL)

Trocknen: Argon (10 min.)

Aktivatorlösung: 0.45 M Tetrazol in CH₃CN; Oxidationslösung: 0.02 M Iod in THF/Pyridin/H₂O. (Standard-Lösungen für die automatisierte DNS-Synthese.)

13.2 Reinigung der Oligonukleotide

13.2.1 RP18-HPLC

Die Oligonukleotide wurden mittels RP18-HPLC (Laufmittel: A: TEAA-Puffer, B: CH₃CN) gereinigt, wobei unterschiedliche Lösemittelgradienten verwendet wurden. Hier aufgelistet sind auch Programme, die für Analysen verwendet wurden.

- Programm1: In 40 min. von 0 % auf 40 % B, Flussrate: 1 mL/min., $\lambda = 260$ nm, Säulentemperatur: 55 °C.
- Programm2: In 20 min. von 4 % auf 9 % B, Flussrate: 1 mL/min., $\lambda = 260$ nm, Säulentemperatur: 55 °C.
- Programm3: 13 % B für 4 min., dann in 21 min. auf 20 % B, Flussrate: 3 mL/min., $\lambda = 260$ nm, Säulentemperatur: 55 °C.
- Programm4: In 18 min. von 7 % auf 10 % B, Flussrate: 1 mL/min., $\lambda = 260$ nm, Säulentemperatur: 55 °C.
- Programm5: 15 % B für 4 min., dann in 25 min. auf 40 % B, Flussrate: 1 mL/min., $\lambda = 260$ nm, Säulentemperatur: 55 °C.
- Programm6: 15 % B für 4 min., dann in 25 min. auf 40 % B, Flussrate: 1 mL/min., $\lambda = 480$ nm, Säulentemperatur: 55 °C.
- Programm7: 6 % B für 2 min., dann in 40 min. auf 20 % B, Flussrate: 1 mL/min., $\lambda = 260$ nm, Säulentemperatur: 55 °C.
- Programm8: 6 % B für 2 min., dann in 40 min. auf 13 % B, Flussrate: 1 mL/min., $\lambda = 260$ nm, Säulentemperatur: 55 °C.
- Programm9: 13 % B für 4 min., dann in 6 min. auf 15 % und weiter in 5 min. auf 50 % B, Flussrate: 1 mL/min., $\lambda = 260$ nm, Säulentemperatur: 55 °C.
- Programm10: 6 % B für 3 min., dann in 17 min. auf 17 % B und weiter in 5 min. auf 25 % B, Flussrate: 1 mL/min., $\lambda = 260$ nm, Säulentemperatur: 55 °C.
- Programm11: 9 % B für 4 min., dann in 12.36 min. auf 17 % B und weiter in 4.5 min. auf 21% B, Flussrate: 1 mL/min., $\lambda = 260$ nm, Säulentemperatur: 55 °C.
- Programm12: In 20 min. von 4 % auf 9 % B, dann in 5 min. 50 % B, Flussrate: 1 mL/min., $\lambda = 260$ nm, Säulentemperatur: 55 °C.
- Programm13: 6 % B für 3 min., dann in 40 min. auf 25 % B und weiter in 5 min. auf 50 % B, Flussrate: 1 mL/min., $\lambda = 260$ nm / 343 nm, Säulentemperatur: 55 °C.

- Programm14: 8 % B für 3 min. dann in 15 min. auf 16 % B, Flussrate: 1 mL/min.,
 $\lambda = 260$ nm, Säulentemperatur: 55 °C.
- Programm15: 8 % B für 2 min. dann in 23 min. auf 14 % B, Flussrate: 1 mL/min.,
 $\lambda = 260$ nm, Säulentemperatur: 55 °C.
- Programm16: In 20 min. von 6 % auf 10.5 % B, Flussrate: 1 mL/min., $\lambda = 260$ nm,
Säulentemperatur: 55 °C.
- Programm17: 7.5 % B für 20 min., dann in 5 min. auf 12.8 % B und weiter in 5 min.
auf 50 % B, Flussrate: 1 mL/min., $\lambda = 260$ nm / 343 nm,
Säulentemperatur: 55 °C.
- Programm18: 6 % B für 3 min., dann in 17 min. auf 17 % B und weiter in 17 min. auf
25 % B, Flussrate: 3 mL/min., $\lambda = 260$ nm, Säulentemperatur: 55 °C.
- Programm19: 10 % B für 5 min., dann in 15 min. auf 15 % B und weiter in 5 min. auf
50 % B, Flussrate: 1 mL/min., $\lambda = 260$ nm, Säulentemperatur: 55 °C.
- Programm20: 4 % B für 3 min., dann in 20 min. auf 9 % B, Flussrate: 3 mL/min.,
 $\lambda = 260$ nm, Säulentemperatur: 55 °C.
- Programm21: 13 % B für 4 min., dann in 21 min. auf 20 % B, Flussrate: 1 mL/min.,
 $\lambda = 260$ nm, Säulentemperatur: 55 °C.
- Programm22: 8 % B für 3 min., dann in 18 min. auf 12 % B und weiter in 4 min. auf
50 % B, Flussrate: 1 mL/min., $\lambda = 260$ nm, Säulentemperatur: 55 °C.
- Programm23: 8 % B für 3 min., dann in 30 min. auf 13 %, Flussrate: 1 mL/min.,
 $\lambda = 260$ nm, Säulentemperatur: 55 °C.
- Programm24: In 18 min. von 7 % auf 10 %, Flussrate: 1 mL/min., $\lambda = 260$ nm,
Säulentemperatur: 55 °C.
- Programm25: 6 % B, für 3 min., dann in 17 min. auf 17 % B und weiter in 17 min. auf
25 % B, Flussrate: 1 mL/min., $\lambda = 260$ nm / 343 nm, Säulentemperatur:
55 °C.
- Programm26: 6 % B für 3 min., dann in 32 min. auf 13 % B und weiter in 3 min. auf
50 % B, Flussrate: 1 mL/min., $\lambda = 260$ nm, Säulentemperatur: 55 °C.
- Programm27: In 20 min. von 6 % auf 11 % B, Flussrate: 1 mL/min., $\lambda = 260$ nm,
Säulentemperatur: 55 °C.
- Programm28: In 20 min. von 4 % auf 7 % B, Flussrate: 1 mL/min., $\lambda = 260$ nm,
Säulentemperatur: 55 °C.

Bei allen Programmen war eine Spülphase integriert (50 oder 100 % B). Danach wurde wieder auf die Anfangsbedingungen eingestellt.

Tabelle 17 zeigt, welche Retentionszeiten für verschiedene Oligonukleotide bei diversen Gradientenprogrammen resultierten.

Tabelle 17: Übersicht: Oligonukleotid – Gradientenprogramm – Retentionszeit.

| Oligonukleotide – | Programm | Retentionszeit [min.] |
|-----------------------------|-----------------|----------------------------------|
| Unmodifizierte | | |
| polyC8 | 2 | 9 – 10 |
| | 16 | 10 – 12 |
| polyC10 | 12 | 11 – 12 |
| polyT11 | 7 | 15 – 17 |
| | 27 | 17 – 18 |
| | 22 | 13 – 15 |
| 11mer | 26 | 14 – 18 |
| 21mer | 22 | 11 – 13 |
| | 7 | 13 – 20 |
| | 8 | 22 – 29 |
| | 17 | 24 – 25 |
| | 20 | 14 – 15 |
| 31mer | 18 | 14 – 16 |
| | 7 | 13 – 17 |
| | 7 | 18 – 21 |
| T5-21mer-T5 | 7 | 18 – 21 |
| 21mer(TritylON) | 5 | 10 – 12 |
| Einfach modifizierte | | |
| 10mer-Phosphate | 16 | 4 – 5 |
| | 28 | 3 – 4 |
| | 7 | 14 – 15 |
| 15mer-Phosphate | 7 | 9 – 12 |
| 21merSSR | 1 | 15 – 17 |
| | 10 | 16 – 18 |
| 21merSSR(TritylON) | 5 | 15 – 16 |
| T11-SSR | 2 | 21 – 24 |
| | 24 | 15 – 18 |

Fortsetzung Tabelle 17:

| | | |
|--|----|---------|
| PySS-21mer | 25 | 19 – 21 |
| | 21 | 10 – 13 |
| | 3 | 5 – 6 |
| RSS-21mer | 25 | 25 – 27 |
| | 14 | 23 – 25 |
| 21merSSPy | 21 | 5 – 7 |
| | 9 | 5 – 6 |
| DR1-21mer | 6 | 12 – 14 |
| 21mer (TNO₂) (TritylON) | 5 | 16 – 17 |
| 21mer (TNO₂) | 7 | 21 – 24 |
| Zweifach modifizierte | | |
| RSS31mer(TNO₂) | 25 | 25 – 27 |
| | 19 | 24 – 25 |
| RSS-31mer(TNO₂) (TritylON) | 5 | 6 – 8 |
| PySS-31mer(TNO₂) | 21 | 9 – 12 |
| | 13 | 24 – 28 |
| 21mer- 15 -SSPy | 13 | 19 – 25 |
| 21mer- 15 -SSR | 25 | 18 – 19 |
| | 11 | 13 – 15 |
| DR1-21mer(TNO₂) | 6 | 14 – 16 |
| DR1-10mer-Phosphat | 6 | 13 – 15 |
| Dreifach modifizierte | | |
| DR1-21mer-15-SSR | 5 | 15 – 16 |
| | 6 | 14 – 16 |
| DR1-21mer-15-SSPy | 6 | 14 – 16 |
| 21mer- 15 -SSR(TNO₂) | 25 | 17 – 20 |
| 21mer- 15 -SSPy(TNO₂) | 21 | 8 – 9 |
| DR1-21mer-SSPy(TNO₂) | 6 | 15 – 18 |
| DR1-21mer-SSR(TNO₂) | 6 | 14 – 16 |
| Vierfach modifizierte | | |
| DR1-21mer-15-SSR(TNO₂) | 6 | 13 – 16 |
| DR1-21mer-15-SSPy(TNO₂) | 6 | 15 – 18 |

13.2.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

13.2.2.1 Herstellen eines 20 %igen denaturierenden Polyacrylamid Gels

Zur Herstellung eines 20 %igen denaturierenden Polyacrylamid Gels (17 x 15 cm) wurden 21.0 g Harnstoff in 22.2 mL einer 40 %igen Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (19:1), 5 mL 10xTBE und 1.25 mL Formamid bei 40 °C gelöst. Nachdem die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde die Polymerisation durch Zugabe von 25 µL TEMED und 26.0 mg Ammoniumpersulfat (gelöst in 800 µL H₂O) initiiert. Anschliessend wurde das Gel mit einer Schichtdicke von 1.5 mm gegossen. Nach vollständiger Polymerisation (1 h) und einstündigem Equilibrieren (250 V) konnte das Gel verwendet werden.

