

Transkription von Markergenen an immobilisierten Nukleinsäuren

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
"doctor rerum naturalium"
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin Biologie**

**eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam**

von
Jenny Steffen

Potsdam, den 10. Oktober 2005

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	<i>Ziel der Arbeit</i>	1
1.2	<i>Markergene</i>	4
1.2.1	EGFP	4
1.2.2	Duffy-Blutgruppenantigen	6
1.2.3	Myogenin	8
1.3	<i>Das T7-Expressionssystem</i>	9
1.3.1	T7-RNA-Polymerase	9
1.3.2	Der pET-Vektor	10
1.3.3	BI21-Expression	11
1.3.4	<i>In vitro</i> Translation	12
1.4	<i>Mikroarraytechnologie</i>	13
1.4.1	Oberflächen-Synthesen	14
1.4.1.1	PCR an Festphasen	14
1.4.1.2	Transkription an Festphasen	14
1.4.1.3	Translation an Festphasen	16
1.4.2	Lab on a Chip	17
1.5	<i>Nanostrukturen</i>	18
1.5.1	Stamm Schleifen-Strukturen	19
2.	Methoden	21
2.1	<i>Molekularbiologische und biochemische Arbeiten</i>	21
2.1.1	Arbeiten mit Bakterien	21
2.1.1.1	Kultur von Bakterien	21
2.1.1.2	Herstellung kompetenter Bakterien	21
2.1.1.3	Transformation	22
2.1.2	Aufreinigung von Nukleinsäuren	22
2.1.2.1	Plasmid isolation aus Bakterienkulturen	22
2.1.2.2	Aufreinigung von PCR-Produkten und Plasmiden mittels Zentrifugation	22
2.1.2.3	Aufreinigung von PCR-Produkten und Plasmiden mittels Silicamembran	23
2.1.2.4	Fällung	23
2.1.2.5	Aufreinigung von PCR-Produkten und Plasmiden aus Agarosegelen	23
2.1.3	Agarosegelelektrophorese	23
2.1.4	DNA-Konzentrationsbestimmung	24
2.1.4.1	UV-Adsorption	24

2.1.4.2 Agarosegel	24
2.1.5 Modifikation von DNA	25
2.1.5.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	25
2.1.5.1.1 <i>Kolonie-PCR</i>	26
2.1.5.1.2 <i>Duplex-PCR</i>	26
2.1.5.2 Restriktionsverdau	26
2.1.5.3 Einzelstrangbruch (Nicking)	26
2.1.5.4 T7-Exonukleaseverdau	27
2.1.5.5 Verknüpfung von Einzelstrangplasmiden mit der Topoisomerase I	27
2.1.5.6 De- und Phosphorylierung von DNA	27
2.1.5.7 Hybridisierung von Einzelstrang-DNA	28
2.1.5.8 Kovalente Verknüpfung von Vektor und PCR-Produkt	28
2.1.6 <i>In vitro</i> Transkription	29
2.1.6.1 DNA-Verdau	29
2.1.6.2 RT-PCR	29
2.1.7 <i>In vitro</i> Translation	29
2.1.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	30
2.1.9 Immunoblotting	30
2.2 Arbeiten mit Objektträgern (Chips)	31
2.2.1 Tropfverfahren	31
2.2.2 Modifikation der Glas-Oberflächen	32
2.2.2.1 Silanisierung	32
2.2.2.2 Kopplungsmethoden	32
2.2.2.2.1 <i>Immobilisierung mit silanisierten NH₂-C₆-Oligonukleotiden</i>	32
2.2.2.2.2 <i>Immobilisierung mit phosphorylierten Oligonukleotiden (EDC-Methode)</i>	33
2.2.2.2 Behandlung der Oberflächen	33
2.2.2.3.1 <i>Blocken nach Diehl</i>	33
2.2.2.3.2 <i>Waschen</i>	33
2.2.2.4 Auslesen der Oberflächen	34
2.2.3 Oberflächenreaktionen	34
2.2.3.1 Oberflächen-Polymerasekettenreaktion (OnChip-PCR)	34
2.2.3.2 Oberflächen-Transkription (OnChip-Transkription)	35
2.2.3.3 Oberflächen-Translation (OnChip-Translation)	36
2.2.4 Oberflächen-Hybridisierungen	36
2.2.4.1 Hybridisierung Cy5-markierter RNA	36
2.2.4.2 Hybridisierung von Stammschleifen-Strukturen	37

2.2.4.2.1	<i>Vorversuch</i>	37
2.2.4.2.2	<i>Nicking</i>	37
2.2.4.2.3	<i>Markierung von Schleifen-spezifischen Cy5-Sonden</i>	38
2.2.4.2.4	<i>Oberflächen-Hybridisierung</i>	38
3.	Material	39
3.1	Geräte	39
3.2	Materialien	40
3.2.1	Kultur von Bakterien	40
3.2.2	Aufreinigung von Nukleinsäuren	40
3.2.3	Agarosegelelektrophorese	40
3.2.4	Enzyme, Chemikalien und Lösungen	41
3.2.5	<i>In vitro</i> Translation	41
3.2.6	SDS-Gelelektrophorese und Immunoblotting	42
3.2.7	Primer, Oligomere für Klonierungen und PCRs	43
3.2.8	Arbeiten mit Glas-Oberflächen	44
3.2.9	Plasmide	44
3.2.10	Sonden und Primer für Oberflächenexperimente	45
4.	Ergebnisse	46
4.1	<i>Klonierung</i>	46
4.1.1	Klonierung der Expressionsplasmide	46
4.1.2	Klonierung zur Generierung eines Stammschleifen-Plasmids	47
4.2	<i>Vorversuche zur Oberflächen-Synthese</i>	51
4.2.1	Amplifikation der Transkriptionsmatrizen	51
4.2.2	Expression der Gene	53
4.2.2.1	BL21-Expression	53
4.2.2.2	<i>In vitro</i> Translation	54
4.2.2.2.1	<i>Vergleich der in vitro Translationskits</i>	55
4.2.3	Hybridisierung von Cy5-markierter RNA	56
4.3	<i>Arbeiten zur Generierung eines Stammschleifen-Plasmids</i>	57
4.3.1	Hybridisierung einer Stammschleifen-Struktur an eine immobilisierte Sonde	57
4.3.2	Modifikation eines Stammschleifen-Plasmids	58
4.3.3	Hybridisierung eines Einzelstrangringes an eine immobilisierte Sonde	61
4.3.4	Verknüpfung zweier Einzelstrangringe	63
4.4	<i>Enzymatische Oberflächen-Synthesen</i>	66

4.4.1 Oberflächen-Transkription (OnChip-Transkription)	66
4.4.1.1 Oberflächenbehandlung und Kopplungsparameter	66
4.4.1.2 Kopplungs- und Syntheserichtung	70
4.4.1.3 Oberflächen-Polymerasekettenreaktion (OnChip-PCR)	71
4.4.1.3.1 <i>Transkription von Oberflächen-synthetisierten PCR-Produkten</i>	74
4.4.1.4 Maschinelles Tropfen der PCR-Produkte mit dem sciFLEXARRAYER	76
4.4.1.4.1 <i>Blocken der Oberfläche</i>	76
4.4.1.4.2 <i>Variation des maschinellen Tropfens</i>	77
4.4.1.5 Kopplungseffizienz	79
4.4.1.6 Reproduktion der Transkription auf einer Oberfläche	83
4.4.1.7 Oberflächen-Transkription mit mehreren DNA-Sequenzen (Duplex- und Triplextranskription)	86
4.4.2 Oberflächen-Translation (OnChip-Translation)	88
4.4.2.1 Etablierung der Oberflächen-Translation	88
4.4.2.2 Reproduktion	90
4.4.2.3 Modifikation	91
5. Diskussion	93
5.1 Konstruktion der linearen Transkriptionsmatrizen	93
5.2 Konstruktion der zirkulären Transkriptionsmatrizen <i>(Stammschleifen-Plasmid)</i>	96
5.3 Enzymatische Synthesen an modifizierten Oberflächen	99
5.4 Zusammenfassung	109
5.5 Ausblick	110
6. Literaturverzeichnis	i-xviii
7. Anhang	I
7.1 Abkürzungsverzeichnis	III
7.2 Abbildungsverzeichnis	V

1. Einleitung

1.1 Ziel der Arbeit

Biologische Prozesse außerhalb des Organismus ablaufen zu lassen, ist ein wichtiges Ziel bei der Erforschung von zellulären Vorgängen. Die essentielle Synthese überhaupt ist die Herstellung von Proteinen. Beschäftigt man sich mit Proteinen, die schädlich für ihre Umgebung bzw. für ihre Produzenten sind, kann die *in vivo* Synthese problembehaftet sein. Deshalb wurde in den vergangenen Jahren die *in vitro* Translation entwickelt. Der Vorläufer der Translation ist die Transkription. Gelingt es, die RNA ausgesuchter Gene auf Oberflächen zu synthetisieren und gleichzeitig dort zu immobilisieren, kann parallel eine orientierte Synthese verschiedener Proteine im kleinen Volumen stattfinden. Zusätzlich könnte über die Zugabe von Transkriptionsfaktoren deren Expression gesteuert und damit genauer untersucht werden. Dabei bieten die Immobilisate die Möglichkeit, solche Studien mehrfach mit derselben Matrize ablaufen zu lassen. Somit wäre der erste Schritt für eine künstliche, miniaturisierte Proteinfabrikation inklusive analytischer Funktion gewährleistet, die als *artificial cell chip* bezeichnet wird.

Für die Etablierung einer Festphasen-Transkription soll die Expressionskassette des T7-Phagens, bestehend aus T7-Promotor und T7-Terminator, verwendet werden, da die Transkription ohne zusätzliche Transkriptionsfaktoren funktionell ist. Dieses System ist bereits erfolgreich an Bead-immobilisierten DNA-Matrizen erprobt worden (Andreadis & Chrisey, 2000). Als Reportergene dienen neben dem EGFP, das menschliche FY-Gen und das murine Myogenin, wobei die Präferenz auf der Seite des EGFPs liegt. Dies ist durch seine autokatalytische Prozessivität als fluoreszierendes Protein ideal als Indikator für eine spätere Oberflächen-Translation geeignet.

Die Immobilisation der Gene soll durch zwei DNA-Konstrukte realisiert werden. Dafür werden die Gene in den pET-3a Expressionsvektor kloniert, um die Voraussetzungen einer Transkriptionsreaktion zu egalisieren. Der Expressionsvektor selbst soll über den Einbau von palindromischen Oligomeren exponierte Stammschleifen-Strukturen ausprägen, die eine Hybridisierung an Oberflächen-immobilisierten Sonden ermöglichen.

Neben dem Plasmid soll ein linearisiertes PCR-Produkt direkt als Transkriptionsmatrize immobilisiert werden. Hierfür wird ausgehend vom rekombinanten Expressionsplasmid in einer Amplifikationsreaktion das PCR-Produkt mit verschiedenen Modifikationen darunter Biotin, NH₂-C6-Linker und Phosphat synthetisiert.

Die Transkription kompletter Gene soll mit beiden DNA-Konstrukten immobilisiert auf einer planaren Glasoberfläche etabliert werden. Die möglichen Ansätze dieser Arbeit sind in der Tabelle 1 und Übersichtsabbildung 1 dargestellt.

Tab. 1: Überblick über die geplante Abfolge der Arbeitsschritte für eine Oberflächen-Transkription (Ziel). Im ersten Schritt werden die generierten Genmatrizen, darunter das PCR-Produkt und das zirkuläre Plasmid, zur Kopplung an einer Oberfläche modifiziert. Das PCR-Produkt kann über die verwendeten Primer endständig mit einer Modifikation markiert werden (Biotin, Aminolinker, Phosphat). Das Plasmid wird über den Einbau von Stammschleifen-Sequenzen modifiziert. Im zweiten Schritt werden die modifizierten Nucleinsäuren auf die Oberfläche transferiert. Hierfür können diese per Hand oder mit Hilfe eines Mikroarrayers auf die planare Oberfläche appliziert werden. Im dritten Schritt dienen die immobilisierten Gene als Transkriptionsmatrizen. Das Stammschleifen-Plasmid wird über die ausgeprägte Stammschleifen-Struktur an gekoppelten Oligonucleotiden hybridisiert. Dabei kann das PCR-Produkt über Oberflächen-gekoppelte Primer direkt auf der Oberfläche synthetisiert (Oberflächen-PCR) und die immobilisierten Matrizen können in einer Oberflächen-Translation eingesetzt werden (Ausblick).

1. Schritt:	2. Schritt:	3. Schritt (Ziel):	4. Schritt (Ausblick):
Modifikation der Transkriptionsmatrizen	Transfer der Nucleinsäuren auf die Oberfläche	Oberflächen-Transkription <i>immobilisierte Matrizen :</i>	Oberflächen-PCR/Translation <i>immobilisierte Matrizen:</i>
a) Biotin			gekoppeltes PCR-Produkt
Lineare Matrize (PCR-Produkt)	handgetropft (0,3 – 0,5 µl) <i>oder</i>	gekoppeltes PCR-Produkt	<i>oder</i> PCR-Produkt über gekoppelte Primer direkt auf der Oberfläche synthetisiert (PCR)
b) Aminolinker	maschinell (10 pl - 10 nl)		
c) Phosphat		hybridisiertes Stammschleifen-Plasmid	hybridisiertes Stammschleifen-Plasmid
Zirkuläre Matrize (Plasmid)			
d) Stammschleife			

Flussdiagramm der Oberflächenreaktionen

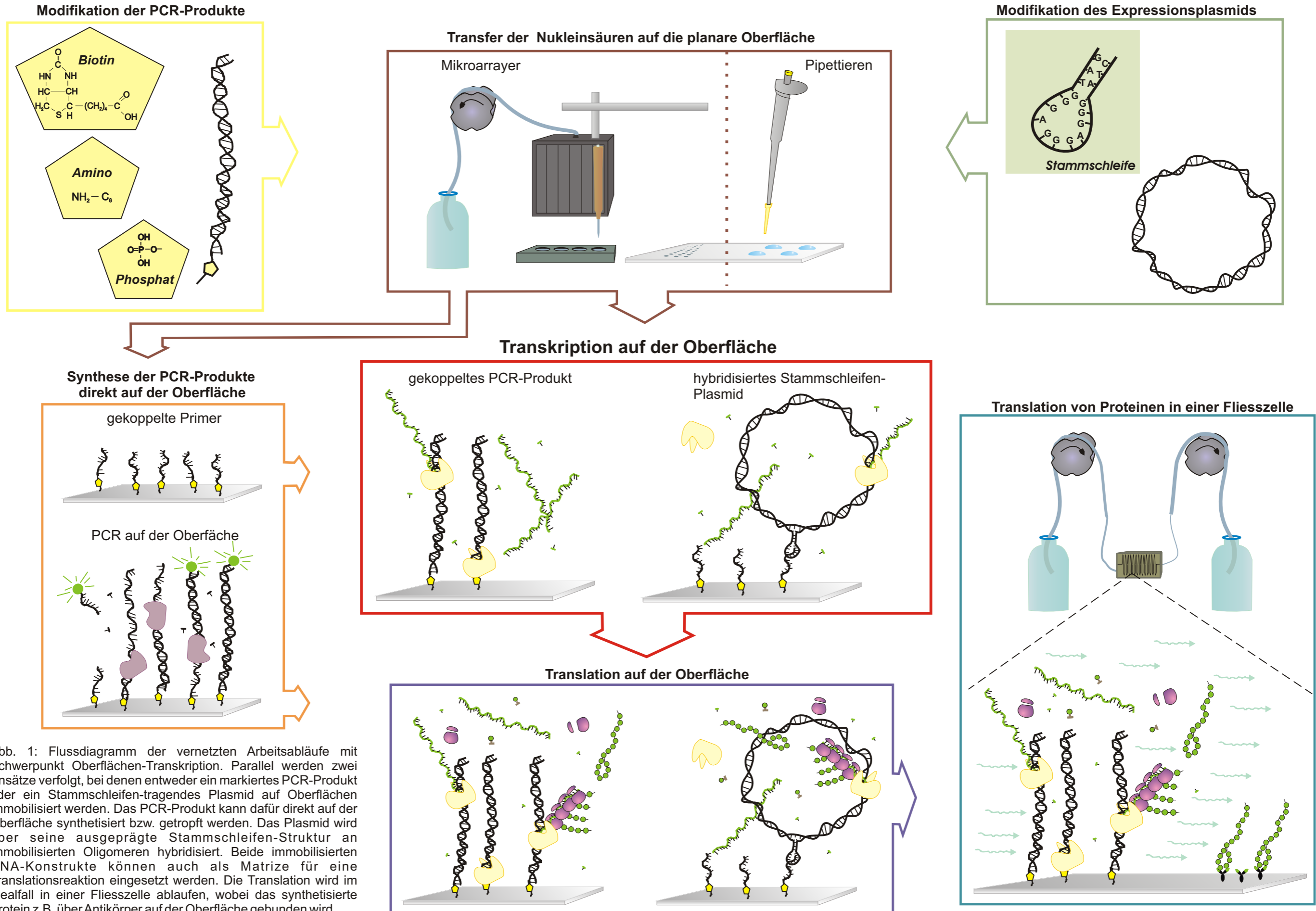


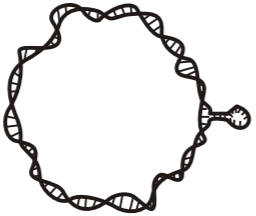











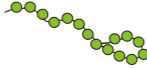


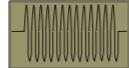


Abb. 1: Flussdiagramm der vernetzten Arbeitsabläufe mit Schwerpunkt Oberflächen-Transkription. Parallel werden zwei Ansätze verfolgt, bei denen entweder ein markiertes PCR-Produkt oder ein Stammschleifen-tragendes Plasmid auf Oberflächen immobilisiert werden. Das PCR-Produkt kann dafür direkt auf der Oberfläche synthetisiert bzw. getropft werden. Das Plasmid wird über seine ausgeprägte Stammschleifen-Struktur an immobilisierten Oligomeren hybridisiert. Beide immobilisierten DNA-Konstrukte können auch als Matrize für eine Translationsreaktion eingesetzt werden. Die Translation wird im Idealfall in einer Fließzelle ablaufen, wobei das synthetisierte Protein z.B. über Antikörper auf der Oberfläche gebunden wird.

Legende

	modifizierter Objektträger
	PCR-Produkt
	Plasmid mit ausgeprägter Stammschleifen-Struktur
	Modifikation (Biotin/ Aminolinker/Phosphat)
	immobilisierter Primer/ Sonde
	fluoreszenzmarkierter Gegenstrangprimer
	Taq-Polymerase
	T7-RNA-Polymerase
	mRNA
	Ribonukleotid
	Desoxyribonukleotid
	tRNA mit Aminosäure
	Aminosäurenkette
	Ribosom
	Peptid/Protein
	Antikörper
	peristaltische Pumpe
	Fliesszelle

1.2 Markergene

1.2.1 EGFP

Das *enhanced green fluorescent protein* EGFP ist ein Derivat des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) der Qualle *Aequora victoria*. Shimomura *et al.*, beschrieben 1962 als erstes das GFP, das zusammen mit dem Aequorin für das emittierte Licht der Qualle verantwortlich ist, bei dem ein strahlungsfreier Energietransfer des Aequorins zu dem GFP stattfindet (Morise *et al.*, 1974)

Das aus 238 Aminosäuren (AS) bestehende GFP bildet einen Zylinder aus 11 β -Faltblättern, welche eine zentrale α -Helix umschließen (Abb. 2). Die Form des GFP gleicht einer Art Tonne, deshalb auch als β -can bezeichnet, durch die Liganden diffundieren können (Yang *et al.*, 1996). Die für die Fluoreszenz benötigte Domäne umfasst die AS 7 bis 229 und beginnt in der Mitte der α -Helix und endet mit dem letzten β -Faltblatt (Li *et al.*, 1997). Das Kernstück der Fluoreszenz bildet ein Chromophor, das durch posttranslationale Zyklisierung des Tripeptids Serin⁶⁵-Tyrosin⁶⁶-Glycin⁶⁷ zu einem p-Hydroxybenzyliden-Imidazolinon oxidiert wird (Inouye & Tsuji, 1994). Der letzte Schritt der Zyklisierung und damit die Formation des aktiven Proteins sind einzig vom Sauerstoff abhängig, benötigen also keine weiteren Ko-Faktoren. Aufgrund dieser autokatalytischen Prozessivität des Chromophors ist das GFP im Gegensatz zu anderen fluoreszierenden Proteinen wie z. B. Phycobilliproteine als Reporter gen besser geeignet (Tsien, 1998). Ein weiterer Vorteil in der experimentellen Anwendung des Proteins liegt in der einfachen Detektion durch kurzwelliges Licht. Dabei spielt die Ladung des Chromophors eine große Rolle. Im neutralen Zustand zeigt das Anregungsspektrum des GFPs ein Maximum bei 395 nm mit einer Emissionsspitze bei 508 nm. Das natürlich vorkommende, aber seltenere anionische Chromophor hingegen hat ein Anregungsmaximum von 475 nm, welches Licht mit einer Wellenlänge von 503 nm maximal emittiert (Heim *et al.*, 1994).

In Mutationsstudien wurde eine Mutante gesucht, deren Anregungsmaximum anstatt bei den zellzerstörenden und schädlichen 395 nm (UV-Bereich) in einem ungefährlicheren Bereich liegt. Mit einer Mutation des Serins⁶⁵ zu einem Threonin wird das Anregungsmaximum von 395 nm unterdrückt und das nun vorherrschende Phenolat anion im Chromophor bedingt ein Anregungsmaximum von 489-490 nm. Auch die Reifung des Fluorophors verläuft bei dieser Mutation um das Vierfache schneller (Heim *et al.*, 1994).

Eine Mutation an der Position 64, bei der ein Phenylalanin durch ein Leucin ersetzt wurde, bewirkt die Verschiebung der Reifungstemperatur von 20° C auf 37°C, was die Expression des Proteins in *E. coli* und eukaryotischen Systemen erleichtert (Cubitt *et al.*, 1997). Die GFPmut1-Mutante besitzt diese Doppelmutation und ist mit weiteren stillen Basensubstitutionen an die Kodonnutzung in menschlichen Zellen angepasst worden

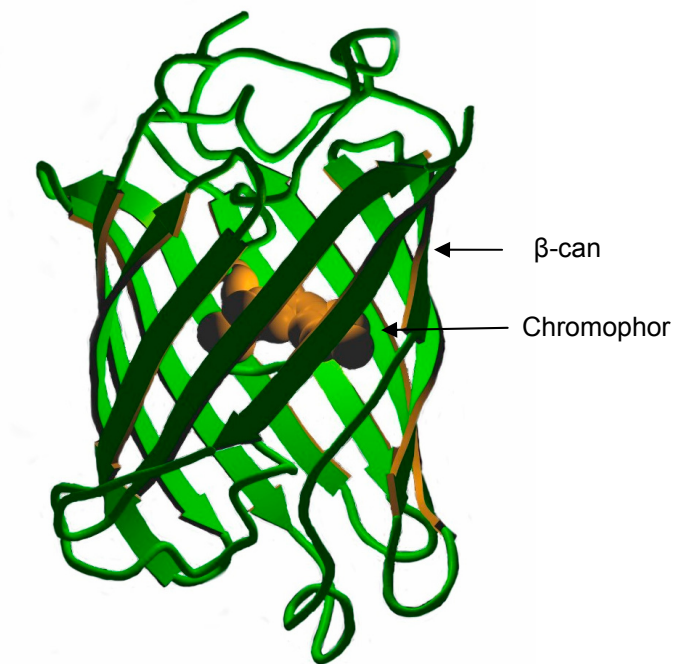


Abb. 2: Dreidimensionale Struktur des GFPs. 11 β -Faltblätter bilden eine Art Tonne, die β -can, in deren Mitte das Chromophor angeordnet ist (Nach Tsien, 1998).

(Cormack *et al.*, 1996) Diese Variante des GFPs ist das *enhanced green fluorescent protein* EGFP. Andere Varianten des GFPs sind in der Tabelle 2 aufgelistet.

Seit der Charakterisierung des GFPs und seiner Mutanten wurden diese in den vielfältigsten Organismen als Fusions- und Reportergene synthetisiert, darunter in Bakterien, Hefen, Drosophila, Nematoden, Pflanzen und Säugerzellen wie embryonale Stammzellen (Chalfie *et al.*, 1994; Kahana *et al.*, 1995; Yeh *et al.*, 1995; Casper *et al.*, 1996; Hadjantonakis *et al.*, 2002).

Tab. 2: Auflistung der verschiedenen GFP-Varianten

GFP-Varianten	genaue Bezeichnung	Anregung	Emission
Wildtyp	<i>green fluorescent protein</i>	395 -397 nm	504 nm
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>	488nm	507-509 nm
EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>	516 nm	529 nm
ECFP	<i>enhanced cyan fluorescent protein</i>	452 nm	505 nm
EBFP	<i>enhanced blue fluorescent protein</i>	380-383 nm	440-447 nm

1.2.2 Duffy-Blutgruppenantigen

Das menschliche FY-Gen kodiert ein als DARC (*Duffy antigen/receptor for chemokine*) bezeichnetes Glykoprotein, welches der Familie der Chemokinrezeptoren zugeordnet wird. Erste Studien zur Genstruktur wiesen auf ein *single copy*-Gen hin, das sich aus 1.275 Nukleotiden (nt) zusammensetzt, wovon 175 nt zur 5'- und 51 nt zur 3'- untranslatierten Region gehören (Chaudhuri *et al.*, 1989). Aufgrund von fehlenden Introns ist die kodierende Sequenz kolinear mit dem mRNA-Transkript. Später lokalisierte eine andere Arbeitsgruppe ein weiteres Exon, welches durch ein Intron vom bereits beschriebenen getrennt wird (Iwamoto *et al.*, 1995) (Abb. 3A). Im Spleißingprozess wird das 3'-endständige Nukleotid des Exons I mit dem 1. Nukleotid des zehnten Kodons der Exon II-Struktur verknüpft. Das daraus entstandene Transkript wird als gespleißte Form bezeichnet. Das Auftreten beider Formen, gespleißt und ungespleißt (mRNA-Transkript der Exon II-Struktur), ist bisher noch nicht aufgeklärt worden.

Das DARC-Protein (339 AS) ist ein Siebentransmembran-Protein, mit einer aminoterminalen Domäne aus 62 AS, drei extrazellulären und drei intrazellulären Schleifen sowie einem cytoplasmatischen COOH-Ende (28 AS) (Abb. 3B). Für die Bindung der Liganden ist die Ausprägung einer Bindungstasche, die über Disulfidbrücken innerhalb der extrazellulären NH₂-Domäne geformt wird, essentiell (Tournamille *et al.*, 1997). Diese Domäne trägt außerdem die Blutgruppenantigene Fy^{ab} und Fy⁶ (Chitnis *et al.*, 1996). Ein weiteres Antigen, das Fy³, befindet sich auf der dritten extrazellulären Schleife (Horuk *et al.*, 1996). Weit weniger verbreitet sind das Fy⁴ und Fy⁵-Antigen, deren Epitope aufgrund ihrer Seltenheit noch nicht charakterisiert werden konnten (Bezhad *et al.*, 1973; Colledge *et al.*, 1973).

Das FY-Gen wird in Endothialzellen verschiedener Gewebe, z.B. Niere, Milz, Lunge und ebenso in roten Blutkörperchen exprimiert. In den nicht-erythroidalen Zellen dient das DARC als Rezeptor für Chemokine, darunter IL-8 und CCL5 (Darbonne *et al.*, 1991). Über die Bindung und Internalisierung werden die überschüssigen, zirkulierenden Chemokine einem abklingenden Immunprozess entzogen. Daneben wurde bei nierenkranken Patienten eine Überexpression des DARC-Proteins festgestellt, wobei die Rezeptoren den Übergang der Leukozyten durch das Endothelium erleichterten (Lee *et al.*, 2003). Bei anderen Siebentransmembran-Rezeptoren ist der Internalisierungsprozess mit der Aktivierung einer Signalkaskade gekoppelt, die über das *guanosine triphosphat binding protein* (G-Protein) vermittelt wird. Das für die Bindung des G-Proteins charakteristische DRY-Motiv in der zweiten, intrazellulären Schleife, fehlt dem DARC-Protein (Hadley & Peiper, 1997). Dadurch ist eine vom G-Protein abhängige Aktivierung von Genen wahrscheinlich nicht möglich.

Bei einigen Menschen, hauptsächlich Westafrikanern und Afroamerikanern, findet keine Expression des FY-Gens in Erythrozyten statt. Diese Menschen sind gegenüber den Malariaerregern *Plasmodium vivax* und *knowlesi* immun. Das DARC-Protein wurde bereits in

den 70er Jahren als Rezeptor für diese Parasiten beschrieben (Miller *et al.*, 1976). Genetische Untersuchungen zeigten, dass eine Einzelbasenmutation an einer GATA-Stelle im FY-Promotor zu einer Stilllegung des Gens in Erythrozyten führte (Tournamille *et al.*, 1995). Damit fehlt den Blutparasiten die Erkennungsstelle auf den Erythrozyten.

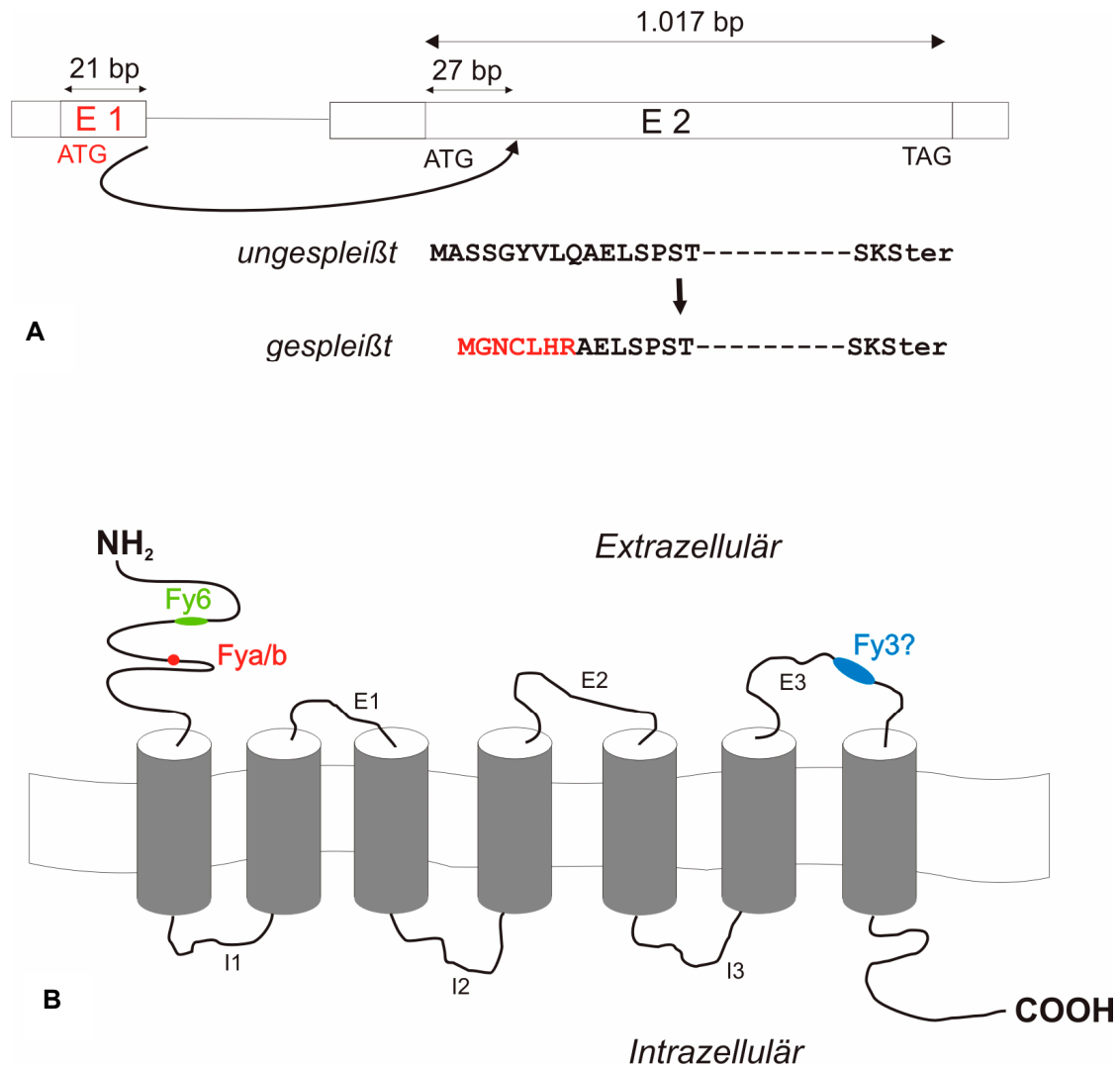


Abb. 3: A) Schema der beiden bekannten Exonstrukturen E1 (Iwamoto *et al.*, 1996) und E2 (Chaudhuri *et al.*, 1989) des menschlichen FY-Gens. Durch einen Spleißingprozess wird das 3'OH-Ende von E1 mit der 28. Base des ORFs (*open reading frame*) der zweiten Exonstruktur verknüpft. Beide Formen treten im menschlichen Organismus auf.
 B) Das DARC-Protein als Translationsprodukt des FY-Gens mit seinen Siebentransmembran-Domänen, die durch drei intrazelluläre (i1-i3) und drei extrazelluläre (e1-e3) Schleifen verbunden sind. Auf dem extrazellulären, N-terminalen Ende befinden sich die Antigene Fya/b und Fy6, während auf der dritten extrazellulären Schleife das Antigen Fy3 lokalisiert ist.

1.2.3 Myogenin

Die unter dem Begriff Myogenese bekannte Muskelzellendifferenzierung, umfasst die Verschmelzung von postmitotischen Myoblasten zu vielkernigen Muskelfibrillen sowie die transkriptionale Genaktivierung kontraktile Proteine. Zu diesen kontraktile Proteinen gehören das Troponin I und T, das α -Aktin, die Muskelkreatinkinase (MCK) und die beiden Myosin Heavy Chain (MHC)-Isoformen. Erste Beobachtungen zeigten, dass die Behandlung einer Fibroblasten-Zelllinie (10T1/2) mit 5-Azacytidin und das daraus resultierende veränderte Methylierungsmuster der genomischen DNA, zur einer Umwandlung in ausdifferenzierte Myotubes führte (Constatinides *et al.*, 1997; Taylor & Jones, 1979). Beim Vergleich beider Zelltypen wurde in den Myotubes ein spezifischer Transkriptionsfaktor entdeckt, der *Myogenic Determination Factor* (MyoD1) (Davis *et al.*, 1987). Das MyoD ist zusammen mit dem Transkriptionsfaktor Myf5 (Braun *et al.*, 1989) für die Determination der myogenen Stammzellen verantwortlich, die somit als primäre Muskeltranskriptionsfaktoren bezeichnet werden (Megeney & Rudnicki, 1995). Die sekundären Transkriptionsfaktoren werden durch das Myogenin und das MRF 4 repräsentiert. Das Myogenin induziert die Differenzierung der Myoblasten zu Myotubes, die durch die Skelettmuskelproteine selbst, wie z.B. durch das Titin unterstützt wird (Fürst *et al.*, 1989). In einem weiteren Schritt reguliert das MRF 4 die Weiterentwicklung der Myotubes zu Muskelfasern (Rudnicki & Jaenisch, 1995).

Wright *et al.*, isolierten 1989 als erste die cDNA des Myogenins aus Ratten-Myoblasten. Sie postulierten eine kodierende Sequenz, bestehend aus 864 bp und einer Polypeptidkette aus 287 AS, die aber aufgrund einer Leserahmenverschiebung in der AS-Abfolge auf 675 bp und 225 AS korrigiert wurde (Fujisawa-Sehara *et al.*, 1990). Darunter wurden zwei transkriptionsaktivierende Domänen charakterisiert, wobei die erste Domäne die AS 7 bis 77 und die zweite Domäne die AS 156 bis 224 umfasst (Schwarz *et al.*, 1992). Ein weiteres Charakteristikum dieser Transkriptionsfaktoren ist der Besitz eines basischen Helix-Loop-Helix-Motivs (bHLH) und die Aktivierung der Transkription über die Ausprägung eines Heterodimers (Abb. 4). Durch die Dimerisierung wird eine spezielle Basenabfolge (CANNTG) erkannt, die als E-Box bezeichnet wird (Blackwell & Weintraub, 1990; Murre *et al.*, 1989). Die E-Boxen wurden in den Kontrollregionen vieler skelettmuskelspezifischer Strukturgene entdeckt, die dort für die Aktivierung von myogenischen bHLH-Faktoren benötigt werden (Molkentin & Olson, 1996). Die myogenischen bHLH-Proteine gehen diese Dimerisierung mit den ubiquitär exprimierten HLH-Proteinen E12 und E47 ein, die als zwei Spleißingprodukte aus dem E2A-Gen hervorgehen (Lassar *et al.*, 1991). Neben dem bHLH-Motiv existiert eine weitere Region (= *basic domain*), die zwar nicht für die DNA-Bindung aber für die Genaktivierung essentiell ist (Brennan *et al.*, 1991). Die Phosphorylierung der DNA-Bindedomäne mittels Proteinkinase C kann die Aktivierung der muskelspezifischen Gene

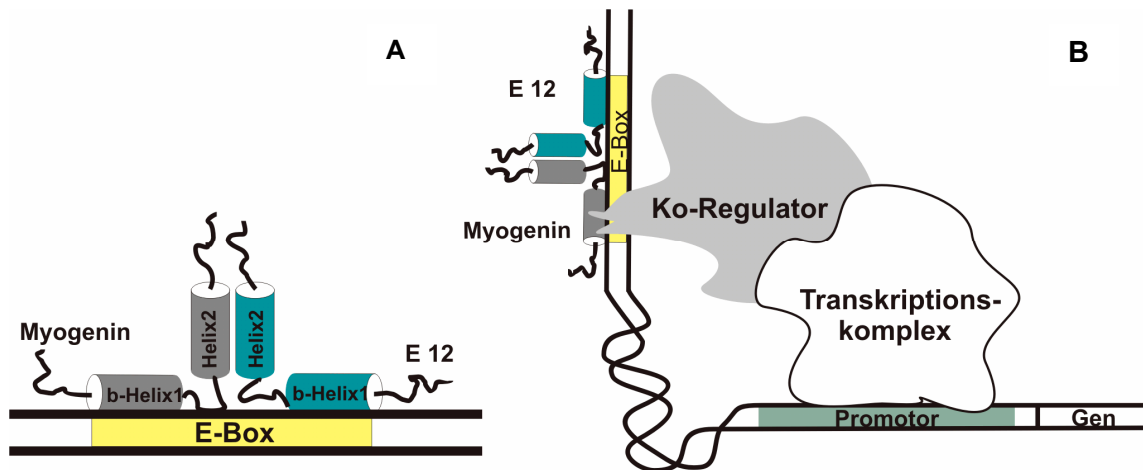


Abb. 4: Hypothetische Modelle der Transkriptionsaktivierung vermittelt durch das Myogenin (Schwarz *et al.*, 1992).

A) Die Bindung des Heterooligomers aus den bHLH-Proteinen Myogenin und E12 an die E-Box, die als Verstärker (*enhancer*) für die Transkription muskelspezifischer Proteine fungiert. B) Die Vermittlung der Transkriptionsaktivierung erfolgt mit Hilfe eines Ko-Regulators, welcher mit dem Transkriptionskomplex verbunden ist. Der Ko-Regulator stellt die Verbindung zum Transkriptionskomplex über ein Alanin und Threonin der Helix1 des Myogenins her.

blockieren, während die Phosphorylierung selbst aber erst durch die Dimerisierung ermöglicht wird (Zhou & Olson, 1994).