13.2.2.2 PAGE-Reinigung

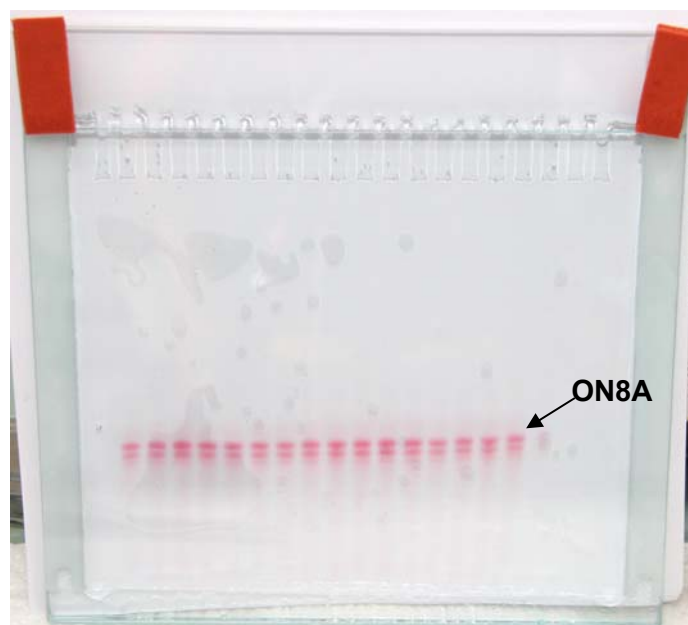


Abbildung 50: PAGE-Reinigung von ON8A.

Einige Dispers Rot 1-modifizierte Oligonukleotide, welche nicht ausschliesslich mittels RP18-HPLC gereinigt werden konnten, wurden in einem ersten Schritt unter Zuhilfenahme von PAGE gereinigt. Dazu wurden die hochkonzentrierten Proben mit gleichem Volumen Lade-Puffer gemischt, 2 min. lang bei 90 °C geschüttelt und anschliessend auf das präparierte Gel (15 x 17 cm x 1.5 mm) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 130 V für mind. 15 h durchgeführt (Elektrolyt: 1xTBE). Anschliessend wurden die gewünschten Banden aus dem Gel geschnitten (*Abbildung 50*). Die Gelausschnitte

wurden zerstossen und mit 1 mL H₂O versetzt. Um die Oligonukleotide herauszulösen, wurden die Proben bei 40 °C mehrere Stunden lang geschüttelt. Nach Filtration wurden die Proben lyophilisiert und waren zum Entsalzen bereit (*Kap. 13.2.3*).

13.2.3 Entsalzen von Oligonukleotiden

13.2.3.1 Entsalzen über NAP-Säulen (Grössenausschlusschromatographie)

Um grössere Mengen von Oligonukleotiden zu entsalzen, wurden NAP-5-Säulen für Probenvolumina ≤ 0.5 mL bzw. NAP-25-Säulen für Volumina ≤ 2.5 mL verwendet. Nachdem die Säulen mit 10 mL bzw. 25 mL Wasser gewaschen worden waren, wurden die Proben aufgetragen und falls notwendig auf 0.5 mL bzw. 2.5 mL ergänzt. Die entsalzten Oligonukleotide wurden mit 1 mL (3.5 mL) Wasser eluiert und lyophilisiert.

13.2.3.2 Entsalzen über Dialysefilter

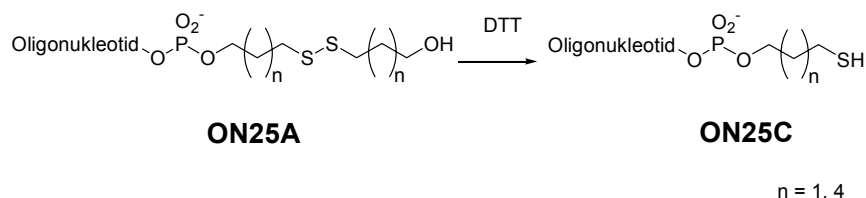
Um kleinere Oligonukleotidproben für MALDI-ToF Messungen zu entsalzen, wurden Dialysefilter verwendet. Dazu wurde 1 μ L der Oligonukleotidlösung während mindestens 20 min. über einem Dialysefilter entsalzt.

13.3 Massenbestimmung (MALDI-ToF-MS)

Auf der Probenplatte wurden 1 μ L einer entsalzten Probenlösung mit 1 μ L Matrix-Lösung (0.5 M 2,6-Dihydroxyacetophenon und 0.3 M Ammoniumtartrat in Wasser/Acetonitril 3:1) gemischt. Nach der Kristallisation an Luft erfolgte die Messung. (Detektion negativer Ionen, Beschleunigungsspannung: 25 kV, Verzögerungszeit 350 ns, $\lambda = 337$ nm, Frequenz 20 Hz). Zur Kalibrierung wurden die Oligonukleotide **ON67-71** als externe Standards verwendet.

13.4 Postsynthetische Modifikationen von Oligonukleotiden

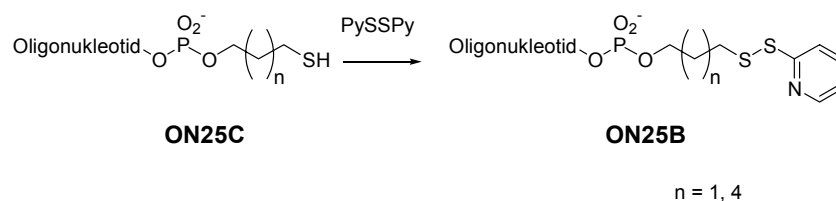
13.4.1 Reduktion von disulfidmodifizierten Oligonukleotiden mit Dithiothreitol



Alkyldisulfidmodifizierte Oligonukleotide **ON25A** wurden in 500 μL Reduktionspuffer aufgenommen und 30 min. lang bei 30 $^\circ\text{C}$ inkubiert. Anschliessend wurde die Lösung 6 x mit je 600 μL EtOAc extrahiert. Zur Reaktionskontrolle wurde jeweils 1 μL der Lösung nach Entsalzung mit MALDI-ToF-MS analysiert.

Die **ON25C** enthaltenden Lösungen wurden direkt weiter eingesetzt.

13.4.2 Einführung der Thiopyridylfunktionalität an thiomodifizierte Oligonukleotide



Zu einer Lösung, welche frisch reduzierte Thiooligonukleotide **ON25C** enthielt, wurde eine Spatelspitze 2,2'-Dithiodipyridin gegeben und die Lösung wurde 30 min. lang bei 30 $^\circ\text{C}$ gerührt. Anschliessend wurde solange portionsweise mit 600 μL EtOAc extrahiert bis keine Gelbfärbung der organischen Phase mehr zu erkennen war. Zur Reaktionskontrolle wurde jeweils 1 μL der Lösung nach Entsalzung mit MALDI-ToF-MS analysiert.

Die modifizierten Oligonukleotide **ON25B** wurden mittels RP18-HPLC gereinigt.

13.4.3 Manuelle Detritylierung und anschließende Fällung von Oligonukleotiden

Die lyophilisierte HPLC-Fraktion der Oligonukleotide (nach TritylON-Synthese) wurde in 200 μL 80 %iger Essigsäure aufgenommen und 20 min. bei RT geschüttelt. Zur Fällung wurden zu obiger Lösung 50 μL einer 3 M NaOAc-Lösung und 1 mL Isopropylalkohol gegeben. Nach starkem Schütteln wurde die Mischung für 2 h bei $-18\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert und anschliessend für 15 min. bei 16'000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert. Der Rückstand wurde zur weiteren Reinigung in *nanopur*-Wasser gelöst.

13.5 Quantifizierung von Oligonukleotiden

Zur Quantifizierung von Oligonukleotiden wurden die gereinigten Oligonukleotide in 1.00 mL *nanopur*-Wasser gelöst. Nachdem die Absorption (AU) der Referenz (Wasser) bei 260 nm auf Null gesetzt worden war, wurde die Absorption von 50 μL der Stammlösung (verdünnt auf 1 mL) bestimmt. Unter Verwendung des Beer-Lambert-Gesetzes (*Formel 1*) konnte die Menge der Oligonukleotide berechnet werden. Die verwendeten molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten ϵ_{260} wurden basierend auf Inkrementen⁵⁴ berechnet (*Tabelle 18*).

Wurden Thiopyridyl- und/oder Dispers Rot 1-modifizierte Oligonukleotide quantifiziert, addierte man zu den Extinktionskoeffizienten der Oligonukleotide die Werte für die Modifikationen (eigene Messungen: siehe *Kapitel 13.6*).

$$AU = \epsilon \cdot c \cdot d$$

Formel 1: Beer-Lambert Gesetz

Tabelle 18: Inkremente mit der Berechnungsgrundlage.

| Base | $\epsilon_{i,260}$ [$\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$] |
|-------------|--|
| A | 15 400 |
| G | 11 500 |
| C | 7 400 |
| T | 8 700 |
| DR1- | 8 800 |
| PyS- | 7 416 |

$$\epsilon_{260} = \sum_{i=1}^n \epsilon_{i,260} \cdot 0.9$$

13.6 Bestimmung von Extinktionskoeffizienten

13.6.1 Dispers Rot 1-modifizierte Oligonukleotide in H₂O

Die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten bei 520 nm erfolgte über eine Verdünnungsreihe. Drei Stammlösungen wurden verwendet: **ON7** ($1.9 \cdot 10^{-4}$ M) und zwei von **ON6B** ($6.7 \cdot 10^{-5}$ M; $4.3 \cdot 10^{-5}$ M). Mit den gemessenen Absorptionen, den Konzentrationen und einer Schichtdicke von 1 cm wurde der Extinktionskoeffizient nach *Formel 1* berechnet.