Diese regulierenden Prozesse in der Genaktivierung von muskelspezifischen Proteinen sind sehr komplex und werden durch viele Faktoren beeinflusst, die noch nicht vollständig aufgeklärt sind.

1.3 Das T7-Expressionssystem

1.3.1 T7-RNA-Polymerase

Die Infektion von Bakterien durch Bakteriophagen, darunter dem T7-Phagen, induziert die Synthese vieler viraler Proteine innerhalb der Wirtszelle. Der T7-Phage enthält ein einzelnes DNA-Molekül bestehend aus 4×10^4 bp, auf dem unter anderem die T7-RNA-Polymerase (T7-RNAP) kodiert ist. Wie viele andere phagische RNA-Polymerasen ist die T7-RNAP ein monomerisches Enzym mit einer Größe von ca. 100 kDa. Die Besonderheit der T7-RNAP liegt nicht nur in der hochspezifischen und stringenten Erkennung ihrer Promotoren, wovon sieben auf der T7-DNA entdeckt wurden (Oakley & Coleman, 1977; Panayotatos & Wells, 1979), sondern auch in der Prozessivität, die ohne weitere Faktoren wie z.B. Sigma-Faktoren oder anderen Transkriptionsfaktoren auskommt (McAllister *et al.*, 1993). Anhand von Kristallisationsstudien ließen sich „Untereinheiten“ des Enzyms charakterisieren, die sich wie

bei einer offenen rechten Hand als Finger, Daumen und Handfläche um die gebundene DNA schließen (Sousa *et al.*, 1993). Die hochkonservierte AS-Region von AS 142-150, die einige Homologien zum σ -Faktor der *E. coli*-RNA-P aufweist, ist wie dieser für die DNA-Bindung essentiell, wird aber im Unterschied dazu ebenso für die Katalyse benötigt (McAllister, 1993; Gross *et al.*, 1992)

Die Promotorsequenz umfasst 23 bp einschließlich der Startstelle des mRNA-Transkripts, (-17 bis +6) (Rosa, 1979), wobei das Enzym in der Region -12 bis -7 mit dem Promotor eine Verbindung eingeht (Cheetham *et al.*, 1999). In kinetischen Studien zeigte sich, dass die thermodynamisch ungünstige Entwindung der Promotor-DNA in eine offene Komplexstruktur (*open complex*) und die daraus resultierende schnelle Kollabierung zu einer Behinderung der Transkriptionsinitiation führt. Die Umwandlung der geschlossenen Form in den offenen DNA-Komplex wird erst durch die Bindung der initiierenden Nukleotide ermöglicht, während die Instabilität als ein kinetischer Mechanismus dem Enzym erlaubt, die geringe Bindungsspezifität durch eine hohe Promotorspezifität zu kompensieren (Villemain *et al.*, 1997). Gleichzeitig wird die DNA im Promotorbereich von -2 bis +1 um 40-60° gebogen (Újvári & Martin, 2000), wodurch die Promotor-Polymerase-Affinität möglicherweise erhöht wird (Schinkel *et al.*, 1988) und die Schwelle zur Aufschmelzung der DNA-Stränge gesenkt werden kann (Perez-Martin *et al.*, 1994)

1.3.2 Der pET-Vektor

Es sind eine Reihe verschiedener pET-Vektoren käuflich erhältlich, die alle als Derivate des Plasmid pBR322 generiert wurden (Bolivar *et al.*, 1977).

Diese Vektorgruppe besitzt eine T7-Promotorsequenz, die durch den starken Klasse III Promotor Φ 10 repräsentiert wird (Rosenberg *et al.*, 1987). Starke Promotoren zeichnen sich durch eine hohe Affinität zum DNA-bindenden Enzym aus, wobei die Transkription viele Male pro Minute an ihnen initiiert wird. Der vektorielle T7-Promotor besteht aus 22 bp, dessen Sequenz sich mit den ersten sechs transkribierten Nukleotiden überschneidet (Studier & Dunn, 1983). Das T7-Expressionssystem auf diesen Vektoren wird durch einen T7-Terminator komplettiert. Dieser T Φ -Terminator ist der natürlich vorkommende Terminator der T7-RNAP (Studier, 1972). Wie bei den meisten Terminationen ohne regulatorische Proteine wird die Transkription durch die Ausprägung einer Stammschleifenstruktur mit einer GC-reichen Basenabfolge gestoppt. Zu den 46 bp dieses Terminators gehört auch eine Thymidinabfolge, die als transkribierte Uracilkette mitbestimmend für die Beendigung der Transkription ist (Macdonald *et al.*, 1994). Im zirkulären Vektor wird die Transkription rund um das geschlossene Plasmid durch den Terminator verhindert. Darunter fällt die Transkription des β -Laktamasegens (*bla* oder Ap), welches in der gleichen Orientierung wie

der T7-Promotor auf einigen pET-Plasmiden kodiert ist. Das *bla*-Gen mit einer Größe von 877 bp wird auch als amp^R bezeichnet, denn die translatierte β -Laktamase, die den β -Laktamring des Ampicillins hydrolysiert, ist für den Abbau des Antibiotikums verantwortlich. Mit dieser Resistenz ist eine Selektion Plasmid-tragender Bakterienklone erst möglich (Meynell & Datta, 1967).

Für eine effiziente Translation des gewünschten Proteins ist die Vermehrung des Plasmids in den Wirtszellen notwendig. Die pET-Vektoren wie auch das Ursprungsplasmid pBR322 sind *multicopy* Plasmide, die über einen Replikationsursprung (*origin of replication*), kurz *ori*, repliziert werden (Bolivar *et al.*, 1977). Von diesem *ori* aus werden die Öffnung des Plasmidringes und die Replikation, auch bekannt als *rolling circle* Mechanismus, eingeleitet. Die Firma Novagen bietet insgesamt 40 verschiedene pET-Vektoren an, die sich durch den Besitz unterschiedlicher Resistenzen, Tags, Protease-Spaltungsstellen, Restriktionsschnittstellen und auch T7-Promotoren unterscheiden.

Der in dieser Arbeit verwendete pET-3a Vektor mit einer Größe von 4640 bp besitzt die T7-Promotor- und T7-Terminatorsequenz, eine Ribosomen Bindestelle (*ribosomen binding site*), eine Ampicillinresistenz und einen N-terminalen T7-Tag (Abbildung Anhang).

1.3.3 BI21-Expression

Die Nutzung von T7-Expressionsplasmiden bedingt auch die Verwendung von Bakterienstämmen, die das Gen für die T7-RNA-Polymerase in ihrem Genom tragen. In ersten Arbeiten gelang es, das T7-Phagengen *gene 1*, welches die T7-RNAP kodiert, in den Vektor pBR322 zu klonieren (Davanloo *et al.*, 1984). Das nun gut replizierbare Gen wurde in den Vektor λ DE3, einem Derivat des λ -Phagen, eingebracht und steht somit unter der Kontrolle des lacUV5 Promotors. Zusätzlich trägt dieser Vektor das Gen lac I, das den Lac-Repressor kodiert, welcher sich später an den lacUV5 Promotor anlagert und somit die Transkription des *gene 1* inhibiert. Das durch die Klonierung zerstörte Gen für die Integrase (*int*), die für die Integration der Phagen-DNA in das Wirtschromosom verantwortlich ist, wurde damit funktionslos. Somit kann die Phagen-DNA nicht integriert werden bzw. auch nicht mit Hilfe von Helfer-Phagen die Wirtszelle verlassen. Die Funktion des *int*-Gens wurde deshalb von einem Helfer-Lysogen mit heterologer Immunität mitgeliefert (Studier & Moffatt, 1986). Der *E. coli*-Stamm BI21(DE3) ist ein Lysogen dieses λ DE3-Phagen, bei dem nach der Infektion das T7-RNAP-Gen, das lacI-Gen und der lacUV5-Promotor ins Chromosom integriert wurden.

Die Kontrolle der T7-RNA-Polymerase erweist sich als vorteilhaft, da die hohe Transkriptionsrate der T7-RNAP, die fast fünf mal so schnell ist, wie die der *E. coli*-RNA-Polymerase, die Expression der bakteriellen Gene unter der Kontrolle der *E. coli*-Promotoren

in den Zellen reduziert (Chamberlin *et al.*, 1970; Studier & Moffatt, 1986). Das Ablösen des lacI-Repressors vom Operator und die damit verbundene Initiation der T7-Expression werden durch die Gabe des Galaktoseanalogons Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG) bewirkt.

1.3.4 *In vitro* Translation

Die Expression von Genen außerhalb von Zellen wird als *in vitro* Translation bezeichnet und beruht bei fast allen bakteriellen Expressionen auf Lysaten von *E. coli*. Die darin enthaltenen Komponenten wie Ribosomen, ribosomale Faktoren, tRNAs, Aminoacyl-tRNA-Synthetasen und viele andere mehr sind für Translationen von Fremdgenen ausreichend. Die Firma Qiagen vertreibt ein solches Proteinsynthesekit, das EasyXpress™ Protein Synthesis Kit, welches ursprünglich von der Firma RiNA entwickelt wurde. Dieses etablierte System ist sowohl für die Expression von Proteinen die unter der Kontrolle von *E. coli*-Promotoren stehen, als auch für T7-Promotoren geeignet. Dabei spielt die Struktur der DNA-Matrize, ob zirkulär oder linear, keine Rolle. Für eine optimale Expression von PCR-Produkten empfiehlt der Hersteller die Verwendung von optimierten Primern. Das PCR-Produkt wird in einer

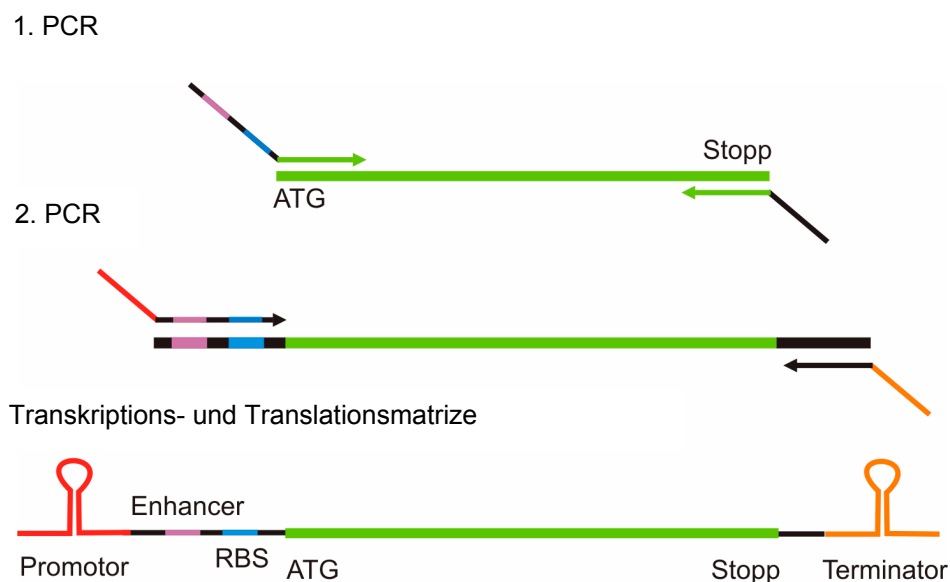


Abb. 5: Zweistufige Amplifikationsreaktion einer linearen Transkriptions- und Translationsmatrize. Im ersten Schritt wird das Gen mit einem spezifischen Primerpaar, dessen 5'-Überhänge Sequenzen des zweiten Primerpaares kodieren, amplifiziert. Nach der zweiten Amplifikationsreaktion besitzt das PCR-Produkt die regulatorischen Elemente wie T7-Promotor, Transkriptionsverstärker (*enhancer*), die RBS (*ribosomen binding site*) und den T7-Terminator.

zweistufigen Amplifikationsreaktion über genspezifische Primer mit einem 5'-Überhang bestehend aus einer Basenabfolge, die komplementär zum zweiten Primerpaar ist, generiert (Abb. 5). Die zweiten Primer oder auch Adapterprimer kodieren die wichtigen regulatorischen Elemente für die T7-Expression. Sie können auch mit einem N- oder C-terminalen Affinitätstag modifiziert sein und sind speziell für dieses System entwickelt oder angepasst worden (Handbuch EasyXpress™ Protein Synthesis Kit).

1.4 Mikroarraytechnologie

Mit der Erschließung des menschlichen Genoms vor fünf Jahren wurde ein breites Feld zur Untersuchung der entschlüsselten Gene geöffnet. Von den angenommenen 100.000 Genen blieben nach der Entschlüsselung nur noch 30.000 übrig, die mit Hilfe neuer Technologien erforscht werden sollen.

Bei dieser großen Anzahl können konventionelle Methoden, die auf Gelsequenzierungen basieren oder Amplifikationen funktionieren, nicht mehr Schritt halten.

Beginnend mit der Entwicklung des Southernblots, bei dem markierte Nukleinsäuren für die Detektion von immobilisierten Nukleinsäuren fungieren (Southern, 1975), über das Anlegen und Auslesen von Klonbibliotheken auf Filtern wurde neben der Analyse des Untersuchungsobjekts auch gleich die Zuordnung und die Information in Rastern abgelegt.

Gleiches galt und gilt auch für die Expressionsanalysen, die derzeit am häufigsten angewendete Form von Mikroarrays. Hierbei wird die mRNA eines Organismus, einer Zelle oder eines Zellstatus an cDNA-Bibliotheken, welche auf einer Nylonmembran in einem Gitter verankert sind, hybridisiert.

Zwei entscheidende Entwicklungen in der Arraytechnologie wurden als Grundsteine für alle weiteren Anwendungen gelegt: die eine basiert auf der Hochdurchsatzsynthese von Oligonukleotiden mittels photolithografischer Verfahren (Fodor *et al.*, 1991). Hiermit können bei dem heutigen Stand 100.000 Gensequenzen parallel untersucht werden (Affymetrix, USA). Das andere Verfahren nutzt das lokalisierte und maschinelle Tropfen von cDNAs oder Oligonukleotiden auf einen Objektträger (Schna *et al.*, 1995). Diese Methoden ermöglichen einen parallelen Vergleich zwischen verschiedenen stark exprimierten Genen, wobei die Daten kartografisch den Proben zugeordnet werden können. Durch den Einsatz unterschiedlicher Fluoreszenzmarkierungen und bekannter Referenzproben lassen sich die Genexpressionsmuster verschiedener Zellen, Zellstadien und Zelltypen untersuchen.

Dieser Transkriptomanalyse schließt sich die Proteomanalyse als eine andere Form der zellbiologischen Analyse an. Dabei werden entweder Antikörper oder Proteine auch im Hochdurchsatzverfahren auf unterschiedliche Materialien getropft (Silzel *et al.*, 1998; Ge, 2000; Arenkov *et al.*, 2000; MacBeth & Schreiber, 2000).

1.4.1 Oberflächen-Synthesen

1.4.1.1 PCR an Festphasen

Einen ganz anderen Ansatz verfolgt die Verwendung von Oberflächen für enzymatische Synthesen und Aktivitäten. Dabei wird entweder das Enzym oder das Substrat, z.B. DNA, auf Oberflächen immobilisiert. Die Aktivitäten von Polymerasen wie Reverse Transkriptase, Klenow-Fragment und Telomerase sowie von Restriktionsenzymen wurden an immobilisierten Nukleinsäuren in Echtzeit gemessen und konnten somit mehr Aufschluss über die Initiation und Regulierung durch Ko-Faktoren der Enzymreaktionen liefern (Buckle *et al.*, 1996; Nilsson *et al.*, 1995, Schmidt *et al.*, 2002; Bier *et al.*, 2002).

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) als ein wichtiges Verfahren zur Aufarbeitung von geringen Probenmengen wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen an oberflächen-gebundenen Primern entwickelt. Als Oberflächen dienten hierbei Mikrotiterplatten, Polyacrylamid-beschichtete Oberflächen, Agarose-Beads und modifizierte Glasoberflächen (Rasmussen *et al.*, 1994, Mitra & Church, 1999; Andreadis & Chrisey, 2000; Adessi *et al.*, 2000). Ausschlaggebend für diese Arbeiten war die Kopplung des zu immobilisierenden Primers, welcher entweder direkt auf der Oberfläche photolithographisch generiert (Pease *et al.*, 1994) oder über endständige Modifikationen wie z.B. Biotin, Thiol oder Phosphat auf entsprechend modifizierte Oberflächen gebunden werden kann (Marble & Davis, 1995; Adessi *et al.*, 2000). Die Detektion der synthetisierten und immobilisierten PCR-Produkte wurde mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen oder aber durch die Verwendung von markierten Hybridisierungs sonden oder Gegenstrangprimern gewährleistet (Mitra & Church, 1999, Strizhkov *et al.*, 2000, Tillib *et al.*, 2001). Für die Analyse von Punktmutationen im menschlichen Tumorsuppressorgen p53 oder in mitochondrialer DNA wurde die Oberflächen-PCR erfolgreich angewendet (Huber *et al.*, 2001; Erdogan *et al.*, 2001). Darunter wurde auch die Synthese des kompletten mitochondrialen Genoms von 16,5 kb auf der Oberfläche beschrieben (von Nickisch-Rosenegk *et al.*, 2005a). Auch die genaue Unterscheidung von klinisch relevanten Bakterienstämmen gelang bereits mit dieser Methode (Mitterer *et al.*, 2004).

1.4.1.2 Transkription an Festphasen

Die Oberflächen-PCR oder auch OnChip-PCR kann eine vielversprechende Grundlage für die Synthese transkriptionsfähiger Matrizen bilden. Die Zusammenführung beider Reaktionen wurde von Andreadis und Chrisey (2000) beschrieben, die an avidin-beschichteten MPG- (*magnetic porous glass*) oder silanisierten CPG-Beads (*controlled pore*

glass) PCR-Produkte synthetisierten, die den funktionellen T7-Promotor und T7-Terminator sowie das GFP-Gen kodierten, das im nachfolgenden Schritt transkribiert wurde.

Die ersten Arbeiten zur Oberflächen-Transkription wurden mit DNA-Fragmenten durchgeführt, die nach der Restriktion aus Plasmid-DNA in einer Klenow-Reaktion mit biotinylierten dUTPs markiert und so an streptavidinbeschichteten Beads immobilisiert wurden (Arias & Dynan, 1989). An diesen immobilisierten Fragmenten konnte später die Transkription von kurzen viralen Sequenzen mit der RNA-Polymerase II gezeigt werden. Fujita und Silver berichteten 1993 von der Transkription unter der Kontrolle des T7- und T3-Promotors, bei der die DNA ausschließlich über ein Biotinmolekül an Streptavidin-Beads gebunden wurde. Für die Untersuchung der Bewegung und der Geschwindigkeit der RNA-Polymerase wurde Phagen-DNA mit Hilfe von Aluminiumelektroden über eine Länge von 2-3 μm gestreckt und die gegenüberliegenden DNA-Enden an Avidinmolekülen gebunden (Kabato *et al.*, 1993). In einem ähnlichen Ansatz wurde die 38 kb lange T7-DNA unspezifisch an einen PMMA-beschichteten (Polymethylmetacrylat) Glasobjektträger gebunden, gestreckt und die Aktivität der T7-RNAP mittels Fluoreszenzmikroskopie beobachtet (Gueroui *et al.*, 2002). Das gleiche Ziel, aber in anderer Umsetzung wurde mit der Nutzung der Oberflächen Plasmon Resonanz Technologie (SPR) erreicht, bei der die Bindung des Enzyms und die Elongation über die Zunahme der Oberflächendichte gemessen wurde (Pemberton & Buckle, 1999). Eine andere Anwendung von Bead-gekoppelten Transkriptionsmatrizen ist die Untersuchung der Polyadenylierung und Spaltung von neu-entstehender RNA (Adamson *et al.*, 2005).

Nicht nur die DNA ist für die Immobilisation geeignet, sondern auch die RNA-Polymerase selbst. So wurde bereits ein Komplex aus biotinylierter DNA immobilisiert an streptavidinbeschichteten Goldpartikeln und RNA-Polymerase II adsorptiv an Glasobjektträgern gebunden (Schafer *et al.*, 1991, Yin *et al.*, 1994). Die Detektion der Elongation kann dabei nicht nur durch optische Verfahren sondern auch über die Anregung mit Schallwellen verfolgt werden (Jayarajah & Thompson, 2002). Über einen angefügten Histidin-Tag an die β -Untereinheit der RNA-Polymerase II konnte die Aktivität des Enzyms gebunden an einer Ni-NTA-Matrix verfolgt werden (Kashlev *et al.*, 1993).

Ein Vorteil der Festphasen-Transkription liegt in der mehrfachen Verwendung der immobilisierten Matrize, die erfolgreich mit Bead-gebundener DNA gezeigt werden konnte (Marble & Davis, 1995). Die mehrfache Transkription mit kovalent gekoppelten PCR-Produkten an silanisierten Objektträgern wurde in der vorliegenden Arbeit etabliert (Steffen *et al.*, 2005). Für die Kopplung von DNA und damit für die OnChip-Transkription kann auch eine Zink-Arachidatschicht auf einer mit Langmuir-Blodgett-Film beschichteten Oberfläche dienen, dessen Monolayer von amphiphilen Molekülen ausgebildet wird (Ghosh *et al.*, 2005).

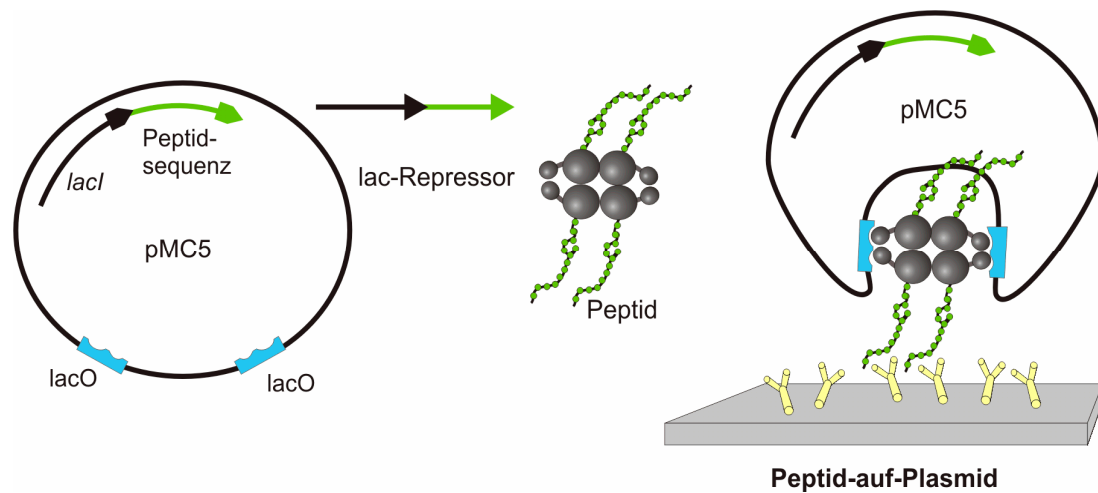


Abb. 6: Schema des Plasmid-Repressor-Peptid-Komplexes. In den Expressionsvektor für den lac-Repressor pMC5 wird die DNA-Sequenz eines teils unbekanntes Peptids kloniert, so dass ein Fusionsprotein aus lac-Repressor und Peptid exprimiert wird. Die ebenfalls auf dem pMC5-Vektor liegenden Erkennungssequenzen des Repressors (lacO) werden durch das Fusionsprotein gebunden. Damit entsteht ein Komplex aus Plasmid, Repressor und Peptid. Über einen immobilisierten Antikörper oder Rezeptor kann der Komplex gebunden und die DNA-Sequenz der Antigen- oder Peptidspezifität zugeordnet werden.

1.4.1.3 Translation an Festphasen

Die Translation der kodierenden mRNA, die in einem Ansatz die Analyse des synthetisierten Proteins und ihres genetischen Ursprungs zulässt, wäre ein erheblicher Vorteil für die Proteomforschung.

Für die Proteomforschung ist das Anlegen großer Peptid- und Proteinbibliotheken notwendig. Ein häufiges Prinzip ist die Expression von zufällig ausgewählten DNA-Sequenzen an der Oberfläche von filamentösen Phagen, die später über eine selektive Antikörperbindung und DNA-Sequenzierung charakterisiert werden (Cwirla *et al.*, 1990; Devlin *et al.*, 1990). In einer ähnlichen Methode werden die vielfältigen Peptide über einen Plasmid-Repressor-Peptid-Komplex gebunden (Abb. 6). Die Peptide, deren DNA-Sequenzen auf einem Expressionsplasmid lokalisiert sind, werden als C-terminale Fusionspartner mit dem Lac-Repressor in Bakterien translatiert, dessen Erkennungsstelle lacO ebenfalls auf dem Plasmid kodiert ist. Als Peptidrezeptor diente ein Antikörper mit einem teilweise unbekanntes Epitop, der über ein Antikörperkonjugat an magnetischen Beads gebunden war (Cull *et al.*, 1992).

In der Arbeit von Mattheakis *et al.*, 1994 wurde das *in vitro* Polysom Display als ein System ohne lebende Wirtszellen vorgestellt. Auch hier dient ein Expressionsvektor mit einer Epitop-kodierenden Kasette als Matrize. Die während der *in vitro* Translation in der Entstehung begriffenen Peptide sind zusammen mit ihrer kodierenden mRNA an die Ribosomen

gebunden, so dass diese als Komplex in antikörperbeschichteten Mikrotiterplatten analysiert werden können. Mit diesem Verfahren konnte eine Peptidbibliothek mit 10^{12} DNA-Molekülen angelegt werden. Erste Anwendungen erfolgten mit der Untersuchung eines Einzelstrang-Antikörperfragmentes scFV (*single chain variable fragment*) (Hanes & Plückthun, 1997, Hanes *et al.*, 1998; Hanes *et al.*, 2000) und einem Progesteron als Antigen (He & Taussig; 1997). Durch den Einsatz eines RNA-Bindeproteins und einem dazugehörigen RNA-Motiv konnte der Polysomenkomplex zusätzlich stabilisiert werden (Sawata & Taira, 2003).

Die nächste Generation der *in vitro* Proteinsynthese wie hier vorgestellt, basiert auf der Oberflächen-Translation, da hier die genetische Information und deren Produkte immobilisiert am gleichen Ort verbleiben und die Zuordnung dadurch erleichtert wird. Mit der Immobilisation von mRNA an eine Säulenmatrix wurden erste Festphasen-Translationen von Pavlov *et al.*, 1997 erfolgreich beschrieben. Auch die Bindung der 30S-Ribosomenuntereinheit an mRNA-Molekülen, die auf einer dextranbeschichteten Oberfläche immobilisiert wurden, konnte mit Hilfe der SPR-Technologie studiert werden (Karlsson *et al.*, 1999).

Im letzten Jahr präsentierte die Arbeitsgruppe um Ramachandran (2004), die Oberflächen-Translation von Proteinen, die im gleichen Locus wie ihr gekoppeltes Gen gebunden wurden. Hierfür wurde ein Expressionsplasmid über UV-Licht mit einem Biotin-Psoralen-Konjugat vernetzt und zusammen mit Avidin und einem polyklonalen Anti-Glutathion-S-Transferase (GST) Antikörper auf Objektträger getropft, so dass das generierte GST-Fusionsprotein direkt an den Antikörper binden konnte. Mit dieser Methode ließen sich parallel 29 verschiedene menschliche Replikationsinitiationsproteine synthetisieren und auf einem Chip nachweisen.

1.4.2 Lab on a Chip

Das Ziel der „Labor auf der Oberfläche“-Technologie (Lab on Chip) ist der Zusammenschluss von Probenpräparation und DNA-Array Detektion in einem miniaturisierten Reaktionsraum. In einer in sich geschlossenen Reaktionskammer werden alle Prozesse wie DNA-Extraktion, Amplifikation, Hybridisierung und Detektion nacheinander über Pumpen, Ventile, Heizer, Filter oder mechanische Wellen verknüpft. Damit wird eine kostengünstige, schnelle, effiziente und verbrauchsmittelsparende Automatisierung von Probenanalysen erreicht.

Die Amplifikation eines 266 bp großen PCR-Produktes gelang mit einer solchen Mikroammer in nur 20 min, wobei die DNA-Probe über verschiedene Temperaturzonen gepumpt und gleich im Anschluss in Kapillaren elektrophoretisch aufgetrennt wurde (Woolley *et al.*, 1996). Diese Kapillarelektrophoresechips (*capillary electrophoresis* = CE) bestehen

meist aus nur wenigen μm breiten Injektionskanälen, die zusammen mit PCR-Kammern und einer Detektionsapparatur mit konfokalem Laser die Amplifikationsmodule bilden (Woolley & Mathies, 1994). Die Weiterentwicklung dieses System konnte bis hin zur Einzelmolekülanalyse optimiert werden (Lagally *et al.*, 2001).

Das Anlegen eines elektrischen Feldes ist eine Möglichkeit zum Transport, zur Aufkonzentrierung und Hybridisierung von Oligonukleotiden, so beschrieben von Sosnowski *et al.*, 1997. Eine Agaroseschicht, gelagert zwischen mehreren im Arrayformat angeordneten Platinelektroden und der Reaktionslösung, wurde mit Streptavidin versetzt, um biotinylierte Oligonukleotide an genauen Positionen zu binden. Durch die Variation der Feldstärke war es möglich, Einzelbasenfehlpaarungen in einer Hybridisierungsreaktion zu diskriminieren. Mit dieser von der Firma Nanogen Inc. entwickelten Methode konnten Blutzellen von *E. coli* sowie von HeLa-Zellen (*human cervical carcinoma cells*) separiert werden (Cheng *et al.*, 1998 a; Cheng *et al.*, 1998 b).

Für die Analyse von Proteinen und Enzymen werden ebenfalls mikrofluidische Systeme oder auch miniaturisierte Totalanalysesysteme (μTAS) genutzt (Holden & Cremer, 2005). So konnte das von einer avidingekoppelten Glukoseoxidase produzierte Wasserstoffperoxid über Mikrokanäle als Substrat an eine streptavidingekoppelte Peroxidase weitergeleitet und durch diese mit einem sichtbaren Farbumschlag verstoffwechselt werden (Holden *et al.*, 2004).

Solch geschlossene und mehrstufige Systeme können als Vorlagen für miniaturisierte „Proteinfabriken“ dienen, die durch die Vereinigung von Transkription und Translation realisierbar wären.

1.5 Nanostrukturen

In der Genetik und Molekularbiologie ist die DNA als genetischer Informationsträger von enormer Bedeutung. Dabei sind Nukleinsäuren auch strukturelle Gebilde, die selbst als Medien für Analysen eingesetzt werden können.

In der Natur existieren solche funktionelle DNA-Formen als Regulatoren von Synthesen wie z.B. die Kondensation genomischer DNA und die Ausprägung von Haarnadelschleifen. Es ist auch bekannt, dass abweichend von der helikalen Form Nukleinsäuren natürliche Ikosaeder ausbilden, um mit viralen Kapsidproteinen eine stabile Verbindung einzugehen (Chen *et al.*, 1989; Larson *et al.*, 1993). Diese Art DNA-Gerüste ließen sich unter künstlichen Bedingungen in Kuben-, Tetraeder- und Oktaederform konstruieren (Chen & Seeman, 1991; Zhang & Seeman 1994; Li *et al.*, 1996; Shih *et al.*, 2004).

Ein Ziel dieser Strukturierung von DNA ist die Organisation von anderen Molekülen, so z.B. die Anordnung von DNA in Gittern für Kristallisationsstudien von biologischen

Makromolekülen (Seeman, 2003). Dazu gehört auch die Ausrichtung von DNA mit Hilfe von Elektroden (Washizu & Kurosawa, 1990). Die komplette DNA des M13-Phagens konnte damit als biotinmarkiertes, linearisiertes Molekül zwischen zwei streptavidinbeschichteten Elektroden gespannt werden (Hölzel *et al.*, 2003). Anders als bei einzelsträngiger DNA wurden diese „DNA-Brücken“ mit fluoreszierenden PNA-Sonden (*peptide nucleic acid*) markiert und nachgewiesen. PNA als Nukleinsäureanalogon trägt ein Rückgrat aus einer ungeladenen Carboxamidkette aus Aminosäurederivaten wie N-(2-Aminoethyl)-Glycin und ist in der Lage eine DNA-Basenpaarung nach dem Watson-Crick-Prinzip einzugehen (Nielsen *et al.*, 1991). Die DNA:PNA Bindung besitzt dabei eine höhere Stabilität als eine vergleichbare DNA:DNA oder DNA:RNA Bindung (Egholm *et al.*, 1993). Zusätzlich können PNAs einen DNA-Doppelstrang lokal auflösen um eine Triplexbindung einzugehen (Bentin & Nielsen, 1996). Ihre Anwendung finden PNAs als PCR-Marker für Genmutationen oder für die Verankerung von DNA-Molekülen (Ørum *et al.*, 1993; Rhodes *et al.*, 1997; Seeger *et al.*, 1997).

1.5.1 Stammschleifen-Strukturen

Die über die Sekundär- und Tertiärstruktur von RNA bekannten Haarnadelschleifen setzen sich aus einer einzelsträngigen Schleifenregion und einer doppelsträngigen Stammstruktur zusammen. Die Stammstruktur ist ein Hybridisierungsprodukt von zwei benachbarten, auf einem DNA- oder RNA-Strang lokalisierten, komplementären Sequenzen. Diese DNA-Sequenzen liegen z.B. unterhalb von Genabschnitten und werden als terminierenden Strukturen am Ende der transkribierten RNA ausgeprägt.

Nukleinsäuren werden heute nicht nur aufgrund ihres Informationsgehalts genutzt, sondern kommen auch als molekularbiologische Werkzeuge zum Einsatz.

Eine besondere Form von DNA-Sonden stellen die *molecular beacons* dar, die von Tyagi und Kramer (1996) erstmals vorgestellt wurden (Abb. 7). Diese basieren auf 20 nt langen Haarnadelschleifen-Strukturen, deren Schleifen- oder Loopregion (12 –15 nt) komplementär zur Ziel-DNA ist. Die Funktion der Sonde ergibt sich aus der Nähe der beiden offenen Enden der meist kürzeren Stammstruktur. Während das eine Ende ein Fluorophor (Donor) trägt, befindet sich am anderen Ende ein entsprechender Löscher (Akzeptor), wie das nicht-fluoreszente DABCYL [4-(4-dimethylaminophenyl)azobenzene carboxylic acid]. Die Anregungsenergie des Fluorophors wird bei Unterschreitung eines gewissen Mindestabstandes zum Löscher auf diesen übertragen. Dabei wird die Fluoreszenz des Donors trotz gleicher Anregungsenergie deutlich schwächer oder ausgelöscht, während der Akzeptor die transferierte Energie als Wärme abgibt. Bindet die Sonde an eine komplementäre Sequenz, löst sich die Haarnadelstruktur auf und Donor und Akzeptor

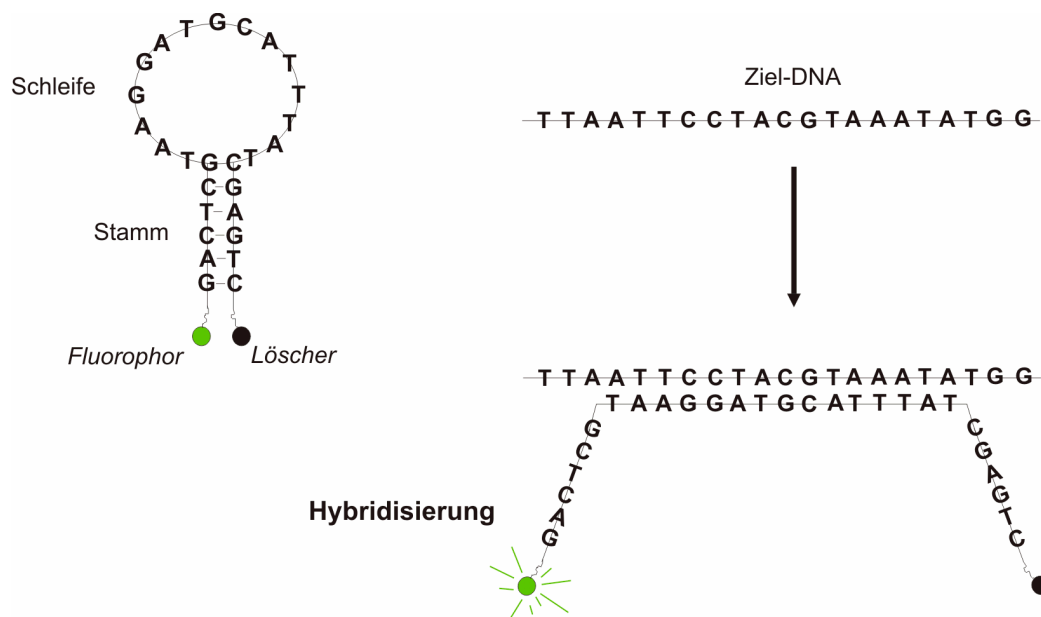


Abb. 7: Aufbau einer Stammschleifen-Sonde (*molecular beacon*) mit einer Schleifensequenz die homolog zur Ziel-DNA ist und einer Stammstruktur, die an ihren offenen Enden ein Fluorophor bzw. einen Löscher trägt. Im geschlossenen Zustand liegen Fluorophor und Löscher in unmittelbarer Nähe. Ist dies der Fall überträgt sich die Anregungsenergie vom Fluorophor direkt zum Löscher. Mit der Hybridisierung der Sonde an ihre komplementäre Sequenz öffnet sich die Stammschleifenstruktur und Fluorophor und Löscher entfernen sich voneinander, so dass das Fluorophor Licht emittiert.

entfernen sich voneinander, so dass der Löscheffekt aufgehoben wird. In Kombination mit einer Amplifikationsreaktion konnten während der Synthese die Sonden an pathogene RNA-Amplifikate binden, die so über die Fluoreszenz detektiert wurden (Leone *et al.*, 1998). Für die Detektion von Signalproteinen wurden *molecular beacons* eingesetzt, die mit Hilfe von Mikroinjektionsnadeln in lebende Zellen injiziert wurden (Sokol *et al.*, 1998).

Es ist bekannt, dass auch natürlich vorkommende, zirkuläre DNA-Moleküle Haarnadelschleifen-Sequenzen aufweisen, so z.B. in der mitochondrialen DNA (Shadel & Clayton, 1997). Mit der künstlichen Einführung solcher DNA-Strukturen in Vektoren wäre es möglich, diese an Oberflächen-Sonden zu binden. Broude *et al.*, berichteten 2001 von der Entwicklung eines Mikroarrays mit Haarnadelschleifen-Sonden. An Oberflächen-gekoppelten Oligonukleotiden wurden diese Sonden hybridisiert, die mit einem überstehenden 3'OH-Ende Einzelmutationen in p53-Genfragmenten detektierten.

2. Methoden

2.1 Molekularbiologische und biochemische Arbeiten

2.1.1 Arbeiten mit Bakterien

2.1.1.1 Kultur von Bakterien

Für die Selektionierung und Anzucht von *E. coli* wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und über Nacht (ÜN) bei 37°C inkubiert. Einzelne Bakterienklone wurden mit sterilen Zahnstochern gepickt und in 3 - 5 ml LB-Medium mit Antibiotikum überführt. Für eine effiziente Bakterienanzucht über Nacht wurden optimale Wachstumsparameter von 37°C bei guter Belüftung (Schüttler 220 rpm) gewählt. Die wachsenden Bakterien wurden entweder für Plasmidminipräparationen oder zur Animpfung von Bakterienkulturen mit größerem Volumen eingesetzt.