Es ergaben sich folgende Extinktionskoeffizienten (gerundet).

| | Oligonukleotid | $\epsilon_{520} / [\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}]$ |
|---|-----------------------------------|---|
| 1 | ON6B (Stammlösung 1) | 30 260 |
| 2 | ON6B (Stammlösung 2) | 28 270 |
| 3 | ON7 | 29 620 |
| | DR1-Oligonukleotid (allg.) | 29 380 |

13.6.2 2-Mercaptopyridin in H₂O

Die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten bei 260 nm erfolgte über eine Verdünnungsreihe. Es wurden zwei Stammlösungen von 2-Mercaptopyridin verwendet ($3.7 \cdot 10^{-2}$ M, $1.6 \cdot 10^{-2}$ M). Mit den gemessenen Absorptionen, den Konzentrationen und einer Schichtdicke von 1 cm wurde der Extinktionskoeffizient nach *Formel 1* berechnet.

Es ergab sich folgender Extinktionskoeffizient.

$$\epsilon_{260} = 7\,416 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

13.6.3 Farbstoffderivat 18 in H₂O

Die Bestimmung der Extinktionskoeffizienten bei 260 nm und 480 nm erfolgte über eine Verdünnungsreihe. Es wurde eine Stammlösung von **18** verwendet ($6.9 \cdot 10^{-5}$ M). Mit den gemessenen Absorptionen, den Konzentrationen und einer Schichtdicke von 1 cm wurde der Extinktionskoeffizient nach *Formel 1* berechnet.

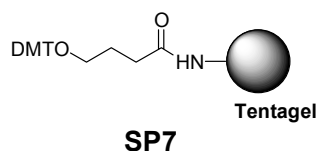
Es ergaben sich folgende Extinktionskoeffizienten:

$$\epsilon_{260} = 8\,828 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \text{ (verwendet wurde der stark gerundete Wert 8\,800)}$$

$$\epsilon_{480} = 21\,341 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

14 Aufbau des Analysensystems

14.1.1 Mehrstufiger Aufbau auf Tentagel



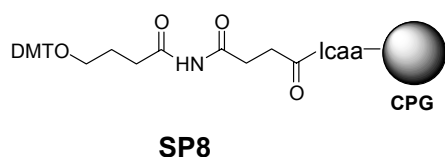
Die vormodifizierte feste Phase⁵⁵ Tentagel **SP7** wurde in leere Synthesäulen abgefüllt. Die Füllmenge wurde ausgehend von der Oberflächenbeladung so gewählt, dass ein 1.0 μM Ansatz durchgeführt werden konnte. Auf die festen Phasen wurde mit Hilfe des DNS-Synthesizers eine DNS-Sequenz synthetisiert. Alle Synthesen wurden nach der TritylON-Methode durchgeführt.

Tabelle 19: Mehrstufig dargestellte Systeme auf SP7 (Tentagel).

| | SP | Sequenz | Beladung [nmol/mg] |
|---|-------------|---|-----------------------|
| 1 | SP14 | CCC CC TNO ₂ CCCp-SP | 18.71 |
| 2 | SP12 | CGT AGC TAG A TNO ₂ T CGA ATC GTAp-SP | 13.93 |
| 3 | SP16 | TTT TTT TTT T TNO ₂ T TTT TTT TTTp-SP | 8.09 |

14.2 Mehrstufiger Aufbau

14.2.1 Mehrstufiger Aufbau auf CPG



Die vormodifizierte feste Phase⁵⁵ CPG **SP8** wurde in leere Synthesäulen abgefüllt. Die Füllmenge wurde ausgehend von der Oberflächenbeladung so gewählt, dass ein

1.0 μM Ansatz durchgeführt werden konnte. Auf die festen Phasen wurde mit Hilfe des DNS-Synthesizers eine DNS-Sequenz synthetisiert. Alle Synthesen wurden nach der TritylON-Methode durchgeführt.

Tabelle 20: Mehrstufig dargestellte Systeme auf SP8 (CPG).

| | SP | Sequenz | Beladung [nmol/mg] |
|---|-------------|---|-------------------------------|
| 1 | SP11 | CCC CCTNO ₂ CCCp-SP | 0.93 |
| 2 | SP15 | CGT AGC TAG ATNO ₂ T CGA ATC GTAp-SP | 0.77 |
| 3 | SP13 | TTT TTT TTT TTNO ₂ T TTT TTT TTTp-SP | 1.43 |

14.2.2 Bestimmung von Beladungsdichten der festen Phasen CPG und Tentagel

Zur Ladungsbestimmung sowohl der vormodifizierten als auch der Oligonukleotid modifizierten festen Phasen (*Kapitel 14.2.1 und 14.1.1*) wurde ein Teil der festen Phasen mit 1 mL einer 3 %igen CCl₃COOH/CH₂Cl₂-Lösung versetzt. Für unterschiedliche Volumina (jeweils auf ein Endvolumen von 1 mL verdünnt) wurden bei 504 nm die Absorptionen bestimmt. Unter Verwendung des Beer-Lambert-Gesetzes wurde so die Menge an abgespaltenem 4,4'-Dimethoxytritylkation DMT⁺ bestimmt. Als Extinktionskoeffizient für DMT⁺ in CH₂Cl₂ wurde folgender Wert verwendet:⁵⁶

$$\epsilon_{504} = 72\,678 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

14.3 Einstufiger Aufbau

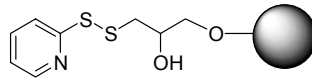
Der einstufige Aufbau für 5'-modifizierte und 3'-modifizierte Oligonukleotide auf Sepharose® 6B wurde nach der unten angeführten Methode durchgeführt.

Tabelle 21 gibt eine Übersicht über die dargestellten Systeme.

Tabelle 21: Durch Disulfidaustausch modifizierte Festphasensysteme. a) die Stränge wurden nicht vollständig gereinigt eingesetzt, b) die Stränge wurden als 1:1 Gemische eingesetzt.

| | SP | Oligonukleotid | Beladung [nmol/mg] | Immobilisierungs- ausbeute [%] |
|----|--------------|------------------------------------|-------------------------------|---|
| 1 | SP18A | ON3B | 0.35 | 100 |
| 2 | SP18B | ON3B | 0.61 | 100 |
| 3 | SP18C | ON3B | 0.34 | 85 |
| 4 | SP18D | ON3B | 0.41 | 93 |
| 5 | SP19A | ON4B | 0.22 | 100 |
| 6 | SP19B | ON4B | 0.41 | 100 |
| 7 | SP2 | ON5B | 0.47 | 100 |
| 8 | SP3A | ON6B | 0.78 | 100 |
| 9 | SP3B | ON6B | 0.29 | 100 |
| 10 | SP20A | ON8B^{a)} | 0.42 | 100 |
| 11 | SP20B | ON8B^{a)} | 0.41 | 100 |
| 12 | SP21 | ON10B/ON10B-15^{b)} | 0.40 | 100 |
| 13 | SP4 | ON1B | 0.43 | 100 |
| 14 | SP20C | ON8B/ON11B^{b)} | 0.42 | 100 |
| 15 | SP22 | ON11B | 0.39 | 100 |
| 16 | SP23A | ON8B | 0.35 | 100 |
| 17 | SP23B | ON8B | 0.36 | 100 |
| 18 | SP23C | ON8B | 0.37 | 100 |
| 19 | SP23D | ON8B | 0.38 | 100 |

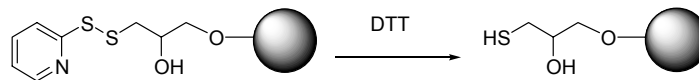
14.3.1 Einstufiger Aufbau auf Thiopropyl Sepharose® 6B



SP26

Um Oligonukleotide auf der Thiopropyl-Sepharose **SP26** zu immobilisieren, wurden diese als pyridylmodifizierte Disulfide eingesetzt (*Kapitel 13.4.2*). Alle in diesem Kapitel verwendeten Lösungen oder Lösemittel wurden deoxygeniert. Dazu wurde mindestens 20 min. lang Argon durch die Lösungen geleitet.

14.3.1.1 Reduktion der festen Phase

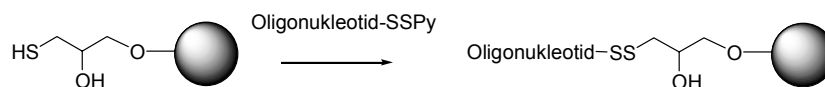


SP26

SP27

Die feste Phase **SP26** wurde nach der Einwaage in Zentrifugenfilter mit *nanopur* H₂O portionenweise gewaschen, bei Klumpenbildung wurde die Suspension im Ultraschallbad homogenisiert. Vor der Reduktion wurde die gewaschene Sepharose 2 min. lang im Filter bei 16000 rpm zentrifugiert. Nach Zugabe von 500 µL Reduktions-Puffer (*Kapitel 10.4*) wurde die Suspension 30 min. lang bei 30 °C und 1000 rpm geschüttelt. Nach Filtration wurde die Sepharose zweimal mit je 400 µL Immobilisierungs-Puffer gewaschen und 2 min. lang bei 16000 rpm im Filter zentrifugiert. Die so präparierte Sepharose **SP27** wurde nun weiter eingesetzt.

14.3.1.2 Immobilisierung von Oligonukleotiden

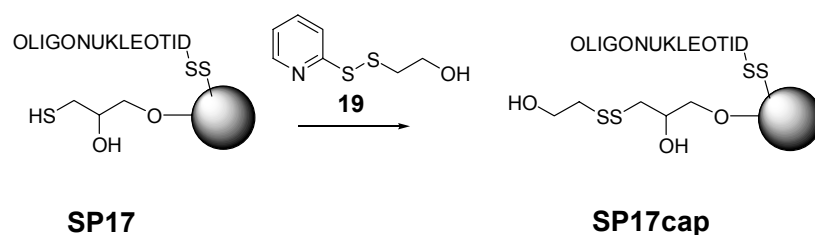


SP27

SP17

Die Oligonukleotid-Proben, bestehend aus den pyridylmodifizierten Disulfidoligonukleotiden und einem Standardoligonukleotid, wurden in 400 μL Immobilisierungs-Puffer gelöst und zusammen mit der Sepharose **SP27** eine Stunde lang bei 35 °C und 1000 rpm geschüttelt.