2.1.1.2 Herstellung kompetenter Bakterienkulturen

Für die Vermehrung von Plasmiden werden Bakterien eingesetzt, die sich schnell in hoher Zahl replizieren lassen. Hierfür werden die Plasmide in Bakterien eingeschleust und dort von dem bakterieneigenen Replikationsapparat vervielfältigt. Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien wird eine Behandlung mit zweiwertigen Metallionen in Form von Salzen durchgeführt (z.B. $MnCl_2$, $CaCl_2$), welche eine Präzipitation der DNA bewerkstelligen. Diese Präzipitate werden aktiv von den Bakterien aufgenommen.

Ein Bakterienstamm wurde in 100 ml LB-Medium bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,5 - 0,6 kultiviert. Nach einer zehnmütigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien bei 4°C, 2.500 g für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 80 ml $MgCl_2$ - $CaCl_2$ -haltigem Transformationspuffer resuspendiert. Auf einen erneuten Zentrifugationsschritt folgte das Resuspendieren des Pellets in 4 ml 0,1 M $CaCl_2$ -Lösung.

2.1.1.3 Transformation

Als Transformation bezeichnet man einen Vorgang, bei dem neukombinierte DNA in Wirtszellen eingeschleust wird. Dazu müssen die Rezipienten eine Kompetenz besitzen, d.h. aufnahmefähig für Fremd-DNA sein. Um dies zu erreichen, werden sie mit kalten Metallionenlösungen (z.B. $CaCl_2$, $MnCl_2$) behandelt (2.1.1.2).

Zu 100 µl Bakterienkultur wurde der Ligationsansatz oder 100 - 500 ng einer Plasmid-DNA pipettiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Um eine Aufnahme des Plasmids in die Zellen zu

gewährleisten, wurde die Zellmembran durch einen Hitzeschock permeabilisiert. Dazu wurde der Transformationsansatz für 90 s in einem 42°C temperierten Wasserbad inkubiert und danach sofort wieder auf Eis gekühlt. Nach einer Zugabe von 800 µl SOC-Medium erfolgte zur Erholung und phänotypischen Expression des Selektionsmarkers eine 45-minütige Inkubation der Zellen bei 37°C. Für die Selektionierung wurden die Bakterien zu jeweils 2 x 100 µl auf LB-Agarplatten mit Antibiotikum ausplattiert. Nach einer kurzen Zentrifugation des restlichen Transformationsansatzes wurde das Pellet nach Resuspension mit 100 µl zusätzlich ausplattiert. Die Bakterien wurden ÜN in einem 37°C temperierten Brutschrank kultiviert.

2.1.1.4 Expression mit *E. coli* BI21

Die pET-Plasmide wurden in *E. coli* BI21 Zellen transformiert und entsprechende Klone über Nacht in 10 ml LB-amp kultiviert. 100 ml LB-Medium mit Ampicillin wurden mit 1 ml der ÜN-Kultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 weiterkultiviert. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 80 µl Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) (0,5 M) induziert und durch eine weitere Kultivierung für 4-5 Stunden fortgeführt. 1 ml der Zellsuspension wurde für 1 min bei 5.000 g abzentrifugiert und das Zellpellet in 100 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert.

2.1.2 Aufreinigung von Nukleinsäuren

2.1.2.1 Plasmidisolierung aus Bakterienkulturen

Die Anwendung vorgefertigter Plasmidisolierungskits erlaubt eine schnelle, effektive Trennung der Plasmid-DNA von anderen Zellbestandteilen, wie Proteinen, Fetten, Salzen, mitochondrialer und genomischer DNA.

Für die Plasmidisolierung von 1 - 5 ml Bakterienkultur wurde das Machery-Nagel Plasmid Minikit und für 200 - 500 ml Bakterienkulturen das Plasmid Midikit verwendet.

2.1.2.2 Aufreinigung von PCR-Produkten und Plasmiden mittels Zentrifugation

Hierfür wurden Membranen der Firma Millipore eingesetzt, die durch definierte Porengrößen entsprechend große Nukleinsäuren zurückhalten.

2.1.2.3 Aufreinigung von PCR-Produkten und Plasmiden mittels Silicamembranen

Für die Aufreinigung von Nukleinsäuren über ihre Ladung wurden Kits mit integrierten Silicamembranen verwendet.

2.1.2.4 Fällung

Das Entfernen von Nukleasen aus DNA oder RNA-Proben wird über eine Phenol/Chloroformfällung erzielt.

Hierfür wurde die Probe im Verhältnis 1:1 mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und bei 12.000 g für 10 min zentrifugiert. Die obere Phase wurde vorsichtig abpipettiert und die Nukleinsäuren mit 1 Vol Isopropanol, 0,1 Vol Natriumacetat (NaAc) pH 3,2 oder bei sehr kleinen DNA-Fragmenten mit 5 M LiCl und für 2 Stunden bei -20°C oder 10 min bei -80°C gefällt. Zur Sedimentation der Nukleinsäuren erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 4°C und 16.000 g für 30 min. Danach wurden die Nukleinsäuren mit mind. 200 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und nochmals bei 16.000 g für 10 min zentrifugiert. Die getrockneten Pellets wurden in entsprechenden Lösungsmitteln resuspendiert.

Für die alleinige Aufkonzentrierung der Nukleinsäuren wurde der Phenol-Schritt weggelassen.

2.1.2.5 Aufreinigung von PCR-Produkten und Plasmiden aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von DNA-Molekülen aus Agarosegelen erlaubt eine Separation des gewünschten Fragments aus einem DNA-Gemisch. Für die Aufbereitung von DNA aus Agarosegelen wurde mit dem QiaExII–Kit sowie dem Millipore Gel Extraction Kit gearbeitet.

2.1.3 Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese wird durch Anlegen von Gleichstrom ein elektrisches Feld erzeugt, dessen Stärke von der Gellänge und der Differenz des Potentials an den Enden bestimmt wird (McDonell, 1977; Southern, 1979).

Für die Elektrophorese wurde Agarose in 1x TAE-Puffer erhitzt, 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben und in eine horizontale Gelapparatur gegossen und eine Spannung von 5 - 10 V pro cm Gel angelegt. Je nach Größe der DNA-Proben wurden bei Molekülen größer als 10 kb 0,8 %ige Gele verwendet; unterhalb 10 kb 1 %ige Agarosegele. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 6x Probenpuffer versetzt. Für die Bestimmung der DNA-Größen wurde ein Längenstandard aufgetragen, welcher in Fragmente definierter Größe

aufgetrennt wird. Die Laufbanden der DNA wurden unter UV-Bestrahlung bei 366 nm mit einer Videodokumentationsstation sichtbar gemacht.

2.1.4 DNA-Konzentrationsbestimmung

2.1.4.1 UV-Absorption

Für die Konzentrationsbestimmung von DNA wird die Absorptionsspektroskopie angewendet, denn DNA-Moleküle absorbieren Licht maximal bei einer Wellenlänge von 260 nm. Durch Anwendung und Umstellung des Lambert-Beerschen Gesetzes lässt sich die Konzentration der lichtabsorbierenden Probe bestimmen.

$$E = \log \frac{I}{I_0} \varepsilon d c$$

I/I_0 = Intensität
 ε = Extinktionskoeffizient
 d = Schichtdicke der Küvette

Die optische Dichte (OD_{260}) von 1 bei doppelsträngiger DNA entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$. Dieser Wert sowie der Verdünnungsfaktor (VF) der zu messenden Probe werden in die Formel für die Konzentration einbezogen.

$$c = E \times \text{VF} \times 50 \text{ } [\mu\text{g/ml}]$$

Die Messungen erfolgten mit einem Eppendorf-Photometer.

2.1.4.2 Agarosegel

Die UV-Absorption ist für die Konzentrationsbestimmung von DNA in einem Gemisch nicht geeignet. Eine Möglichkeit besteht in der Auftrennung der DNA im Agarosegel und dem Vergleich über einen Standard mit bekanntem DNA-Gehalt.

Hierfür wurde die Probe mit einem Längenstandard als Referenz im Agarosegel elektrophoretisch separiert. Nach der Dokumentation des Gels erfolgte die Analyse mit dem Programm TotalLab der Firma Phoretix, wobei jeweils die Pixelanzahl des Standards und der gesuchten Bande ausgewertet wurden. Über eine Verhältnisgleichung wurde die Konzentration der DNA-Bande unter Berücksichtigung der aufgetragenen Volumina errechnet.

2.1.5 Modifikation von DNA

2.1.5.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation, den Restriktionsstelleneinbau oder die Addition eines Desoxyadenins am 3' OH - Ende nutzt man die Methode der Polymerasekettenreaktion. Mit dieser Technik ist man in der Lage den Ablauf der DNA-Replikation *in vitro* durchzuführen. Als Bausteine der neuen DNA-Fragmente wird ein Gemisch aus desoxygenierten Nukleosidtriphosphaten (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) verwendet. Mit Hilfe spezieller Primer, d.h. kurzer synthetischer Oligonukleotide, die als Startmolekül dienen, wird das Gen durch eine thermostabile Polymerase spezifisch synthetisiert. Sind in der Primersequenz Restriktionsstellen integriert, können diese nach Genamplifikation mit Hilfe von Restriktionsenzymen geschnitten werden (2.1.5.2). Die modifizierten Gene sind somit für eine spätere Verknüpfung mit dem Vektor vorbereitet (2.1.5.8).

Die Taq-Polymerasen besitzen die Eigenschaft, unter einem zeitabhängigen Temperatureinfluß an die 3' OH-Enden der neuen Fragmente ein Desoxyadenin zu synthetisieren. Die zusätzlich erworbenen Adenine können dann in weiteren Klonierungsschritten mit den 5' OH-Enden eines T-Überhangvektors verknüpft werden. Die Taq-Polymerase behält auch bei sehr hohen Temperaturen ihre Enzymaktivität, die für die Trennung des DNA-Doppelstranges notwendig sind.

Der Ablauf der PCR setzte sich aus folgenden Schritten zusammen:

Bei einer Temperatur von 94°C fand die Einleitung der Denaturierung des Doppelstranges statt. Das Binden der Primer (Annealing) erfolgte bei den für die Primerpaare spezifischen Temperaturen, meistens im Bereich von 50° - 65°C. Anschließend wurden mit Hilfe der Polymerase die neuen DNA-Stränge synthetisiert, dabei gilt für 1.000 bp eine Synthesezeit von 1 min. Alle Temperaturstufen wurden in 30 – 35 Zyklen durchlaufen. Als letzter Schritt wurden bei 72°C für 5 - 10 min die Enden der PCR-Produkte geglättet. War ein Anheften des Desoxyadenins erforderlich, wurde der letzte Schritt der PCR auf 20 min verlängert.

Die Zusammensetzung einer PCR-Reaktion mit folgenden Komponenten:

Vorwärtsprimer	0,4 µM
Rückwärtsprimer	0,4 µM
dNTPs	0,4 mM
10x Taq-Puffer	1x
MgCl ₂	1 mM
Taq-Polymerase	0,02 U/µl

Für die Synthese von PCR-Produkten aus Plasmiden wurden 0,3 – 0,6 ng/µl Plasmid-DNA pro PCR-Ansatz eingesetzt.

2.1.5.1.1 *Kolonie-PCR*

Das Screening von rekombinanten Bakterienklonen erfolgte u.a. mit der Kolonie-PCR. Hierfür wurden Bakterienkolonien von einer LB-amp-Platte mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und anschließend die Pipettenspitzen in 50 µl H₂O gespült. Der Aufschluss der Bakterien erfolgte durch Aufkochen der Proben bei 95°C für 2 min. Anschließend wurde der Zelldebris für 2 min bei 14.000 g abzentrifugiert und 10 µl des Überstandes in einem 50 µl PCR-Ansatz eingesetzt.

2.1.5.1.2 *Duplex-PCR*

Für die Amplifikation von zwei PCR-Produkten in einem Reaktionsgefäß wurden die spezifischen Primer für jedes Amplikon im gleichen Verhältnis pipettiert.

2.1.5.2 Restriktionsverdau

Für die Klonierung eines rekombinanten DNA-Transportmoleküls und andere molekularbiologische Arbeiten werden Restriktionsendonukleasen eingesetzt, die an definierten Stellen der doppelsträngigen DNA schneiden.

Der Ablauf des Restriktionsverdaus wird durch die Effizienz der Enzyme im Reaktionspuffer bedingt. Als Faustregel für das Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen gilt: 1µg DNA wird mit 1 U Enzym in 30 min bei 37°C komplett geschnitten. In dieser Arbeit wurde der Ablauf der Restriktion nach den empfohlenen Angaben des Herstellers an die verwendeten Enzyme (Material) angepasst.

2.1.5.3 Einzelstrangbruch (Nicking)

Eine Besonderheit bei den DNA-schneidenden Enzymen stellen die sogenannten Nickasen dar. Abgeleitet von herkömmlichen Restriktionsenzymen schneiden diese ebenfalls an für sie spezifischen Stellen innerhalb der DNA. Das Schneiden findet dabei nur an einem Strang statt, was zu einer Entspannung verdrillter Plasmide führt.

Das Nicking von Plasmid-DNA mit den Enzymen N.BvC IA und IB erfolgte wie unter 2.1.5.2 beschrieben.

2.1.5.4 T7-Exonukleaseverdau

Die T7-Exonuklease ist in der Lage, doppelsträngige DNA am 5'-Ende anzugreifen und in Mononukleotide und ssDNA zu spalten (Kerr & Sadowski, 1971). Das Enzym ist sogar an Einzelstrangbrüchen aktiv und hydrolysiert dort die DNA.

Die Reaktion mit der T7-Exonuklease erfolgte bei 25°C. Für den kompletten Verdau des Plasmideinzelstranges wurde der Verdau über Nacht durchgeführt.

2.1.5.5 Verknüpfung von Einzelstrangplasmiden mit der Topoisomerase I

Die Topoisomerasen werden hauptsächlich zum Verknoten von zirkulärer DNA zu Catenanen (Ketten) bzw. zu deren Entknoten eingesetzt (Tse & Wang, 1980). Eine weitere funktionelle Eigenschaft des Enzyms Topoisomerase I aus *E. coli* ist die Verknüpfung von Einzelstrangplasmiden über Einzelstrangbrüche und deren Ligation (Kirkegaard & Wang, 1978).

Für diese Arbeit wurde die Topoisomerase I zusammen mit Plasmideinzelsträngen bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.1.5.6 De- und Phosphorylierung von DNA

Für eine effiziente Ligation von DNA-Strängen ist es wichtig, dass diese an ihren Enden phosphoryliert sind. Bei der Synthese von Oligonukleotiden findet keine Phosphorylierung der Enden statt. Diese kann nachträglich an den Syntheseprozess angeschlossen werden. In der Laborpraxis werden dafür Polynukleotidkinasen eingesetzt, die den Transfer eines Phosphats an das freie 5'OH-Ende der DNA katalysieren.

Synthetisierte Oligomere (0,4 pmol) wurden in einer Reaktion mit 4 U T4 Polynukleotidkinase für 2 h bei 37°C phosphoryliert.

Im Gegensatz dazu, ist die Phosphorylierung der 5'OH-Enden bei Plasmiden (nach dem Schneiden mit nur einem Enzym oder glatte Schnitte) für eine Ligation mit Fremd-DNA unvorteilhaft, da diese Plasmide religieren können.

Die Dephosphorylierung von Plasmid-DNA erfolgte mit der *Calf Intestine Alkaline Phosphatase* (CIAP) in direktem Anschluss an das Linearisieren der Plasmid-DNA, wobei 10 µg linearisierte Plasmid-DNA mit 1 U CIAP für 1 h bei 37°C inkubiert wurde.

2.1.5.7 Hybridisierung von Einzelstrang-DNA

Bei der Synthese eines palindromischen Oligomers wird bereits während der Elongation eine Stammstruktur ausgebildet. Da dieser „Stamm“ nur ein offenes Ende besitzt, kann er nicht mehr kloniert werden. Um diesen Struktureffekt zu verhindern, werden 2 komplementäre Oligomere über ein klebriges Ende mit sich selbst ligiert.

Für die Hybridisierung wurden die Oligomere zu gleichen Teilen in einem Reaktionsansatz bei 95°C für 5 min erhitzt und anschließend bei Raumtemperatur abgekühlt.

stem1.1/stem1.2:	Stamm
loop-CCCAC/loop-gggTg:	Schleife
Nick1A/Nick1B:	Nickase

2.1.5.8 Kovalente Verknüpfung von Vektor und PCR-Produkt

Dieser Vorgang, auch Ligation genannt, wird durch die Ligase katalysiert. Sie verknüpft das Zuckerphosphatrückgrat der DNA und schließt somit den Einbau des Fragmentes in den Vektor ab. Für die Ligationsreaktion ist aufgrund der geringeren Größe der PCR-Produkte gegenüber den Vektoren, ein Insertüberschuss notwendig. Für die Berechnung der Reaktion wurden die Größen beider Komponenten berücksichtigt:

$$(100 \text{ ng Vektor} \times \text{kb Insert/kb Vektor}) \times 5 = \text{ng Insert}$$

Pro Reaktionsansatz wurde wie folgt pipettiert:

Vektor	≥ 500 ng
PCR-Produkt	x ng
10x T4 Ligasepuffer	1 x
T4 Ligase (40 U/μl)	2 μl

Für eine erfolgreiche Verknüpfung wurde ein Reaktionsvolumen von 20 μl nicht überschritten. Die Ligationsreaktion wurde bei 16°C über Nacht in einer PCR-Maschine durchgeführt.

2.1.6 *In vitro* Transkription

Für die *in vitro* Transkription wurde das Kit Riboprobe von Promega verwendet. Die Reaktionen in Lösung wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.1.6.1 DNA-Verdau

Nach den Transkriptionsreaktionen in Lösung und auf der Oberfläche wurde die noch vorhandene oder eventuell abgelöste Matrizen-DNA in einem anschließenden Verdau durch eine RNasefreie DNase I (Roche) entfernt. Hierfür wurden je nach Ansatz 5 - 10 U DNase eingesetzt. Der Verdau erfolgt für mind. 30 min bis max. 90 min bei 37°C. Zum Reinigen der RNA wurde nach dem DNA-Verdau eine Phenol/Chloroformfällung sowie Ethanolfällung angeschlossen.

2.1.6.2 RT-PCR

Die instabile RNA wird für die Analyse in die stabilere cDNA (complementary DNA) umgeschrieben und über eine Amplifikationsreaktion vermehrt.

Die transkribierte RNA wurde mittels Reverser Transkription mit nachfolgender PCR-Amplifikation nachgewiesen. Hierfür wurde die gefällte RNA in 12 µl DEPC-H₂O resuspendiert. 5 µl der RNA wurde für Anwendung in der PCR auf Eis gelagert. Zu 7 µl RNA wurden 4 µl dNTPs (je 10 mM) und 1 µl Oligo(dT)-Primer (0,5 µg/µl) pipettiert.

Für die Bindung der Oligo (dT) Primer am PolyA-Schwanz der mRNA wurden die Proben als erstes für 5 min auf 65°C erhitzt und danach auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 4 µl Reaktionspuffer (4x), 2 µl DTT (0,1 M) und 1 µl RNaseinhibitor RNasin zu den Ansätzen pipettiert, und die Umschreibereaktion durch Erwärmen auf 42°C für 2 min vorbereitet. Nach Zugabe von 1 µl M-MLV Reverser Transkriptase (200 U/µl) wurde die Umschreibereaktion eingeleitet und bei 42°C für 50 min fortgesetzt. Die Transkriptase wurde anschließend durch Erhitzen der Proben auf 70°C für 10 min inaktiviert. Die synthetisierte cDNA wurde in einer PCR amplifiziert, wobei 1 µl cDNA zu einem 25 µl PCR-Ansatz gegeben wurde.