14.3.1.3 Capping der freien Thiole auf der festen Phase



Zur Immobilisierungsmischung wurden 100 μL der Cap-Lösung 1 gegeben. Dieses Gemisch wurde eine Stunde lang bei 35 °C und 1000 rpm geschüttelt und anschliessend filtriert. Zum vollständigen Capping der Sepharose wurden zusätzlich folgende Schritte durchgeführt: Cap-Lösung 1 (400 μL , 1 h, 35 °C, 1000 rpm), Cap-Lösung 2 (400 μL , Schraubdeckelgefäss, 2 h, 70 °C, 1000 rpm), Cap-Lösung 1 (300 μL , 5 min., 85 °C, 1000 rpm). Zwischen den Schritten wurde jeweils filtriert.

Anschliessend wurde die Sepharose noch gewaschen (2 x 400 μL EtOH, 1 x 400 μL EtOH/NaCl-Lsg.. (0.5 M). 1:1, 3 x 400 μL NaCl-Lsg.. (0.5 M)). Die feste Phase wurde entweder in trockenem Zustand oder in NaCl-Lsg.. (0.5 M) im Kühlschrank aufbewahrt.

15 Experimente in Lösung

15.1 Bestrahlung TNO₂-modifizierter Oligonukleotide

Die Bestrahlungen von Einzelsträngen wurden in 1 mL Plastikkuvetten durchgeführt. Die Proben wurden in 200 µL Phosphatpuffer 1 gelöst. Unter Verwendung eines 360 nm Steilkantenfilters wurden die Proben 10 min. lang bei ca. 10 °C (Kryostattemperatur: 0 °C, siehe *Kap. 18.3*) und 500 W bestrahlt. Die Bestrahlungslösungen wurden filtriert und mittels RP18-HPLC (Programm13) und MALDI-ToF-MS analysiert.

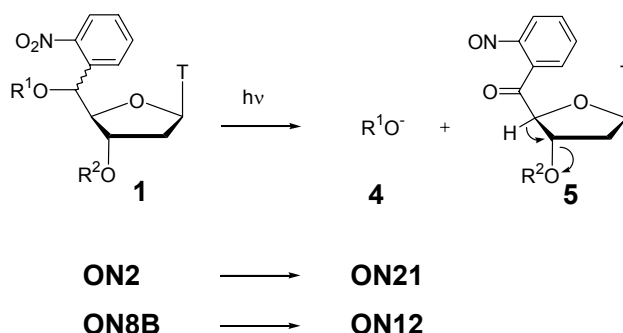


Tabelle 22: In Lösung bestrahlte Oligonukleotide: a) 4 entspricht ON21 für ON2, und ON12 für ON8B.

| | Sequenz | 4 ^{a)} [%] |
|---|---------|---------------------|
| 1 | ON2 | 84 |
| 2 | ON8B | 88 |

15.2 DNS-Schmelzkurven der Doppelstränge in Lösung

Die Messung von Schmelzkurven erfolgte bei 260 nm in einer 1 mL-Quarzküvette. Dabei wurde die Absorption als Funktion der Temperatur gemessen. Die Experimente wurden in 1 mL Phosphat-Puffer 1 durchgeführt. Die Stränge wurden in einem Verhältnis von 1 zu 1 eingesetzt. Die eingesetzte Menge betrug immer ~ 1 nmol. Vor der Messung wurden die Doppelstrangproben auf 90 °C erwärmt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt (annealing). Die angegebenen Schmelzpunkte sind Mittelwerte von mindestens einer Aufwärm- und einer Abkühlkurve (ein Zyklus).

Tabelle 23: Übersicht über die gemessenen Doppelstrangsysteme. a) kein Schmelzpunkt im Messbereich; Messbereiche: b) 25 – 80 °C; c) 15 – 80 °C; d) 25 – 85 °C; e) 15 – 90 °C; f) 15 – 85 °C.

| | Sequenz | | T_m / [°C] |
|----|--|-----------------------|-----------------------------|
| 1 | TACGATTCGAATCTAGCTACG ATGCTAAGCTTAGATCGATGC | ON13/ON20 | 62.6 ^{b)} |
| 2 | TACGATTCGA—A—TCTAGCTACG ATGCTAAGCTp pAGATCGATGC | ON13/ON21/ON22 | 32.2 ^{c)} |
| 3 | TACGATTCGA— G —TCTAGCTACG ATGCTAAGCTp pAGATCGATGC | ON23/ON21/ON22 | 31.9 ^{b)} |
| 4 | TACGATT AGA —A—TC G AGCTACG ATGCTA A GCTp pAG A T A CGATGC | ON24/ON21/ON22 | -- ^{a), c)} |
| 5 | TACGATTCGA—A—TCTAGCTACG ATGCTAAGCTp | ON13/ON22 | 33.7 ^{c)} |
| 6 | TACGATTCGA—A—TCTAGCTACG pAGATCGATGC | ON13/ON21 | 33.7 ^{f)} |
| 7 | TACGATTCGA—A—TCTAGCTACG pAGATCGATGC-p DR1 | ON13/ON12 | 35.8 ^{e)} |
| 8 | TACGATT AGA —A—TC G AGCTACG pAG A T A CGATGC | ON24/ON21 | -- ^{a), f)} |
| 9 | TACGATT AGA —A—TC G AGCTACG ATGCTA A GCTp | ON24/ON22 | -- ^{a), f)} |
| 10 | TACGATTCGA—A—TC G AGCTACG pAG A T A CGATGC-p DR1 | ON24/ON12 | -- ^{a), f)} |
| 11 | TACGATTCGAATCTAGCTACG ATGCTAAGCTTAGATCGATGC-p DR1 | ON13/ON7 | 66.4 ^{e)} |
| 12 | TACGATTCGA—A—TCTAGCTACG PySS- Sp9p -ATGCTAAGCT TNO ₂ AGATCGATGC-p DR1 | ON13/ON8B | 65.8 ^{f)} |
| 13 | TACGATTCGA—A—TCTAGCTACG ATGCTAAGCT TNO ₂ AGATCGATGC | ON13/ON2 | 51.6 ^{f)} |
| 14 | CATGCAAGACCTTAGACGTAACGATGAACTG GTACGTTCTGGAATCTGCATTGCTACTTGAC | ON15/ON14 | 70.0 ^{d)} |
| 15 | CATGCAAGACCTTAG—A—CGTAACGATGAACTG GTACGTTCTGGAATCp pGCATTGCTACTTGAC | ON15/ON18/ON19 | 52.3 ^{d)} |

Fortsetzung der Tabelle 23:

| | | | |
|----|--|-----------------------|--------------------|
| 16 | CATGCAAGACATTAG—A—CGTACCGATGAACTG GTACGTTCTGGAATCp pGCATTGCTACTTGAC | ON16/ON18/ON19 | 43.2 ^{d)} |
| 17 | CATGCCAGACATTAG—A—CGTACCGATTAAGT GTACGTTCTGGAATCp pGCATTGCTACTTGAC | ON17/ON18/ON19 | 29.5 ^{d)} |
| 18 | CATGCAAGACATTAGACGTACCGATGAACTG GTACGTTCTGGAATCTGCATTGCTACTTGAC | ON16/ON14 | 61.5 ^{d)} |
| 19 | CATGCCAGACATTAGACGTACCGATTAAGT GTACGTTCTGGAATCTGCATTGCTACTTGAC | ON17/ON14 | 50.0 ^{d)} |

15.3 UV/Vis-Messungen DR1-modifizierter Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden in 1 ml *nanopur*-H₂O gelöst. Die UV/Vis-Spektren wurden in einer Quarzküvette aufgenommen (200 – 700 nm).

Folgende Stränge wurden vermessen:

Tabelle 24: Oligonukleotide, von denen UV/Vis-Spektren gemessen wurden, a) Absorptionsmaximum des Farbstoffes in Oligonukleotiden.

| | Oligonukleotid | T / [°C] | λ_{\max} / [nm] ^{a)} |
|---|------------------|----------|---------------------------------------|
| 1 | ON7 | RT | 520 |
| 2 | ON6B | RT | 520 |
| 3 | ON8B | RT | 518 |
| 4 | ON12 | RT | 518 |
| | | 20 | 518 |
| | | 90 | 504 |
| 5 | ON12/ON13 | 10 | 518 |
| | | 25 | 512 |
| | | 30 | 514 |
| | | 35 | 518 |
| | | 40 | 518 |
| | | 50 | 514 |

16 Experimente an fester Phase

16.1 Hybridisierung an fester Phase

Die feste Phase wurde zweimal mit *nanopur* H₂O (400 µL) gewaschen, zwei Minuten lang bei 16000 rpm im Filter zentrifugiert und eingewogen. Die eingesetzte Menge wurde über die Beladungen der einzelnen festen Phasen berechnet. Die Gegenstränge wurden mit dem internen Standard **ON28** in 400 µL Phosphatpuffer 1 gelöst, mit der festen Phase im Thermoshaker erwärmt und wieder auf Raumtemperatur T_{end} gebracht. *Tabelle 25* gibt eine Übersicht. Die Proben wurden filtriert und die Lösungen wurden mittels RP18-HPLC-Analysiert (Programm8). Die festen Phasen wurden als Doppelstrangproben direkt für die Bestrahlungsexperimente verwendet.

Tabelle 25: Hybridisierungsexperimente: a) Proben wurden über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt, b) Ergebnisse in Phosphat-Puffer 2.

| | Erwärmen | | Abkühlen | | Ausbeuten | |
|----|----------|---------------|--------------|-----------|----------------------------|----------------------------------|
| | T [°C] | t / [min.] | Schütteln | t / [h] | T _{end} / [°C] | % |
| 1 | 80 | - | - | 13 – 18 h | RT | 50 |
| 2 | 80 | 15 | - | Langsam | RT | 90 |
| 3 | 80 | 15 | - | 3 | 30 | ? |
| 4 | 85 | 20 | - | 13 – 18 h | RT | > 100 |
| 5 | 85 | 10 | - | 13 – 18 h | 6 ^{a)} | 50 – 120 |
| 6 | 85 | 30 | 1000 rpm | | | |
| | | | 500 rpm | 2.5 | 75 | |
| | | | 500 rpm | 1 | 25 | 60 – 100 |
| 7 | 85 | 30 | 300 rpm | 4 | 30 | ? |
| 8 | 85 | - | 900-1000 rpm | 5 | 30 | 60 – 100 |
| 9 | 85 | 15 | 900-1000 rpm | 1.25 | 30 | 50 – 110 70-135 ^{b)} |
| 10 | 85 | 5 | 1000 rpm | ? | RT | 70 – 150 |
| 11 | 85 | - | 900-1000 rpm | 2.5 | 30 | 80 – 150 |
| 12 | 85 | - | 900-1000 rpm | ? | RT | 90 – 150 |
| 13 | 85 | - | 900-1000 rpm | 1 | 34 | 150 – 200 |

Fortsetzung der Tabelle 25:

| | | | | | | |
|----|----|---|--------------|-----|----|----------|
| 14 | 85 | - | 900-1000 rpm | ? | 35 | 20 – 100 |
| 15 | 85 | - | 900-1000 rpm | 1.5 | RT | 45 – 100 |
| 16 | 85 | 5 | 1000 rpm | 1.5 | 30 | 75 – 150 |

16.2 DNS Schmelzkurven der Doppelstränge an fester Phase

Die Messung von Schmelzkurven erfolgte bei 260 nm in einer 3 mL-Quarzküvette. Dabei wurde die Absorption als Funktion der Temperatur gemessen. Die Experimente wurden in 1 mL Phosphat-Puffer 1 gerührt (Rührgeschwindigkeit 6) und ungerührt durchgeführt. Das Verhältnis der Stränge ergab sich jeweils aus den zugehörigen Hybridisierungsexperimenten (*Kap. 16.1*). Die angegebenen Schmelzpunkte sind Mittelwerte von mindestens einer Aufwärm- und einer Abkühlkurve (ein Zyklus). Die Messkurven der gerührten Experimente wurden mit *Origin6.0* bearbeitet (sigmoidaler Fit, 1. Ableitung).

Tabelle 26: Übersicht über die gemessenen Schmelzpunkte an fester Phase, gemessen in Phosphat-Puffer 1: a) ungerührt; b) gerührt; c) in Phosphat-Puffer 2; Messbereiche: d) 20 – 90 °C; e) 30 – 90 °C; f) 15 – 90 °C; g) 15 – 85 °C; h) 15 – 50 °C.

| | Sequenz | | T_m / [°C] |
|---|--|-------------------|--|
| 1 | TACGATTCGAATCTAGCTACG ATGCTAAGCTTAGATCGATGC-SS-SP | ON13/SP15 | 73.2 ^{a), d)} |
| 2 | TACGATTCGAATCTAGCTACG SP-SS- Sp9 pATGCTAAGCTTAGATCGATGC | ON13/SP2 | 68.5 ^{a), e)} 61.2 ^{b), e)} |
| 3 | TACGATTCGAATCTAGCTACG SP-SS-pATGCTAAGCTTAGATCGATGC | ON13/SP4 | 58.6 ^{b), f)} |
| 4 | TACGATTCGAATCTAGCTACG SP-SS- Sp9 pATGCTAAGCTTAGATCGATGC-p DR1 | ON13/SP3 | 73.0 ^{a), e)} 63.5 ^{b), e)} 70.5 ^{e), c)} |
| 5 | pTCTAGCTACG SP-SS- 15 -pATGCTAAGCTTAGATCGATGC-p DR1 | ON54/SP3 | 27.0 ^{b), h)} |
| 6 | TACGATTCGA—A—TCTAGCTACG SP-SS- Sp9 p-ATGCTAAGCTT NO₂ AGATCGATGC-p DR1 | ON13/SP23A | 56.9 ^{b), g)} |

16.3 Bestrahlungen an fester Phase

Die Bestrahlungen von Einzel- und Doppelstrangproben wurden in 1 mL-Plastikküvetten durchgeführt. Die Festphasen für Einzelstrangexperimente wurden zweimal mit H₂O (400 µL) gewaschen, für zwei Minuten bei 16000 rpm im Filter zentrifugiert und eingewogen. Die eingesetzte Menge wurde über die Beladungen der einzelnen festen Phasen berechnet. Für Doppelstrangexperimente wurden direkt die Festphasen aus den Hybridisierungsexperimenten verwendet. Die Festphasen wurden in eine Plastikküvette transferiert, mit einem Rührfisch versehen und mit Phosphat-Puffer (1 oder 2) versetzt. Unter Verwendung eines 360 nm Steilkantenfilters wurden die Proben unter Rühren 10 min. lang bei ca. 10 °C (Kryostattemperatur: 0 °C, siehe Kap. 18.3) und 500 W bestrahlt. Die Bestrahlungslösungen wurden filtriert und mittels RP18-HPLC (Programm13) und MALDI-ToF-MS respektive UV/Vis analysiert.

16.4 Wärmebehandlung von Bestrahlungs- und Hybridisierungsproben

Die Festphasen wurden nach den Bestrahlungen oder nach erfolgter Hybridisierung erneut mit Phosphatpuffer versehen, auf 85 °C erwärmt und heiss filtriert. Die Lösungen wurden dann mittels RP18-HPLC (Programm13) und MALDI-ToF-MS respektive UV/Vis-Spektroskopie analysiert.

16.5 Reduktive Abspaltung von Oligonukleotiden

Die Festphasen wurden mit Reduktionspuffer (300 µL) mindestens 20 min. lang bei 35 °C geschüttelt (1000 rpm). Nach der Filtration wurde die Lösung mittels RP18-HPLC und MALDI-ToF-MS analysiert.

17 Analysen

17.1 RP18-HPLC-Analysen

Die Proben wurden direkt über RP18-Säulen analysiert. Die Zuordnung der Produkte erfolgte durch Vergleichen von Retentionszeiten und/oder MALDI-ToF-MS Messungen. Folgende Gradientenprogramme wurden verwendet:

| | |
|-------------------------|------------------|
| Immobilisierungsproben: | Programm13 |
| Hybridisierungsproben: | Programm8 |
| Bestrahlungsproben: | Programm13 |
| hitzebehandelte Proben: | Programm13 und 8 |
| reduktive Abspaltungen: | Programm13 |

17.2 UV/Vis-Analysen

Kleine Mengen der Proben (nach Bestrahlung und Hitzebehandlung) wurden mittels UV/Vis Spektroskopie bei 520 nm vermessen. Dazu wurden aus den filtrierten Lösungen direkt Proben vermessen (4 μL) oder es wurden Proben (50 μL) um den Faktor 10 aufkonzentriert und dann vermessen. Als Referenz wurde Phosphatpuffer 1 oder 10-fach aufkonzentrierter Phosphatpuffer 1 verwendet. Die Quantifizierung erfolgte über die Verwendung des molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten, der für **ON6** und **ON7** in Wasser bestimmt wurde. ($\epsilon_{520} = 29\,380\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$).

17.3 Mikroskopie

Farbstoffoligonukleotid-modifizierte Festphasen wurden in verschiedenen Stadien unter einem Mikroskop untersucht und photographiert.

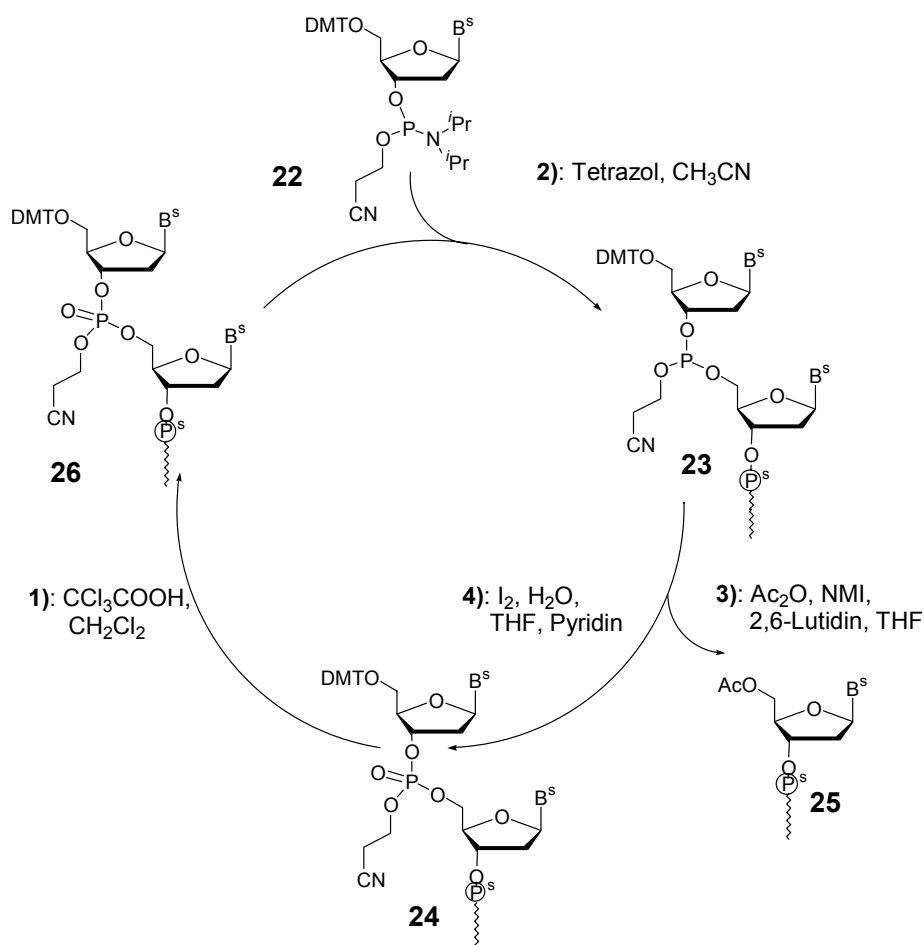
Die Festphasen wurden direkt aus den Lösungen, eingetrocknet oder wieder befeuchtet, auf einem Objektträger photographiert.

Anhang

18 Varia

18.1 Die Phosphoramiditmethode

Die Phosphoramiditmethode sieht den Einsatz von 5'-tritylgeschützten 3'- β -Cyanoethylphosphoramiditen **22** als Bausteine für die Festphasensynthese von Oligonukleotiden vor. Diese Methode ist für die Synthese von längeren Oligonukleotiden (20- bis 200-mere) in kleineren Mengen (40 nmol bis 10 μ mol) geeignet. Der Syntheseyklus setzt sich aus vier Schritten zusammen: 1) Detritylierung: Freisetzen der 5'-Hydroxyfunktion durch Trichloressigsäure; 2) Kupplung: Kuppeln des geschützten Amiditbausteins **22** mit dem (Oligo-)Nukleotid **26**; 3) Maskierung: Schützen überzähliger Hydroxyfunktionen als Acetate **25**; 4) Oxidation: Oxidieren des Phosphorsäureesters **23** mit Iod zum Phosphorsäureester **24** (Schema 17).