2.1.7 *In vitro* Translation

Für die Synthese von Proteinen wurden zwei verschiedene *in vitro* Translationskits auf Basis von *E. coli*-Lysat getestet. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers gearbeitet. Für die Modifikation der Reaktion wurden in einen 50 µl Translationsansatz 2 µl T7-RNA-Polymerase, 4 µl rNTPs (10 mM), 1 µl acetyliertes *Bovines Serum Albumine* (BSA, 20 mg/ml)

und 0,5 µl Methionin (1 mM) pipettiert. Die Proben wurden anschließend für die SDS-Gelelektrophorese vorbereitet (2.1.8).

2.1.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Bei der SDS-Elektrophorese werden Proteine in Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat (SDS) im Polyacrylamidgel getrennt (Laemmli, 1970).

Zunächst wurde in einer Vertikalelektrophorese-Apparatur ein 12 %iges Trenngel hergestellt, welches nach dem Auspolymerisieren mit einem 6 %igem Sammelgel überschichtet wurde. Die beiden Geltypen besitzen einen unterschiedlichen pH-Wert, der beim Übergang von Sammel- zu Trenngel in den alkalischen Bereich wechselt. Dies bewirkt eine Ionisierung des Glycins in seine anionische Form und führt somit zur Bildung einer starken Lauffront für die Proteinwanderung in Richtung Anode. Vor der Befüllung der Taschen wurden die Proteinlösungen mit 2x Probenauftragspuffer versetzt und in einem Wasserbad für 4 min aufgeköcht. Anschließend wurden die Gele in eine mit Elektrophoresepuffer gefüllte Vorrichtung gestellt und an eine Stromquelle angeschlossen. Der Elektrophoreselauf erfolgte bei 20 mA für ca. 1,5 h.

2.1.9 Immunoblotting

Das Immunoblotting ist ein Verfahren zum Transfer von Protein aus Gelen auf eine Nitrocellulosemembran, welche hauptsächlich aus positiv geladenem Nylon und anderen Materialien besteht. Der Transfer erfolgte über Nacht bei 80 mA. Nach dem Transfer wurden zunächst die freien Bindungsstellen der Membran für eine Stunde mit Blocklösung (5% Magermilch) blockiert. Um die überschüssige Magermilch zu entfernen, wurde die Membran gründlich mit Waschlösung (1x PBS/ 0,05% Tween) für 5 min gewaschen. Der Waschschrift wurde insgesamt 5x wiederholt, bevor die Inkubation mit dem ersten Antikörper in PBS/Tween erfolgte. Nach dieser einstündigen Inkubation wurde die Membran von nicht gebundenem Antikörper durch 5x maliges Waschen mit PBS/Tween befreit. Anschließend wurde die Membran mit der zweiten Antikörperlösung überschichtet und für eine Stunde unter leichtem Schütteln inkubiert. Bevor durch Zugabe der Substratlösung die Farbreaktion induziert wurde, erfolgte ein gründliches Spülen der Membran mit der Waschlösung. Nach der Färbung der Proteine wurde mit H₂O die Reaktion gestoppt und anschließend die Membran nach Trocknung im Dunkeln gelagert.

Für den Nachweis der Proteine wurden die spezifischen IgG-Maus-Antikörper in einer 1:1.000 Verdünnung und das Kaninchen-anti-Maus-Konjugat in einer 1:2.500 Verdünnung eingesetzt. Durch eine enzymatische Farbreaktion, vermittelt durch die Konjugat-gekoppelte

Alkalische Phosphatase und BCIP/NBT-Lösung (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/Nitroblue Tetrazolium) als Substrat, wurden die Ergebnisse der Translationen ausgewertet.

2.2 Arbeiten mit Objektträgern (Chips)

2.2.1 Tropfverfahren

Für die Arbeiten zur Immobilisierung von DNA wurden verschiedene Tropfverfahren eingesetzt. In der Tabelle 3 sind die verwendeten Mikroarrayer aufgelistet.

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Mikroarrayer.

Mikroarrayer	Tropfverfahren	Tropfen-volumen	Positionier-genauigkeit	Vorteile (+) und Nachteile (-)
Nanoplotter „PiezoTip“ (GeSim GmbH Großerkmannsdorf, Dresden)	Ink-Jet (Piezo-Tip)	10pl – 1 nl	15 – 20 µm	+ schnelle Anfahrgeschwindigkeit + bis zu 20 Objektträger - Piezo-Tips verstopfen leicht bei konzentrierten oder nicht wässrigen Lösungen
TopSpot M (HSG- IMIT Villingen- Schwenningen; IMTEK Freiburg)	Ink-Jet	500 – 800 pl	< 20 µm	+ bis zu 40 Objektträger + Kontrolle der Spots mittels Kamera - festgelegter Tropfenabstand durch Druckkopf
sciFLEXARRAYER (Scienion AG, Berlin)	Piezo-Tip (chemisch inert)	100 – 500 pl	5 µm	+ variables Arraydesign + steriles Spotten + bis zu 8 Proben parallel - großes Probenvolumen (40 µl)
„Fused Silica- Kapillare“ („Probot“, bioanalytical instruments bai GmbH, Lautertal)	Kontakt- verfahren „Kapillare“	10nl – 1 µl	<10 µM	+ hohe Positioniergenauigkeit + für alle Lösungsmittel geeignet + Kontrolle der Spots mittels Kamera - keine Paralleldispensierung, nur sequentiell

Der Abstand zwischen den einzelnen Tropfen beträgt bei den getropften Arrays mit dem TopSpot und Nanoplotter 500 μm und bei sciFLEXARRAYER 250 - 500 μm .

In der Mehrzahl der Experimente wurden die PCR-Produkte von Hand getropft, wobei das Volumen zwischen 0,3 - 0,5 μl lag und mit einem Tropfenradius von ca. 1,5 - 2,2 mm je nach Hydrophobizität der Oberfläche.

2.2.2 Modifikation der Glas-Oberflächen

2.2.2.1 Silanisierung

In dieser Arbeit wurden aminosilanisierte Glas-Objektträger der Firmen Genetix und Schott verwendet. Zusätzlich wurden Borsilicat-Objektträger der Firma Roth silanisiert. Hierfür wurden die Objektträger für 40 s in Carosche Säure (Piranha-Lösung) getaucht und durch Spülen mit Wasser gereinigt (Bilitewski *et al.*, 1998) Anschließend wurde die Oberfläche mit 10 M NaOH für 2 h aktiviert. Für die Beschichtung mit Aminosilanen wurden nach einem weiteren Spülschritt mit Wasser die Objektträger in 10 %iger wässriger 3-Aminopropyltriethoxysilan-Lösung (APTES, pH 3,45/ HCl) für 2 h bei 80°C inkubiert. Die Objektträger wurden abermals gründlich mit Wasser gespült und für 10 min bei 500 rpm trocken zentrifugiert. Als letztes wurden die Objektträger entweder bei 120°C für 1 h oder aber unter Stickstoffatmosphäre für 1 - 3 h bei 180° C gebacken.

2.2.2.2 Kopplungsmethoden

2.2.2.2.1 Immobilisierung mit silanisierten $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{-Oligonukleotiden}$

Die auch unter dem Namen „silanisierte Nukleinsäure“ bekannte Kopplungsmethode wurde nach einem veränderten Protokoll von Kumar *et al.* (2000) durchgeführt. Dazu wurden 5'- NH_2C_6 -modifizierte Oligomere mit einem Isocyanatopropyltriethoxysilan „aktiviert“. Zu 100 μl Dimethylsulfoxid (DMSO) und 15 μl 3-Isocyanatopropyltriethoxysilan wurden 10 μl einer 50 μM Oligonukleotid-Lösung gegeben und für 10 min vorsichtig geschüttelt. Danach wurden 175 μl 500 mM NaAc (pH 5,0) pipettiert und die fertige Lösung bis zum Tropfen mind. 10 min geschüttelt, damit die Lösung klar blieb. Die aktivierten Oligomere wurden mit dem Probot auf silanisierte Objektträger getropft und in einer trockenen Kammer für 12 h inkubiert. Vor der Verwendung der Objektträgern wurden diese mit 1x SSC für 10 min gewaschen, und um anschließend die restlichen Salze zu entfernen, 2x für 10 min in Wasser gespült.

2.2.2.2.2 Immobilisierung mit phosphorylierten Oligonukleotiden (EDC-Methode)

Eine weitere kovalente Kopplungsmethode stellt die Kopplung mit EDC (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimide) dar. Hierbei werden 5'-phosphorylierte Oligomere oder PCR-Produkte über einen Reaktionsverstärker an die Aminogruppen der silanisierten Objektträger gebunden (Violeta & Swaisgood, 1982).

Als Aktivierungsreagenz diente 30 mM 1-Methylimidazol (pH 6) mit 5 mg/ml EDC. Die betropften Oberflächen wurden mind. 3 Tage in einer trockenen Kammer inkubiert.

2.2.2.3 Behandlung der Oberflächen

2.2.2.3.1 Blocken nach Diehl

Das Blocken nach Diehl (Diehl *et al*, 2001) verhindert eine unspezifische Anlagerung von Nukleinsäuren an die Oberfläche durch die Passivierung der Oberfläche durch Ladungsumkehr, in diesem Fall von positiv zu negativ. Hierfür wurden die betropften Objektträger zunächst für 5 min in 65°C warme 3x SSC mit 0,2% SDS-Lösung getaucht, um die Oligomere aufzurichten. Die Objektträger wurden mehrfach in Wasser und anschließend bei 600 rpm für 5 min zentrifugiert.

Für das Blocken wurden 0,4 g Bernsteinsäureanhydrid in 70 ml 1,2-Dichlorethan gelöst und die Objektträger für 1h in der Lösung geblockt. Durch ein nachfolgendes, mehrmaliges Spülen in Wasser wurden die Objektträger gereinigt und für die spätere Verwendung trocken zentrifugiert.

2.2.2.3.2 Waschen

Vor der Auswertung der Hybridisierung bzw. Oberflächen-Polymerasekettenreaktion (OnChip-PCR) wurden die Objektträger für jeweils 10 min mit 0,6x SSC und 0,01% SDS, 0,05x SSC und DEPC-H₂O gewaschen. Danach wurden die Objektträger für 8 min bei 500 rpm zentrifugiert.

Die Objektträger für die Transkription und Translation wurden für jeweils 15 min in 6x SSC und 0,2 % SDS, 6x SSC und DEPC-H₂O in ausgebackenen Bechergläsern gewaschen und anschließend unter der Sterilbank getrocknet.

2.2.2.4 Auslesen der Oberflächen

Die Arrays mit den fluoreszenzmarkierten Oligomeren wurden am ArrayWorx-Scanner, Affymetrix-Scanner oder LSM (*laser scanning microscope*) ausgelesen und die Rohdaten der Fluoreszenzintensitäten mit Hilfe der ImaGeneTM-Software ausgewertet. Am ArrayWorx-Scanner wurde mit einer Auflösung von 97.500 (Kantenlänge eines Pixels 9,765 μm) und einer Belichtungszeit von 0,3 s für den Cy5-Farbstoff oder 0,1 s für den Cy3-Farbstoff gearbeitet.

In der Tabelle 4 sind die verwendeten Fluorophore und ihre Eigenschaften aufgelistet.

Tab. 4: Überblick über die Fluoreszenzfarbstoffe und ihren Anregungs- und Emissionswellenlängen.

Farbstoff	Anregung	Emission
FITC, FAM	495 nm	520 nm
Cy5	649 nm	670 nm
Cy3	548 nm	570 nm

2.2.3 Oberflächen-Synthesen

Alle Arbeiten wurden mit DEPC-behandelten Puffern, Filter-Pipettenspitzen und mit gebackenen Bechergläsern und Pinzetten (180°C, 3 h) durchgeführt.

2.2.3.1 Oberflächen-Polymerasekettenreaktion (OnChip-PCR)

Zuerst wurde die PCR-Matrize in einer *in vitro* Transkription synthetisiert. Dazu wurde in einer 100 μl Reaktion 800 ng pX-Plasmid-DNA eingesetzt und die Transkription bei 37°C, 350 rpm für 1,5 h durchgeführt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA durch einen DNA-Verdau (20 U) mit anschließender Fällung (2.1.2.4) entfernt. Die RNA wurde in 40 μl DEPC-H₂O resuspendiert. Davon wurden 35 μl für eine Umschreibung in cDNA verwendet. Die Umschreibereaktion fand in einem Volumen von 100 μl statt (2.1.6.2). Für die OnChip-PCR wurden verschiedene Verdünnungen der cDNA-Lösung eingesetzt.

Es wurden mit dem TopSpot 50 μM spezifische Primer in Methylimidazol/EDC-Lösung auf Genetix und Schott-Objektträger getropft und eine Kopplungsdauer von mind. 2 Tagen eingehalten. Nach dem Blocken mit 5% BSA +0,05% SDS und Waschen (2.2.2.3) der Objektträger wurden als Reaktionsräume 25 - 35 μl Rahmen aufgeklebt.

Tab. 5: PCR-Ansätze und Komponenten zur Synthese Oberflächen-immobilisierter PCR-Produkte.

	Kontrolle ohne cDNA	Kontrolle ohne Polymerase	vollständiger Ansatz
10x Immobilasepuffer	1x	1x	1x
50 mM MgCl ₂	6 mM	6 mM	6 mM
10 mM dNTP-Mix	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM
10 µM Rückwärtsprimer	0,8 µM	0,8 µM	0,8 µM
cDNA (Verdünnungen)	-	1 µl	1µl
DMSO	5%	5%	5%
Immolase (5U/µl)	2 U	-	2 U

Die PCR wurde jeweils komplett, ohne cDNA und ohne Polymerase in die Rahmen pipettiert (Tab. 5).

Die PCR-Reaktion wurde im PTC 200 Tower (*In situ*-Hybridisierungstower) mit folgendem PCR-Programm durchgeführt:

7 min 95°C,

45 s 95°C, 58° C 30 s, 70°C 2 min 34 Zyklen

3 min 70°C, 30 s 95° C, 30 min 58°

Zum Schluß wurden die Objektträger bei 4° C gekühlt. Die Objektträger wurden gewaschen (2.2.2.3.2) und anschließend am Affymetrix-Scanner ausgewertet (2.2.2.4).

2.2.3.2 Oberflächen-Transkription (OnChip-Transkription)

Zuerst wurden die Objektträger mit 25 µl – 65 µl nukleasenfreien Kleberahmen (Abgene, Hamburg) beklebt (stark klebende Seite auf die Oberfläche). Die PCR-Produkte wurden mittels EDC-Methode (2.2.2.2.2) auf der Oberfläche gekoppelt, wobei die Matrizen überwiegend per Hand getropft wurden. Die Objektträger wurden mind. 3 Tage in einer trockenen Kammer inkubiert und vor der Oberflächenreaktion gewaschen (2.2.2.3.2).

Die Reaktionskomponenten wurden wie folgt pipettiert:

9 µl DEPC-H₂O

8 µl rNTPs (je 10 mM)

5 µl 5x Transkriptionspuffer

2 µl DTT (100 mM)

1 µl RNasin (40U/µl)

2 µl T7-RNA-Polymerase (10U/µl)

Von dem Reaktionsansatz wurden 26 µl in die 25 µl Rahmen und 50 µl in die 65 µl Rahmen pipettiert und die Rahmen mit einer Schutzfolie abgedeckt. Zur Vermeidung von Trocknungseffekten wurde die Folie fest an den Kleberahmen angedrückt.

Die Transkription fand im PTC-200 Tower für 3 h bei 37°C statt, wobei eine Einstellung der Masse von 11,5 g angegeben wurde.

Nach der Oberflächensynthese wurde die Schutzfolie vorsichtig abgezogen und die Reaktionsflüssigkeit, die sich zwischen Folie und Rahmen sammelte, abpipettiert, wobei darauf geachtet wurde, die Oberfläche nicht zu berühren.

Die RNA-Lösung wurde in 1,7 ml Reaktionsgefäße mit bereits vorgelegtem DNase-Puffer überführt. Die Probe wurde mit DEPC-H₂O auf ein Endvolumen von 50 bzw. 100 µl aufgefüllt, bevor die DNase I zugegeben wurde. Nach dem DNA-Verdau (2.1.6.1), der Fällung (2.1.2.4) und der RT-PCR (2.1.6.2) wurden die Ergebnisse mittels Agarosegelelektrophorese (2.1.3) dokumentiert.

2.2.3.3 Oberflächen-Translation (OnChip-Translation)

Für diese Experimentierreihe wurden Genetix und Schott-Objektträger verwendet, die mit 65 µl Rahmen (Abgene) beklebt wurden. Die Immobilisierung der PCR-Produkte und Vorbereitung der Objektträger fand wie unter (OnChip-Transkription) statt.

Die Proteinsynthese wurde im PTC-200 Tower und im SlideBooster (Mixlevel 14, Pulseratio 3:7) für mind. 3 h durchgeführt. Anschließend wurden die Proben vorsichtig abpipettiert und für die SDS-Gelelektrophorese (2.1.8) vorbereitet. Es wurde von jedem Reaktionsansatz 20 µl auf das SDS-Gel aufgetragen und die aufgetrennten Proteine anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Das Immunoblotverfahren wurde wie unter 2.1.9 beschrieben durchgeführt.

2.2.4 Oberflächen-Hybridisierungen

2.2.4.1 Hybridisierung Cy5-markierter RNA

Die RNA wurde mit dem Einbau von Cy5-Aminoallyl-UTPs markiert. Hierfür wurden zu einem 50 µl *in vitro* Transkriptionsansatz (2.1.6), 12 µl ATP/CTP/GTP-Lösung (je 25 mM), 4 µl UTP (50 mM) und 12 µl Cy5-aminoallyl-UTPs (100 nM) pipettiert. Als Matrize diente 240 ng linearisiertes Plasmid pET-EGFP (pX). Die Kontrollen wurden mit DEPC-H₂O oder mit unmarkierten Nukleotiden durchgeführt. Nach dem DNA-Verdau (2.1.6.1) wurden die RNA-Proben mit dem Qiaquick PCR Aufreinigungskit (2.1.2.3) aufgereinigt und die Proben mit 25 µl DEPC-H₂O resuspendiert.

Auf Genetix-Objektträger wurden RNA-Sonden (30 μM), sowie Kontroll-Sonden (30 μM) und Immobilisationskontrollen (1 μM) mit Hilfe des TopSpots getropft. Die Kopplung fand mittels EDC-Methode statt und die Objektträger wurden mind. 1 Woche lang in einer trockenen Kammer gelagert. Für die Hybridisierungen wurden die Objektträger nach Diehl geblockt und mit 25 μl Rahmen beklebt. Pro Hybridisierungsreaktion wurden 6,5 μl 4x Hybridisierungspuffer, 12,5 μl 100 % Formamid und 6 μl der aufgereinigten RNA als Lösung in die Rahmen pipettiert. Das Hybridisieren der RNA fand bei einem langsamen Temperaturabfall von 55°C zu 37°C innerhalb von 6 Stunden statt. Nach dem Waschen wurden die Objektträger ausgelesen.

2.2.4.2 Hybridisierung von Stammschleifen-Strukturen

2.2.4.2.1 Vorversuch

Als Vorversuche zur Hybridisierung von Stammschleifen-tragenden Plasmidstrukturen wurde ein kurzes Stammschleifen-Konstrukt mit einer FAM-Markierung generiert und dieses anschließend an einer immobilisierten Sonde gebunden. Dazu wurden je 20 μg der beiden Oligomere für 2 min bei 95°C erhitzt und durch langsames Abkühlen bei Raumtemperatur hybridisiert.

Für die Oberflächenexperimente wurden als Sonden silanisierte $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{-Oligonukleotide}$ an silanisierten Objektträger immobilisiert (2.2.2.2.1). Als Kontrolle wurde eine Sonde getropft, die eine geringe Homologie zum Stammschleifen-Konstrukt besitzt. Nach dem Waschen (2.2.2.3.2) wurden die Objektträger mit 25 μl Rahmen beklebt und das Hybrid (90 ng/ μl) in Hybridisierungspuffer für 3 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach dem Entfernen des überschüssigen Hybrids durch das Waschen mit 1x SSC und H_2O wurden die Objektträger am LSM untersucht.