Schema 17: Syntheseyklus der Phosphoramiditmethode.

Ist die gewünschte Länge erreicht, wird das Oligonukleotid mit gesättigter Ammoniaklösung (55 °C, 8 h) von der Festphase abgespalten. Gleichzeitig werden mit Ausnahme der Tritylschutzgruppe sämtliche Schutzgruppen entfernt.⁵⁷

18.2 Methode zur Bestimmung der Hybridisierungseffizienz

Die nach den Hybridisierungen erhaltenen HPLC-Chromatogramme wurden folgendermassen bearbeitet. Die Peaks wurden den jeweiligen Oligonukleotiden zugeordnet (MALDI-ToF-MS oder Vergleichen der Retentionszeiten). Die Flächen wurden anhand der Extinktionskoeffizienten gewichtet. Mit dem gewichteten Wert des internen Standards wurde ein Flächenfaktor bestimmt, der zur Berechnung der Restmenge des Gegenstranges verwendet wurde. Die Differenz zur eingesetzten Menge, zusammen mit der auf der Festphase eingesetzten Oligonukleotidmenge, ergibt die Ausbeute für die Hybridisierungen.

18.3 Aktuelle Bestrahlungstemperatur vs. Kryostattemperatur

Durch die Energie der Lampe wird die Bestrahlungslösung erwärmt. Da die Temperatur für die Stabilität der Doppelstränge von Bedeutung ist, wurde die Temperatur der Bestrahlungslösung zu unterschiedlichen Zeiten gemessen. Die Messungen zeigen, dass die Temperatur in der Bestrahlungslösung innerhalb von drei Minuten auf etwa 10 °C ansteigt, wenn der Kryostat auf 0 °C eingestellt wurde. Die Temperatur der Bestrahlungslösung bleibt demnach während der Dauer der Bestrahlung (10 min.) konstant (*Tabelle 27*).

Tabelle 27: Messreihe zur Bestimmung der tatsächlichen Bestrahlungstemperatur bei einer Kryostattemperatur von 0 °C.

| t / [min.] | T _{Start} / [°C] | T _{Ende} / [°C] | ΔT / [°C] |
|------------|---------------------------|--------------------------|-----------|
| 1 | 3.2 | 7.0 | 3.8 |
| 2 | 3.5 | 8.7 | 5.2 |
| 3 | 3.3 | 9.4 | 6.1 |
| 4 | 3.2 | 9.4 | 6.2 |
| 10 | 3.2 | 9.3 | 6.1 |
| 15 | 3.2 | 9.2 | 6.0 |

18.4 Nachweisgrenze für UV/Vis Detektion

Unter Berücksichtigung des Beer-Lambert-Gesetzes und dem Extinktionskoeffizienten von $29\,380\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für **DR1**-modifizierte Oligonukleotide ergibt sich für den Absorptionsbereich von 0.1 bis 1 eine theoretische Konzentrationsspanne von 3.4 bis $34\ \mu\text{M}$ ($d = 1\text{ cm}$). Bei der hier verwendeten Küvette beträgt die Schichtdicke jedoch nur 0.1 cm, was die Konzentrationsspanne um einen Faktor zehn erhöht. Um die Nachweisgrenze zu bestimmen, wurde, von zwei Stammlösungen ausgehend, eine Verdünnungsreihe gemessen. Gemessen wurden Konzentrationen unterhalb dieses Bereiches, um zu sehen wie weit man die Konzentration herabsetzen kann, um noch lineares Verhalten und Reproduzierbarkeit zu erhalten.

Wie *Abbildung 51* zeigt, liegt die Grenze im Bereich $2 - 4\ \mu\text{M}$. Unterhalb von $2\ \mu\text{M}$ ist die Streuung der Messwerte erheblich. Um die Grenze genauer zu bestimmen, müssten die Messungen mehrfach wiederholt werden. Dann könnten auch statistisch relevante Auswertungen durchgeführt werden. Die hier durchgeführten Messungen zeigen, dass die Grenze für die Detektion von **DR1**-modifizierten Oligonukleotiden mittels UV/Vis-Spektroskopie im mikromolaren Bereich liegt. Bei geringeren Konzentrationen sind die Messwerte nicht mehr reproduzierbar.

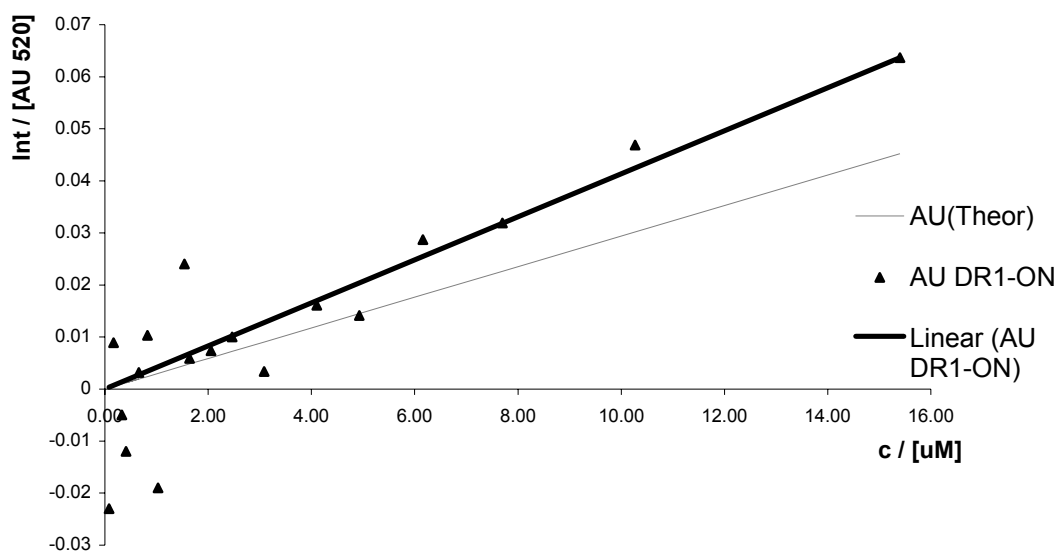


Abbildung 51: UV-Vis Messwerte ($\lambda = 520\text{ nm}$) für ON12 mit Trendlinie und theoretischem Verlauf ($29\,539\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $d = 0.1\text{ cm}$).

18.5 Übersichten über Hybridisierungs- und Bestrahlungsexperimente

Die unten abgebildeten Tabellen geben eine Übersichten über die durchgeführten Hybridisierungs- (Tabelle 28), Bestrahlungs- (Tabelle 29) und Wärme-behandlungsexperimente (Tabelle 30) von einstufig aufgebauten Systemen.

Tabelle 28: Übersichtstabelle zu den durchgeführten und in (Kapitel 6) beschriebenen Hybridisierungsexperimenten; a) Mittelwerte der Hybridisierungsausbeuten bezgl. Oberflächenbeladungen, bestimmt über das Verhältnis von internem Standard zu überschüssigem Gegenstrang mittels RP18-HPLC, b) Anzahl der Werte, die zur Bestimmung der Mittelwerte verwendet wurden.

| Tab. / Abb. | SP | Gegenstränge | Ausbeute / [%] ^{a)} | # Werte ^{a)} |
|-------------------|----------------|---------------|------------------------------|-----------------------|
| <i>Tabelle 8</i> | SP3B | ON13 | 116 | 2 |
| | SP3B | ON13 | 48 | 1 |
| | SP3A | ON13 | 96 | 2 |
| | SP3A | ON13 | 71 | 1 |
| | SP20C | ON13 | 96 | 4 |
| | SP20C | ON13 | 181 | 2 |
| <i>Tabelle 9</i> | SP3B | ON13 | 118 | 4 |
| | SP3A | ON13 | 110 | 4 |
| <i>Tabelle 10</i> | SP20C | ON13 | 96 | 4 |
| | SP22 | ON13 | 71 | 4 |
| | SP23A-C | ON13 | 146 | 7 |
| <i>Tabelle 11</i> | SP22C, SP23A-C | ON13 | 121 | 14 |
| | SP22C, SP23A-C | ON24, ON39-43 | 111 | 32 |
| | SP22C, SP23A-C | ON23, ON44-53 | 108 | 10 |
| <i>Tabelle 12</i> | SP20C | ON13 | 107 | 1 |
| | SP20C | ON29 | 64 | 1 |
| | SP20C | ON13 | 97 | 1 |
| | SP20C | ON30 | 42 | 1 |
| | SP20C | ON23 | 58 | 1 |
| | SP20C | ON31 | 67 | 1 |
| | SP20C | ON24 | 55 | 1 |
| | SP20C | ON31 | 84 | 1 |

Tabelle 29: Übersichtstabelle zu den durchgeführten und in (Kapitel 7) beschriebenen Bestrahlungsexperimenten; a) Für Einzelstrangexperimente wurden keine Gegenstränge eingesetzt, b) Mittelwerte der freigesetzten Menge an ON12 nach der Bestrahlung (Bestrahlungsausbeutenausbeuten) bezgl. der Oberflächenbeladungen, quantifiziert über Flächenfaktoren des externen Standards ON12, die mittels RP18-HPLC bestimmt wurden, c) Anzahl der Werte, die zur Bestimmung der Mittelwerte verwendet wurden, d) freigesetzte Menge ON22.

| Tab. / Abb. | SP | Gegenstrang | Ausbeute / [%]^{b)} | # Werte^{c)} |
|---|-----------------------|-----------------------|------------------------------------|-----------------------------|
| <i>Tabelle 14,</i> <i>Abbildung 38</i> | SP22 | <i>-^{a)}</i> | 35 | 8 |
| | SP20C | <i>-^{a)}</i> | 95 | 3 |
| | SP23A-C | <i>-^{a)}</i> | 98 | 3 |
| <i>Tabelle 14</i> <i>Abbildung 38</i> | SP19 | <i>-^{a)}</i> | 54 ^{d)} | 2 |
| <i>Abbildung 38</i> | SP22 | ON13 | 22 | 4 |
| | SP20C | ON13 | 24 | 6 |
| <i>Abbildung 38</i> | SP23A-C | ON13 | 14 | 6 |
| <i>Abbildung 40</i> | SP23A-C | <i>-^{a)}</i> | 98 | 3 |
| | SP23A-C | ON13 | 14 | 6 |
| | SP23A-C | ON37 | 59 | 2 |
| <i>Abbildung 40</i> | SP23A-C | ON38 | 99 | 2 |
| <i>Abbildung 42</i> | SP23A-C | <i>-^{a)}</i> | 98 | 3 |
| | SP23A-C | ON13 | 14 | 6 |
| <i>Abbildung 42</i> | SP23A-C | ON31 | 8 | 2 |
| <i>Abbildung 44</i> | SP23A-C, SP20C | <i>-^{a)}</i> | 96 | 6 |
| | SP23A-C, SP20C | ON39 | 69 | 2 |
| | SP23A-C, SP20C | ON40 | 91 | 1 |
| | SP23A-C, SP20C | ON41 | 93 | 1 |
| | SP23A-C, SP20C | ON42 | 73 | 1 |
| | SP23A-C, SP20C | ON24 | 81 | 7 |
| | SP23A-C, SP20C | ON43 | 53 | 2 |
| <i>Abbildung 45</i> | SP23A-C, SP20C | <i>-^{a)}</i> | 96 | 6 |
| | SP23A-C, SP20C | ON44 | 17 | 4 |
| | SP23A-C, SP20C | ON45 | 32 | 7 |
| | SP23A-C, SP20C | ON46 | 63 | 1 |
| | SP23A-C, SP20C | ON64 | 40 | 1 |

Fortsetzung der Tabelle 29:

| | | | |
|----------------|------|----|---|
| SP23A-C, SP20C | ON47 | 68 | 2 |
| SP23A-C, SP20C | ON48 | 78 | 3 |
| SP23A-C, SP20C | ON49 | 30 | 5 |
| SP23A-C, SP20C | ON50 | 78 | 7 |
| SP23A-C, SP20C | ON65 | 89 | 1 |
| SP23A-C, SP20C | ON66 | 55 | 1 |
| SP23A-C, SP20C | ON51 | 30 | 2 |
| SP23A-C, SP20C | ON52 | 63 | 2 |
| SP23A-C, SP20C | ON53 | 31 | 3 |

Tabelle 30: Übersichtstabelle zu den durchgeführten und in (*Kapitel 7*) beschriebenen nach den Bestrahlungsexperimenten durchgeführten Wärmebehandlungen; a) Mittelwerte der zusätzlich freigesetzten Menge an ON12 nach der Wärmebehandlung, bezgl. der Oberflächenbeladungen, quantifiziert über Flächenfaktoren des externen Standards ON12, die mittels RP18-HPLC bestimmt wurden, b) Anzahl der Werte, die zur Bestimmung der Mittelwerte verwendet wurden,

| Tab. / Abb. | SP | Gegenstrang | Ausbeute / [%] ^{a)} | # Werte ^{b)} |
|---------------------|----------------|-------------|------------------------------|-----------------------|
| <i>Abbildung 38</i> | SP22 | ON13 | 30 | 4 |
| | SP20C | ON13 | 54 | 6 |
| | SP23A-C | ON13 | 68 | 6 |
| <i>Abbildung 40</i> | SP23A-C | ON13 | 68 | 6 |
| | SP23A-C | ON37 | 32 | 2 |
| | SP23A-C | ON38 | 7 | 2 |
| <i>Abbildung 42</i> | SP23A-C | ON13 | 68 | 6 |
| | SP23A-C | ON31 | 63 | 2 |
| <i>Abbildung 44</i> | SP23A-C, SP20C | ON39 | 19 | 2 |
| | SP23A-C, SP20C | ON40 | 16 | 1 |
| | SP23A-C, SP20C | ON41 | 6 | 1 |
| | SP23A-C, SP20C | ON42 | 13 | 1 |
| | SP23A-C, SP20C | ON24 | 10 | 7 |
| | SP23A-C, SP20C | ON43 | 24 | 2 |
| <i>Abbildung 45</i> | SP23A-C, SP20C | ON44 | 63 | 4 |
| | SP23A-C, SP20C | ON45 | 53 | 7 |
| | SP23A-C, SP20C | ON46 | 64 | 1 |
| | SP23A-C, SP20C | ON64 | 42 | 1 |

Fortsetzung der Tabelle 30:

| | | | |
|-----------------------|-------------|----|---|
| SP23A-C, SP20C | ON47 | 15 | 2 |
| SP23A-C, SP20C | ON48 | 62 | 3 |
| SP23A-C, SP20C | ON49 | 45 | 5 |
| SP23A-C, SP20C | ON50 | 21 | 7 |
| SP23A-C, SP20C | ON65 | 31 | 1 |
| SP23A-C, SP20C | ON66 | 52 | 1 |
| SP23A-C, SP20C | ON51 | 39 | 2 |
| SP23A-C, SP20C | ON52 | 10 | 2 |
| SP23A-C, SP20C | ON53 | 95 | 3 |

Literaturverzeichnis

- 1 : B. Lewin, *Gene* **1991**, 2. Auflage, VCH, Weinheim.
- 2 : J. D. Watson, F. H. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737.
- 3 : R. E. Franklin, R. G. Gosling, *Nature* **1953**, 171, 740.
- 4 : a) L. Pauling, H. A. Itano, S. J. Singer, I. C. Wells, *Science* **1949**, 110, 543; b) V. M. Ingram, *Nature* **1956**, 178, 792.
- 5 : a) J. R. Riordan, J. M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plavsic, J. Chou, M. L. Drumm, M. C. Iannuzzi, F. S. Collins, L. Tsui, *Science* **1989**, 245, 1066; b) B. Kerem, J. M. Rommens, J. A. Buchanan, D. Markiewicz, T. K. Cox, A. Chakravarti, M. Buchwald, L. Tsui, *Science* **1989**, 245, 1073.
- 6 : T. A. Brown, *Gentechnologie für Einsteiger*, **1990**, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- 7 : D. Voet, J. G. Voet, *Biochemie* **1992**, 1. Auflage, VCH, Weinheim.
- 8 : A. P. Breen, J. A. Murphy, *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, 18(6), 1033.
- 9 : C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1109.
- 10 : J. Cadet, E. Sage, T. Douki, *Mutat. Res.* **2005**, 571(1-2), 3.
- 11 : D. V. Goeddel, D. G. Kleid, F. Bolivar, H. L. Heyneker, D. G. Yansura, R. Crea, T. Hirose, A. Kraszewski, K. Hakura, A. D. Riggs, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1979**, 76(1), 106.
- 12 : a) F. Sanger, A. R. Coulson, *J. Mol. Biol.* **1975**, 94, 441; b) F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, 74(12), 5463.
- 13 : a) A. M. Maxam, W. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, 74(2), 560; b) L. T. C. França, E. Carrilho, T. B. L. Kist, *Quart. Rev. Biophys.* **2002**, 35(2), 111.
- 14 : a) W. Kleesattel, *Gentechnik*, **2002**, Cornelson Scriptor, Berlin; b) C. R. Cantor, C. L. Smith, *Genomics: The science and Technology Behind the Human Genome Project*, **1999**, John Wiley & Sons Inc., New York.
- 15 : a) S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22(20), 1859; b) M. A. Dorman, S. A. Noble, L. J. McBride, M. H. Caruthers, *Tetrahedron* **1984**, 40 (1), 95.
- 16 : R. K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Ehrlich, N. Arnheim, *Science* **1985**, 230, 1350.
- 17 : R. T. Ranasinghe, T., Brown, *Chem. Commun.* **2005**, 44, 5487.
- 18 : D. S. Zarlenga, J., Higgins, *Vet. Parasitol.* **2001**, 101(3-4), 215.

- 19 : C. A. Foy, H. C., Parkes, *Clin. Chem.* **2001**, 47(6), 990.
- 20 : E. Anklam, F., Gadani, P., Heinze, H., Pijnenburg, G., Van den Eede, *Eur. Food Res. Technol.* **2002**, 214, 3.
- 21 : E. M. Southern, *J. mol. Biol.* **1975**, 98(3), 501.
- 22 : a) C. M. Niemeyer, D. Blohm, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38(19), 2865; b) C. M. Niemeyer, D. Blohm, *Angew. Chem.* **1999**, 111(19), 3039; c) Z. G. Goldsmith, N. Danasekaran, *Int. J. Mol. Med.* **2004**, 13, 483; d) M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis, P. O. Brown, *Science* **1995**, 270, 467; e) R. J. Lipshutz, S. P. A. Fodor, T. R. Gingeras, D. J. Lockhart, *Nat. Genet.* **1999**, 21, 20.
- 23 : J. Wang, *Nucleic Acids Research* **2000**, 28(16), 3011.
- 24 : Messe Vortrag: *Illmac 2005* in Basel, Heike Barlag, *Siemens*.
- 25 : S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nature Biotech.* **1996**, 14, 303.
- 26 : a) A. G. Frutos, S. Pal, M. Quesada, J. Lahiri, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124(11), 2396; b) O. Piestert, H. Barsch, V. Buschmann, T. Heinlein, J.-P. Knemeyer, K. D. Weston, M. Sauer, *Nano Letters* **2003**, 3(7), 979; c) H. Du, M. D. Disney, B. L. Miller, T. D. Krauss, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125(14), 4012.
- 27 : A. Dussy, *Synthese und Anwendung Photolabiler DNA-Bausteine, Dissertation (Uni Basel)* **1998**.
- 28 : A. Dussy, C. Meyer, E. Quennet, T. A. Bickle, B. Giese, *Chem. Biochem.* **2002**, 3, 54.
- 29 : a) B. Giese, P. Imwinkelried, M. Petretta, *Synlett* **1994**, 1003; b) B. Giese, X. Beyrich-Graf, P. Erdmann, M. Petretta, U. Schwitter, *Chem. Biol.* **1995**, 2, 367; c) E. Meggers, D. Kusch, M. Spichty, U. Wille, B. Giese, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37(4), 460; d) E. Meggers, D. Kusch, M. Spichty, U. Wille, B. Giese, *Angew. Chem.* **1998**, 110(4), 473.
- 30 : S. N. Müller, R. Batra, M. Senn, B. Giese, M. Kisel, O. Shadyro, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 2795.
- 31 : B. R. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149-2154.
- 32 : a) R. L. Letsinger, V. Mahadevan, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88(22), 5319; b) R. L. Letsinger, M. H. Caruthers, D. M. Jerina, *Biochemistry* **1967**, 6(5), 1379.
- 33 : S. V. Ley, I. R. Baxendale, *Chem. Rec.* **2002**, 2, 377.
- 34 : W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, **1984**, Springer-Verlag, New York.
- 35 : C. Dugave, L. Demange, *Chem. Rev.* **2003**, 103(7), 2475.