2.2.4.2.2 Nicking

Das Plasmid pX-DL_n wurde zuerst durch einen Einzelstrangbruch relaxiert. Dazu wurde 3,6 μg Plasmid-DNA mit der Nickase N.BbvC IA oder IB in zwei separaten Ansätzen behandelt (2.1.5.3) und die relaxierte DNA mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und mit QiaExII-Kit aufgereinigt. Die DNA wurde im Konzentrator pelletiert und in 19 μl 10 mM Tris/HCl resuspendiert.

2.2.4.2.3 Markierung mit Schleifen-spezifischen Cy5-Sonden

Zu den relaxierten und aufgereinigten Plasmiden wurde 1 μ l Cy5-Sonde (10 μ M) pipettiert und nachfolgend hybridisiert (5 min 95°C, 5 min 65°C in 10 Zyklen, 2 h 65°C). Als Kontrollen wurden unbehandeltes pX-DLn- und pX-n-Plasmid eingesetzt. Um die ungebundenen Sonden zu entfernen, wurden die Proben mittels Millipore-Säulen aufgereinigt und die Hybride in 20 μ l DEPC-H₂O eluiert.

Relaxierter Strang (A-genickt)	CAconan-Cy5
Relaxierter Strang (B-genickt)	GTran-Cy5
pX-DIn	CAconan-Cy5/GTran-Cy5
pX-n	CAconan-Cy5/GTran-Cy5

2.2.4.2.4 Oberflächen-Hybridisierung

Für die Hybridisierung der Cy5-markierten, einzelsträngigen Stammschleifen-Plasmide wurden mittels EDC-Methode Sonden auf Genetix-Objektträger immobilisiert. Hierfür wurden die unmarkierten Sonden (10 μ M) mit dem TopSpot getropft. Die Vorbereitung der Objektträger erfolgte wie unter (2.2.2.3.1) beschrieben. Als Reaktionsräume dienten Deckgläser mit kleinen parallelen Spacern (Lifterslips), in denen 8 μ l der Hybride pipettiert wurden. Die Hybridisierung fand in einer feuchten Kammer über Nacht bei 58°C statt. Vor der Auswertung mit dem ArrayWorx wurden die Objektträger gewaschen (2.2.2.3.2).

3. Material

3.1 Geräte

Ultraschallbad	Sonorex RK100H	Bandelin electronic, Berlin
Slide Booster		Advalytix, Brunnthal
PCR-Maschine	<i>In situ</i> -PTC-200	MJ Research, Waltham, MA, USA
Agarosegelelektrophorese		
Elektrophoreseappartur	40-0708; 40-0911	peq-lab, Erlangen
Videodokumentation	Biostep	Jahnsdorf
Software	Phoretix Totallab 2.00 Phoretix Grabber 3.01	Nonlinear-Dynamics Ltd. Nonlinear-Dynamics Ltd, Newcastle, UIK
Elektrophoreseapparatur	Mini Protean	Biorad, München
Vertikalschüttler	Swip-Schüttler	Edmund Bühler, Hechingen
Zentrifugen		
Bakterien	Avanti™ J-25	Beckmann Coulter, Fullerton, USA
Tisch	5415 D, 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Thermoschüttler	Thermomixer compact Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg
Bakterienschüttler	innova 4000	
Sterilbank	Heraafe	Heraeus, Hanau
Bakterieninkubator	Heraeus incubator	Heraeus, Hanau
Konzentrator	Speedvac concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Photometer	Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Scanner		
Laser Scanning Microscop (LSM)	Axiovert 100M Lasos	Zeiss, Jena Lasertechnik GmbH
Affymetrix-Scanner	428™ Array Scanner	Affymetrix, Santa Clara, USA
ArrayWorX	ArrayWorXe	Applied Precision, Issaquah, USA
Software	ImaGene5	Biodiscovery Inc., LA, USA

3.2 Materialien

3.2.1 Kultur von Bakterien

Medien	Zusammensetzung	Vertrieb
<i>Anzucht von Bakterien</i>		
LB-Medium	10 g Trypton, 5g Hefeextrakt, 10 g NaCl ad 1l H ₂ O	Applichem, Darmstadt
LB-Agar	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 15 g Agar ad 1l H ₂ O	Applichem, Darmstadt
Ampicillin 100 mg/ml	Gelöst in H ₂ O	Applichem, Darmstadt
<i>Transformation von Bakterien</i>		
Transformationspuffer 1	80 mM MgCl ₂ , 20 mM CaCl ₂	Applichem, Darmstadt
Transformationspuffer 2	100 mM CaCl ₂	Applichem, Darmstadt
SOC-Medium	20 g Trypton, 24 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 250 mM KCl, 20 ml Glucose as 1 l H ₂ O	Applichem, Darmstadt

3.2.2 Aufreinigung von Nukleinsäuren

Material	Vertrieb
Montage PCR Filter Units	Millipore, Schwalbach
Nucleospin®-Extract	Macherey-Nagel, Düren
NucleoBond®-PC20, PC100	Macherey-Nagel, Düren
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Montage Gel Extraction Kit	Millipore, Schwalbach
99 Ethanol	Roth, Karlsruhe
LiCl	Applichem, Darmstadt
Phenol _{equilibrirt, stabilisiert} :Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)	Applichem, Darmstadt
3 M Natrium-Acetat-Lösung pH (5,2)	Applichem, Darmstadt

3.2.3 Agarosegelelektrophorese

Medien	Zusammensetzung	Vertrieb
TAE-Puffer (50x)	242 g Tris, 57,1 ml Eisessig, 100 ml EDTA (0,5 M) ad 1 l H ₂ O	Applichem, Darmstadt
Ethidiumbromidlösung	1 µg in 100 ml	Applichem, Darmstadt
Ladepuffer	6x	Fermentas St. Leon-Roth
Agarose	Low EEO	Applichem, Darmstadt
Standards	Hyperladder I, II, IV, V, pEQ-Ladder 500	Bioline, Luckenwalde peqlab, Erlangen

3.2.4 Enzyme, Chemikalien und Lösungen

Name	Vertrieb
<i>Klonierung der Gensequenzen</i>	
Xba I, BamH I, T4 Ligase	Fermentas St. Leon-Roth
<i>Klonierung der Stamm- und Schleifen-Sequenzen</i>	
EcoRI, Mun I, Pvu II, Calf intestine alkaline phosphatase (CIAP), T4 Polynukleotidkinase, T4 Ligase	Fermentas, St. Leon-Roth
<i>Klonierung der Nickaseschnittstelle</i>	
Bgl II, T4 Ligase	Fermentas, St. Leon-Roth
SgrA I, Sph I, Spe I,	New England Biolabs, Schwalbach
<i>Stamm Schleifen-Plasmid-Modifikation</i>	
N.BbC IA, N.BbC IB, T7 Exonuclease, Topoisomerase I	New England Biolabs, Schwalbach Fermentas, St. Leon-Roth
<i>PCR</i>	
BIOTAQ™ DNA-Polymerase, REDTAQ™ DNA-Polymerase, Immolase™	Bioline, Luckenwalde
dNTPs (100 mM)	Bioline, Luckenwalde
10x NH ₄ -Puffer	Bioline, Luckenwalde
50 mM MgCl ₂	Bioline, Luckenwalde
DMSO	Applichem, Darmstadt
DEPC-H ₂ O	Applichem, Darmstadt
<i>Transkription und Reverse Transkription</i>	
T7 RNA-Polymerase (10 U/ µl)	Promega, Mannheim
RNasefreie DNase I (20 U/µl)	Roché, Penzberg®
recombinant RNasin (40 U/µl)	Promega, Mannheim
Riboprobe® in vitro transcription systems	Promega, Mannheim
10x DNasepuffer	Ambion, Woodward, USA
100 mM DTT	Promega Mannheim
5x Transkriptionspuffer	Promega, Mannheim
5x Reverse Transkriptionspuffer	Promega, Mannheim
M-MLV Reverse Transkriptase (200U/µl)	Promega, Mannheim
OligodT-Primer (5'-TTT TTT TTT TTT TTT-3') (0,45 µg/µl)	Roth, Karlsruhe
Cy5-Aminoallyl-UTP (100nM)	Amersham, Freiburg
rATP, rCTP, rGTP, rUTP (100 mM)	Promega, Mannheim

3.2.5 *In vitro* Translation

Material	Vertrieb
EasyXpress Protein Synthesis Kit	Qiagen, Hilden
<i>In-vitro</i> -PBS-Kit	RiNA, Berlin
<i>Modifikationen</i>	
Acetyliertes Bovines Serum Albumin (BSA), BSA-acetylated (20 mg/ml)	Ambion, Woodward, USA
Methionin (1 mM)	Promega, Mannheim

3.2.6 SDS-Gelelektrophorese und Immunoblotting

Medien	Zusammensetzung	Vertrieb
SDS-Laufpuffer	14,41 g Glycin, 3,03g Tris, 1 g SDS ad 1 l	Applichem, Darmstadt
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8), 0,4 % SDS	Applichem, Darmstadt
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl (pH 6,8), 0,4 % SDS	Applichem, Darmstadt
Sammelgel 6% (2 Gele)	Acrylamid-bisAcrylamid (30%)	0,75 ml
	Sammelgelpuffer	1,25 ml
	Temed	5 µl
	H ₂ O	3 ml
	Ammoniumpersulfat (10%) APS	50 µl
Trenngel 12% (2 Gele)	Acrylamid-bisAcrylamid (30%)	0,75ml
	Sammelgelpuffer	2,5 ml
	Temed	10 µl
	H ₂ O	3,5 ml
	Ammoniumpersulfat (10%) APS	50 µl
Transferpuffer	25 mM Tris/HCl (pH 7,4), 192 mM Glycin, 10% Methanol	Applichem, Darmstadt
10x PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄	Applichem, Darmstadt
Magermilch-Blockingreagenz	2,5g Magermilch ad 50 ml H ₂ O	Applichem, Darmstadt
Waschpuffer	1x PBS + 0,05% Tween 20	Applichem, Darmstadt
Standard	Prestained PageRuler	Fermentas, St.-Leon-Roth
Ladepuffer		Applichem, Darmstadt
BCIP-NBT-Lösung	BCIP/NBT Purple Substrate For Membranes	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Milchpulver		Applichem, Darmstadt
Transferfolie	Optitran BA-S83 Reinforced NC, 0,2 µm	Schleicher & Schuell, Dassel
Whatmanpapier	GB 003 Gel-Blottingpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
<i>Antikörper</i>		
Kaninchen-Anti-Maus-Konjugat	Anti-Mouse IgG, Heavy and Light Chain specific (Rabbit) Alkaline Phosphatase Conjugat	Calbiochem, Darmstadt
Maus-Anti-GFP	GFP(B-2) mouse monoclonal IgG _{2a}	Santa Cruz, California, USA
Mouse-Anti-FY	Mouse-anti-humanFy6 (Duffy)	BD Pharmingen, Heidelberg
Mouse-Anti-Myogenin	Anti-Myogenin mAb Clone 5F6	Stratagene, La Jolla, USA

3.2.7 Primer, Oligomere für Klonierungen und PCRs

Name	Oligomere	Modifikation
<i>Klonierung der Gensequenzen</i>		
Xba2RBSEGFP	5'-gAg AgA gCT CTA gAg CAA TAA TTT TAA gAA ggA gAT ATA CAA Tgg TgA gCA Agg gCg Agg AgC-3'	
EGFPprevBamH	5'-gCg ggA TCC TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTA CTT gTA CAg CTC gTC CAT-3'	
XbaRBSDuffy	5'-gAg AgA gCT CTA gAg CAA TAA TTT TAA gAA ggA gAT ATA CAA Tgg CCT CCT CTg ggT ATg TCC -3'	
BamHDuffy	5'-gCg ggA TCC TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT gCT Agg ATT TgC TTC CAA ggg TgT CC-3'	
XbaMyog.for	5'-CAC CAC ACA CAT CTA gAg CAA TAA TTT TAA gAA ggA gAT ATA CAA Tgg AgC TgT ATg AgA CAT CC-3'	
BamHMyog.rev	5'-TgT gTg TgT gTg ggA TCC TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TCA gTT ggg CAT ggT TTC gTC Tgg-3'	
<i>Klonierung der Stammschleifen-Plasmide</i>		
Stem1.1	5'-gAT CgA TCg ATC CAA TTg TTT AgA gAg ggg ggg ggg TgT gTg-3'	
Stem1.2	5'-AAT TCA CAC ACC CCC CCC CCT CTC TAA ACA ATT ggA TCg ATC gAT C-3'	
Loop-CCCAC	5'-AAT TCC CCC CAC ACA CAC CCC CAC ACA CAC CCC CAC ACA CAC CCC CAC ACA CAC AAT TgC CCC gg-3'	5'-Phosphat
Loop-ggggTg	5'-AAT TCC ggg gCA ATT gTg TgT gTg ggg gTg TgT gTg ggg gTg TgT gTg ggg gTg TgT gTg ggg gg-3'	5'-Phosphat
Nick1A	5'-CCT gAT gAC gAC TAC TgC TgA TgA CAC TAg TgA CTg CTg Agg ACT gCT gAT gAC gAC TAC TgC TgA g- 3'	5'-Phosphat
Nick1B	5'-CC ggC TCA gCA gTA gTC gTC ATC AgC AgT CCT CAg CAg TCA CTA gTg TCA TCA gCA gTA gTC gTC ATC Agg CAT g-3'	5'-Phosphat
<i>Primer</i>		
T7AflIIIfor	5'-CAg TCA gTA CAT gTT AAT Acg ACT CAC TAT Agg g-3'	
T7AflIIIrev	5'-CAg TCA GTA CAT gTA ATT AAC CCT CAC TAA Agg g-3'	
NickEagfor	5'-gAT CgA TCC ggC CgC CAT gCC ggC gAT AAT gg-3'	
NickBgIIIrev	5'-gAT CgA TCA gAT CTC gAT CCT CTA CgC Cgg-3'	
Hairpinfw	5'-CCC CCC CCC CTC TCT AAA-3'	
<i>Primer für Transkriptionsmatrizen</i>		
T7PromEGFPfw	5'-gAT CgA TAA TAC gAC TCA CTA TAg ggA ggA ggT ATA TCA Tgg TgA gCA Agg gCg Agg AgC-3'	
EGFPprev	5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTA CTT gTA CAg CTC gTC CAT-3'	5'-Phosphat 5'-NH ₂ C6 5'-Biotin
G20T7PromEGFP	ggg ggg ggg ggg ggg ggg ggA TCg ATA ATA CgA CTC ACT ATA ggg Ag	5'-Phosphat
T7Promfor	Agg ATC gAg ATC TCg ATC CCg	5'-Phosphat
T7Promrev	Tgg ATA TCC ggA TAT AgT TCC TCC	5'-Cy5

3.2.8 Arbeiten mit Glas-Oberflächen

Name	Eigenschaften/Zusammensetzung	Vertrieb
<i>Objektträger</i>		
Objektträger	Mattrand, 90° geschliffen, Kalk-Natron-Glas	Roth, Karlsruhe
Genetix-Objektträger	aminosilanisiert, Nukleasefrei	Genetix,
Nexterion Slide A+	aminosilanisiert	Schott, Jena
<i>Reagenzien zur Modifikation und Kopplung</i>		
3-Aminopropyl-trietoxysilan (APTES)		Fluka, Taufkirchen
NaOH		Fluka, Taufkirchen
Carosche Säure	2 Vol H ₂ SO ₄ 1 Vol H ₂ O ₂	Fluka, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid		Fluka, Taufkirchen
3-Isocyanatopropyltriethoxysilan		Fluka, Taufkirchen
Formamid		Fluka, Taufkirchen
Bernsteinsäureanhydrid		Fluka, Taufkirchen
Natriumdodecylsulfat (SDS)		Applichem, Darmstadt
20x SSC	175,32 g NaCl (3M), 88,23g Na ₃ -Citrat (0,3 M)	Applichem, Darmstadt
1,2-Dichlorethan		Applichem, Darmstadt
1-Methylimidazol-Lösung	30mM (pH 6)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimide (EDC)		Applichem, Darmstadt
Hybridisierungspuffer	50 mM Tris/HCl (pH 7), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl	Applichem, Darmstadt
<i>Rahmen und Fixierung</i>		
GeneFrame	25 µl 65 µl	Abgene, Hamburg
Hybridwell	35 µl	Schleicher & Schuell, Dassel
Lifterslip	20x20 mm	Erie Scientific Company, Portsmouth, USA

3.2.9 Plasmide, DNA-Quellen

Plasmid	Größe	Vertrieb
pEGFP	3.400 bp	Stratagene, La Jolla. USA
pBluescript SKII+	2.960	Stratagene, La Jolla. USA
pGEMT-easy	3.015 bp	Stratagene, La Jolla. USA
pET-3a	4640 bp	Novagen, Bad Soden
pCMV-Script	4.300 bp	Stratagene, La Jolla. USA
<i>cDNA</i>		
C2C12	Muskelzelllinie	

3.2.10 Sonden und Primer für Oberflächen-Experimente

Name	Oligomere	Modifikation
CH-3	5'-ACC TTA AgT gTA TTA CAg-3'	5'-Phosphat 3'-Cy5
<i>Primer für OnChip-PCR</i>		
P-CTAG-EGFP-for	5'-CT AGG ATC CgA TAA TAC gAC TCA CTA TAg ggA ggA ggT ATA TCA Tgg TgA gCA Agg gCg Agg AgC-3'	5'-Phosphat
P-CTAG-DFY.for	5'CT AGG ATC CgA TAA TAC gAC TCA CTA TAg ggA ggA ggT ATA TCA Tgg CCT CCT CTg ggT ATg TCC- 3'	5'-Phosphat
EGFPprevCy3	5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTA CTT gTA CAg CTC gTC CAT-3'	5'-Cy3
DFYrevCy5	5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT gCT Agg ATT TgC TTC CAA ggg TgT CC-3'	5'-Cy5
<i>Sonden für die Stammschleifen-Strukturen</i>		
Kontrolle 21926-20	5'-AAC TTC ggT Agg CCT AAT Cg-3'	5'-NH ₂ C6
G20_Amino	5'-ggg ggg ggg ggg ggg ggg gg-3'	5'-NH ₂ C6
J-stemloop	5'-AAT TCg ATC gAT CgA TCT TTg CgC gCg CgC ACA CAC CCC CCC CCC TgT gTg CgC gCg CgC TTT CTA gCT AgC TAg AAg CTTg ATC gAT C-3'	5'-Phosphat
X-stemloop	5'-gAT CgA TCA AgC TTC TAg CTA GCT AgA AAA AAG ATC gAT CgA TCg-3'	5'-FAM
Catch-CT-loop	5'- TTT TTT TTT TTT TTT CTC TCT CTC TCT CTC TCT CTC TCT CTC TCT CTC TCT CTC T-3'	5'-Phosphat
Catch-GA-loop	5'- TTT TTT TTT TTT TTT gAg AgA gAg AgA gAg AgA gAg AgA gAg AgA gAg AgA gAg A-3'	5'-Phosphat
Loop-CCCCAC- Cy5	5'-AAT TCC CCC CAC ACA CAC CCC CAC ACA CAC CCC CAC ACA CAC CCC CAC ACA CAC AAT TgC CCC gg-3'	5'-Cy5
Loop-ggggTg-Cy5	5'- AAT TCC ggg gCA ATT gTg TgT gTg ggg gTg TgT gTg ggg gTg TgT gTg ggg gTg TgT gTg ggg gg -3'	5'-Cy5
<i>Sonden für markierte RNA</i>		
EGFPprev	5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTA CTT gTA CAg CTC gTC CAT-3'	5'-Phosphat
PolyA	5'-AAA AAA AAA AAA AAA-3'	5'-Phosphat
P8	5'-TgT ggg gCA ACT CCC TgC-3'	5'-Phosphat

4. Ergebnisse

4.1. Klonierung

4.1.1 Klonierung der Expressionsplasmide

Die Transkription und Translation von Genen erfordern spezielle DNA-Konstrukte, die neben den regulatorischen Elementen auch die richtige Basenabfolge und Funktionalität besitzen. Hierfür muss eine gleiche Basis geschaffen werden, die über Expressionsplasmide wie den pET-3a Vektor gewährleistet ist.