- 36 : a) H. Asanuma, D. Tamaru, A. Yamazawa, M. Liu, M. Komiyama, *Chem. Biochem.* **2002**, *8*, 786; b) X. Liang, H. Asanuma, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*(9), 1877.
- 37 : a) B. Armitage, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1171; b) W. Lu, D. A. Vicic, J. K. Barton, *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 7970.
- 38 : a) H. Kashida, M. Tanaka, S. Baba, T. Sakamoto, G. Kawai, H. Asanuma, M. Komiyama, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 777; b) H. Kashida, H. Asanuma, M. Komiyama, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6522; c) H. Kashida, H. Asanuma, M. Komiyama, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 6684.
- 39 : A. Wolfe, G. H. Shimer Jr., T. Meehan, *Biochemistry* **1987**, *26*, 6392.
- 40 : V. A. Korshun, D. a. Stetsenko, M. J. Gait, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2002**, 1092.
- 41 : a) C. Chatgililoglu, K.-D. Asmus, *Sulfur-Centered Reactive Intermediates in Chemistry and Biology*, Plenum Press, New York **1990**; b) G. W. Byers, H. Gruen, H. G. Giles, H. N. Schott, J. A. Kampmeier, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*(3), 1016.
- 42 : S. Lacombe, H. Cardy, M. Simon, A. Khoukh, J. P. Soumillion, M. Ayadim, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 347.
- 43 : a) R. Penchovsky, E. Birch-Hirschfeld, J. S. McCaskill, *Nucleic Acids Research* **2000**, *28*(22), e98; b) S. S. Ghosh, G. F. Musso, *Nucleic Acids Research* **1987**, *15*(13), 5353; c) J. N. Kremsky, J. L. Wooters, J. P. Dougherty, R. E. Meyers, M. Collins, E. L. Brown, *Nucleic Acids Research* **1987**, *15*(7), 2891.
- 44 : a) O. Piestert, H. Barsch, V. Buschmann, T. Heinlein, J.-P. Knemeyer, K. D. Weston, M. Sauer, *Nano Letters* **2003**, *3*(7), 979; b) J. Malicka, I. Gryczynski, J. Fang, J. R. Lakowicz, *Analyt. Biochem.* **2003**, *317*, 136.
- 45 : L. Henke, U. J. Krull, *Can. J. Anal. Sci. Spectrosc.* **1999**, *44*(2), 61.
- 46 : A. Luther, R. Brandsch, G. von Kiedrowski, *Nature* **1998**, 396, 245.
- 47 : J. Carlsson, H. Drevin, R. Axen, B. Amit, *Biochem. J.* **1978**, *173*, 723.
- 48 : J. R. Lorsch, J. W. Szostak, *Nature* **1994**, *371*, 31.
- 49 : A. W. Peterson, L. K. Wolf, R. M. Georgiadis, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*(49), 14601.
- 50 : M. K. McQuain, K. Seale, J. Peek, T. S. Fisher, S. Levy, M. A. Stremler, F. R. Haselton, *Analyt. Biochem.* **2004**, *325*, 215.
- 51 : K. J. Olejnik, E. Krzynanska-Olejnik, K. J. Rothschild, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*(2), 361.

- 52 : a) N. Sugimoto, M. Nakano, S. Nakano, *Biochemistry* **2000**, 39(37), 11270; b) N. Peyret, P. A. Seneviratne, H. T. Allawi, J. SantaLucia, Jr., *Biochemistry* **1999**, 38(12), 3468; c) H. T. Allawi, J. SantaLucia, Jr., *Biochemistry* **1997**, 36(34), 10581.
- 53 : A. Luther, *SPREAD-Ein Verfahren zur Replikation und exponentiellen Amplifikation von DNA-Analoga an der festen Phase, Dissertation (Uni Bochum) 1998*.
- 54 : W. D. Cantor, M. M. Warshaw, *Biopolymers* **1970**, 9, 1059.
- 55 : Die festen Phasen wurden von T. Watanabe im Rahmen eines Postdoc-Aufenthaltes in der Gruppe von Prof. Dr. B. Giese hergestellt.
- 56 : Persönliche Mitteilung von Dr. T. Watanabe.
- 57 : Expedite 8900 Nucleic Acid Synthesis System Users Guide, 2.

Dipl.-Chem. Sandra Thöni

Eidstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die Dissertation „Selektiver DNS-Strangbruch an fester Phase – eine neue Methode zur Sequenzerkennung“ nur mit der darin angegebenen Hilfe verfasst und bei keiner anderen Universität und keiner anderen Fakultät der Universität Basel eingereicht habe.

Basel, den 18. April 2006

(Sandra Thöni)

LEBENS LAUF – SANDRA THÖNI

ADRESSE:

Farnsburgerstr. 3
CH-4052 Basel
061/312 53 30
sandra.thoeni@hispeed.ch



PERSÖNLICHE INFORMATIONEN:

Geburtstag: 13. Januar 1977
Bürgerort: Gsteigwiler / BE
Nationalität: Schweizerin
Zivilstand: ledig

SPRACHEN:

Deutsch, Englisch, Französisch

AUSBILDUNG:

04/01 – 03/06 Universität Basel, Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. B. Giese: „Selektiver DNS-Strangbruch an fester Phase – eine neue Methode zur Sequenzerkennung“
11/00 – 03/01 Universität Basel, Diplomarbeit unter der Leitung von Prof. Dr. B. Giese: „Untersuchungen zum Elektronentransfer in DNA: Der Elektronendonator“
10/96 – 03/01 Universität Basel, Chemiestudium, Ur- und Frühgeschichte als Nebenfach
04/88 – 06/96 Humanistisches Gymnasium Basel, Matura (Typus B)
04/84 – 04/88 Primarschule Basel

LEHRTÄTIGKEIT:

10/03 – 03/05 Assistentin im Organisch-Chemischen Praktikum für Studierende der Biologie und der Pharmazeutischen Wissenschaften an der Universität Basel

INDUSTRIEPRAKTIKUM:

08/99 – 10/99 Novartis, Münchwilen/AG, Entwicklung und Anwendung von IR- und NIR-spektroskopischen Methoden im Bereich von Pflanzenschutzmitteln unter der Leitung von Dr. M. Naegele

STIPENDIEN:

11/96 – 03/01 Amt für Ausbildungsbeiträge des Kantons Basel-Stadt
04/01 – 06/01 VW-Stiftung
07/01 – 02/04 Schweizerischer Nationalfonds (inkl. NCCR)

An meiner Hochschulausbildung waren folgenden Dozenten beteiligt:

E. Constable, R. Ebersbach, G. Gescheidt, B. Giese, P. Hauser, C. Housecroft, H.-C. Im Hof, M. Jungen T. Kaden, J.-M. Le Tensorer, J. P. Maier, W. Meier, M. Neuenburger, M. Oehme, A. Pfaltz, J. Schibler, C. Schönenberger, U. Séquin, I. Sick, H. Sigel, F. Sigmund, P. Strazewski, C. Ullrich, H. Wennemers, M. Winterhalter, T. Wirth, J. Wirz W. D. Woggon, A. Zuberbühler.

Festphasensysteme:

| | |
|-------------|--|
| SP3 | DR1-CGT AGC TAG ATT CGA ATC GTA-Sp9-SS-SP |
| SP20 | DR1-CGT AGC TAG ATNO₂T CGA ATC GTA-(Sp9)_{0,1}-SS-SP |
| SP22 | DR1-CGT AGC TAG ATNO₂T CGA ATC GTA- SS-SP |
| SP23 | DR1-CGT AGC TAG ATNO₂T CGA ATC GTA-Sp9-SS-SP |

Photolyseprodukt von SP20, SP22 und SP23:

| | |
|-------------|---------------------------|
| ON12 | DR1-CGT AGC TAG Ap |
|-------------|---------------------------|

Gegenstränge:**Match:**

| | |
|-------------|---|
| ON13 | TAC GAT TCG AAT CTA GCT ACG |
| ON31 | TTT TTT ACG ATT CGA ATC TAG CTA CGT TTT T |
| ON37 | ACG ATT CGA ATC TAG CTA C |
| ON38 | CGA TTC GAA TCT AGC TA |

2 Mismatches:

| | | |
|-------------|---|-------------|
| ON30 | TTT TTT ACG ATT AGA ATC GAG CTA CGT TTT T | 3o/3u AG/GA |
| ON24 | TAC GAT TAG AAT CGA GCT ACG | 3o/3u AG/GA |
| ON39 | TAC GAT TCG AAC GTA GCT ACG | 2o/1o GG/AC |
| ON40 | TAC GAT TCG AAT GGA GCT ACG | 2o/3o GG/AG |
| ON41 | TAC GAT TCG AAT GTA GCT ACA | 2o/1o GG/CA |
| ON42 | TAC GAT TAG AAT GTA GCT ACG | 2o/3u GG/GA |
| ON43 | TAC GAC TCG AAT GTA GCT ACG | 2o/5u GG/AC |

1 Mismatch:

| | | |
|-------------|--|-----------------------------|
| ON23 | TAC GAT TCG AGT CTA GCT ACG | "0" TNO₂G |
| ON29 | TTT TTT ACG ATT CGA GTC TAG CTA CGT TTT T | "0" TNO₂G |
| ON44 | TAC GAT TCG AAC CTA GCT ACG | 1o AC |
| ON45 | TAC GAT TCG AAT CGA GCT ACG | 3o AG |
| ON46 | TAC GAT TCG AAT CAA GCT ACG | 3o AA |
| ON47 | TAC GAT TCG AAT CTA TCT ACG | 5o CT |
| ON48 | TAC GAT TCG AAT CTA GCT ACA | 10o CA |
| ON49 | TAC GAT TCG TAT CTA GCT ACG | 1u TT |
| ON50 | TAC GAT TAG AAT CTA GCT ACG | 3u GA |
| ON51 | TAC GAC TCG AAT CTA GCT ACG | 5u AC |
| ON52 | TAC CAT TCG AAT CTA GCT ACG | 7u CC |
| ON53 | GAC GAT TCG AAT CTA GCT ACG | 10u AG |
| ON64 | TAC GAT TCG AAT CCA GCT ACG | 3o AC |
| ON65 | TAC GAT TGG AAT CTA GCT ACG | 3u GG |
| ON66 | TAC GAT TTG AAT CTA GCT ACG | 3u GT |