Diese Arbeit soll auf der Transkription und Translation mit dem T7-Phagen-Expressionssystem aufgebaut werden, wozu das Plasmid pET-3a speziell entwickelt wurde. Als Markergene wurden das EGFP, das menschliche FY-Gen und der Transkriptionsfaktor Myogenin ausgewählt. Alle drei Gensequenzen wurden aus unterschiedlichen DNA-Quellen amplifiziert (Abb. 8).

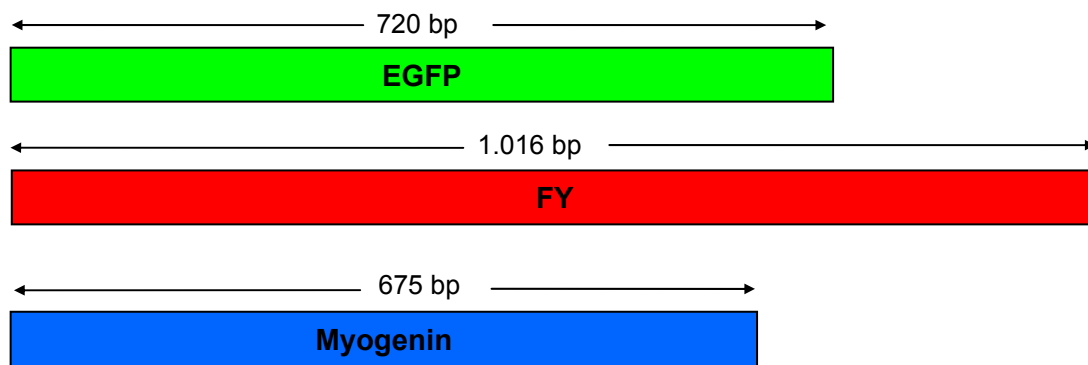


Abb. 8: Schemata der in dieser Arbeit verwendeten Gene.

Für eine funktionelle Expression wurden für alle Gene Primersequenzen konstruiert, die eine Xba-Schnittstelle sowie eine RBS (*ribosomen binding site*) besitzen, da bei einem XbaI-Verdau des Plasmids pET-3a die RBS herausgeschnitten wird. Zusätzlich wurden die Gene gerichtet in den Vektor eingefügt, d.h. über eine zweite Schnittstelle (BamHI), um die Leserichtung des Gens aufrechtzuerhalten.

Für die EGFP-Klonierung wurde mit dem Primerpaar Xba2RBSEGFPfw und EGFPprevBamHI in einer PCR das EGFP-Gen (720 bp) aus dem Plasmid pEGFP amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde nach der Aufreinigung mit XbaI und BamHI geschnitten, ebenso wie das pET-3a-Plasmid und beide miteinander ligiert. Der Ligationsansatz wurde in *E. coli* JM109 transformiert und die gewachsenen Klone mittels Restriktionsanalyse auf den Besitz des EGFP-Inserts getestet. Ein positiver Klon wurde anschließend sequenziert, um die Richtigkeit der Klonierung zu bestätigen.

Das FY-Gen (1.016 bp) wurde aus dem Plasmid pCMV-DFY mit den Primern Xbaduffyfor und BamHduffyrev vervielfältigt, entsprechend dem EGFP-Gen in den Vektor pET-3a ligiert und anschließend in JM109 Zellen transformiert. Der Klonierungserfolg wurde mit einer Kolonie-PCR und der Restriktionsanalyse bestätigt.

Bei der Klonierung der Myogenin-Sequenz (675 bp) aus einem cDNA-Gemisch von C2C12-Zellen gaben es anfänglich Schwierigkeiten, die mit der Zwischenklonierung über einen T-Überhangsvektor behoben werden konnten. Dazu wurde das Amplikon aus der cDNA, welches mit den Primern XbaMyofor und BamHMyorev synthetisiert wurde, nicht geschnitten, sondern in den T-Überhangvektor pGEMT-easy kloniert. Hierfür wurden die von der Polymerase natürlich angefügten Adenine mit den Thymidin-Überhängen des Vektors ligiert. Die ligierten Produkte wurden in JM109 Zellen transformiert und auf LB-amp-Platten selektioniert. Nach der Überprüfung der Klone mittels Restriktion wurde ein rekombinanter Klon ausgewählt und kultiviert. Das Zwischenprodukt pGEMT-easy+Myogenin (pG-M) diente der nachfolgenden Klonierung in den pET-3a-Vektor, wie bereits bei EGFP beschrieben

4.1.2 Klonierungen zur Generierung eines Stammschleifen-Plasmids

Eine Alternative zu den amplifizierten PCR-Produkten stellen die Expressionsplasmide selbst dar, die für eine gerichtete Oberflächenkopplung mit Stammschleifen-Strukturen modifiziert werden sollen.

Bei der Synthese eines palindromischen Oligomers wird bereits während der Elongation eine Haarnadel-Struktur ausgebildet, die nicht mehr klonierbar ist. Es wurden deshalb zwei synthetische Oligomere (stem1.1 und stem1.2) miteinander hybridisiert und phosphoryliert, die dann als doppelsträngiges Fragment in einer Ligationsreaktion über ihren AATT-Überhang verknüpft wurden (Abb. 9.1-9.3). So entstand ein 88 bp großes DNA-Fragment mit einer palindromischen Sequenz, welches nach einem MnlI-Verdau mit dem EcoRI-linearisierten Vektor pX ligiert wurde (Abb. 9.4-9.5). Die neukombinierten Plasmide wurden in JM109 Zellen transformiert und über Ampicillin selektioniert. Nach einer Restriktionsanalyse wurde ein Insert-tragendes Plasmid (pX-H) für die weitere Klonierung der Schleife in Bakterien vermehrt und anschließend isoliert.

In das EcoRI-linearisierte Plasmid pX-H wurde das Schleifen-Fragment (65 bp), hervorgehend aus der Hybridisierung der Oligomere loop-CCCCAC und loop-ggggTg, eingefügt und die Ligationsprodukte ebenfalls in Bakterien transformiert. Der Einbau des Haarnadelschleifen-Fragmentes sowie die Klonierungsrichtung wurden mittels Sequenzierung überprüft.

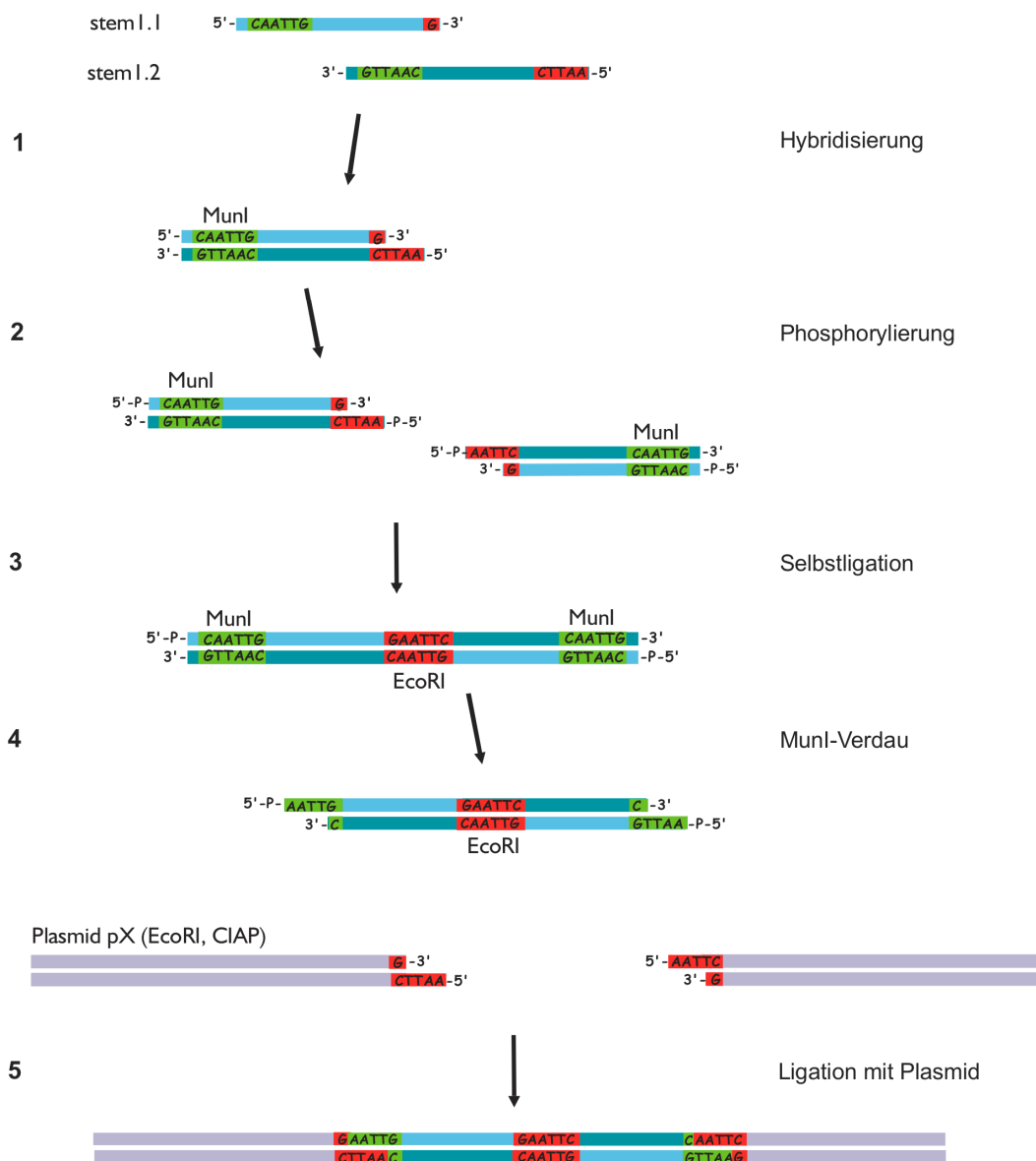


Abb. 9: Konstruktionsschema zur Ligation und Klonierung einer Stamm-Struktur. Die beiden Oligomere stem1.1 und stem1.2 wurden hybridisiert und an ihren 5'-Enden phosphoryliert. Die AATT-Überhänge wurden miteinander ligiert und die Enden für die Klonierung mit dem Restriktionsenzym MunI geschnitten. Die fertigen Konstrukte wurden in den EcoRI-linearisierten pX-Vektor kloniert.

Die zweite Haarnadelschleifen-Struktur wurde aus einem bereits bestehenden Konstrukt (pBHair I) mittels PCR vollständig amplifiziert (T7AflIIIfor, T7AflIIIrev). Die Enden des PCR-Produktes wurden mit AflIII geschnitten und das Amplikon über die Agarosegelelektrophorese separiert und aufgereinigt. Anschließend wurde es in den AflIII geschnittenen Stammschleifen-Vektor (pX-L) kloniert. Die aus den positiv selektierten Klonen gewonnenen Plasmide wurden sequenziert und der Einbau der Haarnadelschleifen-Sequenz II (108 bp) bestätigt.

Für die Ausprägung der Stammschleifen-Struktur müssen die beiden Stränge des Doppel-Haarnadelschleifen-Plasmids (pX-DL) voneinander getrennt werden. Damit aber die geschlossene, zirkuläre Struktur eines Stranges erhalten bleibt, wurde in das pX-DL-Plasmid eine Nickaseschnittstelle kloniert. Zuerst wurde diese Nickaseschnittstelle in das Gegenstück, den Ursprungsvektor pX, eingefügt. Hierfür wurde die Klonierungsrichtung über die Restriktionsschnittstellen SgrAI und SphI vorgegeben. Das pX-Plasmid wurde mit beiden Enzymen nacheinander folgend geschnitten, im Agarosegel aufgetrennt und aus dem Gel extrahiert. Anschließend erfolgte die Ligation mit dem Nickase-DNA-Fragment, ein Hybrid aus den Oligomeren Nick 1A und Nick 1B, und die Transformation in JM109 Zellen. Mit Hilfe der Kolonie-PCR wurde der Klonierungserfolg ausgewertet. Für den Einbau der Nickaseschnittstelle in das pX-DL-Plasmid wurde die Klonierungsmethode abgewandelt. Aufgrund der geringen Größe des Nickasefragmentes von 75 bp sollte der Erfolg der Ligation durch den Einsatz eines größeren DNA-Fragmentes erhöht werden. Hierfür wurde das Nickasefragment im neuen Nickase-Plasmid pX-n mit dem Primerpaar NickEagIfor und NickBglII/rev in einer PCR amplifiziert. Das Amplikon wurde mit den Enzymen BglII und SphI geschnitten, mittels Gelelektrophorese aufgereinigt und mit dem BglII/SphI geschnittenen pX-DL-Plasmid ligiert. Es wurden wieder JM109 Zellen transformiert und die gewachsenen Klone mit Hilfe der Kolonie-PCR überprüft. Zusätzlich wurden die beiden neuen Plasmide pX-n und pX-DLn sequenziert. Die Abbildung 10 gibt einen zusammenfassenden Überblick über die Klonierungen. Eine tabellarische Übersicht zu den klonierten Plasmiden befindet sich im Anhang.

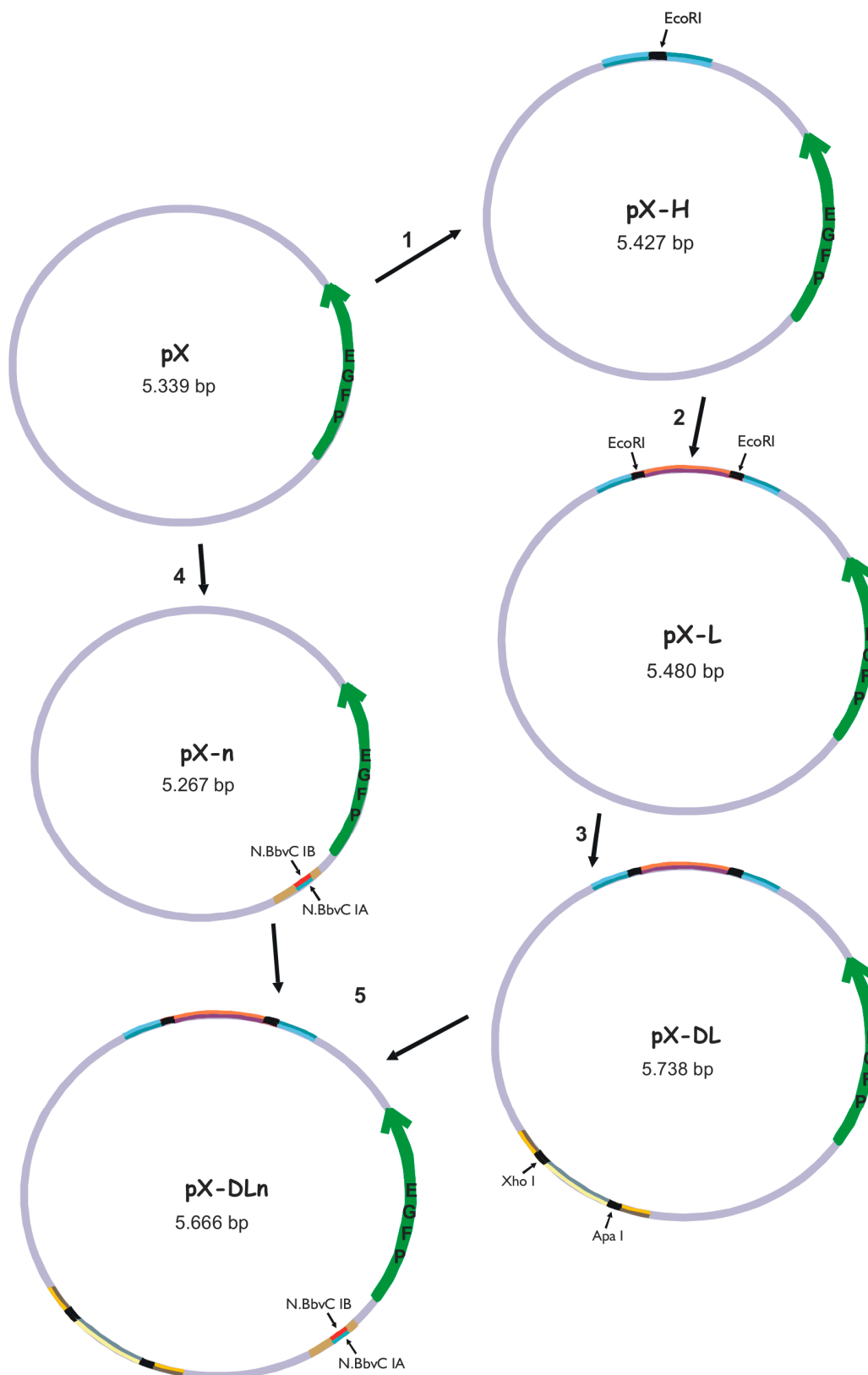


Abb. 10: Überblick über die Klonierungsprodukte ausgehend von dem Plasmid pX. Im ersten Schritt wurde ein Haarnadel-Fragment, welches später den Schleifenstamm bilden wird, kloniert (1 pX-H). In die Schnittstelle des Fragmentes wurde die Schleifensequenz eingefügt (2 pX-L). Für die spätere Detektion wurde das Plasmid um eine zweite Stammschleifen-Struktur erweitert (3 pX-DL). Aus dem pX-Plasmid ging zusätzlich das Plasmid pX-n hervor, das eine Nickaseschnittstelle besitzt (4 pX-n). Zum Schluß wurde das Nickasefragment aus dem Plasmid pX-n in das pX-DL-Plasmid kloniert (5 pX-DLn).

4.2 Vorversuche zur Oberflächen-Synthese

4.2.1 Amplifikation der Transkriptionsmatrizen

Bevor die Klonierung der Expressionsplasmide mit den gewünschten Genen abgeschlossen war, sollten die optimalen Parameter für eine spätere Kopplung der Gene als PCR-Produkte verifiziert werden.

Dazu wurde das EGFP-Gen ausgewählt, welches aus dem kommerziellen Vektor pEGFP amplifiziert wurde. Da diesem Plasmid die regulatorischen Sequenzen des T7-Phagen fehlen, wurden diese über den Vorwärtsprimer an das EGFP-Gen angefügt (Abb. 11). Dieser Vorwärtsprimer trägt neben der T7-Promotorsequenz auch die der RBS (T7PromEGFPfw). Zusätzlich wurde der Rückwärtsprimer (EGFPprev) mit einer 15 nt langen Polythymidin-Sequenz versehen, die in einer späteren Transkription als eine Polyadenin-Abfolge an das 3'-Ende der synthetisierten RNA angehängt wird. Somit besitzen die Primer neben den EGFP-komplementären Bereichen auch bis zu 30 nt lange, nicht-bindende Abschnitte.



Abb. 11: Schematischer Aufbau der EGFP-Transkriptionsmatrize basierend auf der Amplifikation aus dem pEGFP-Plasmid. Der T7Promotor (5'-TTA TAC gAC TCA CTA-3') und die RBS (5'-Agg gAg gAg g-3') wurden über den Vorwärtsprimer und die Polythymidin-Sequenz (5'- TTT TTT TTT TTT TTT-3') mittels Rückwärtsprimer an das EGFP-Gen angefügt.

Die kovalente sowie affine Immobilisation von PCR-Produkten erfordert eine endständige Modifikation der zu koppelnden Nukleinsäuren. Dabei bleibt ein positiver sowie negativer Einfluss auf die Amplifikation nicht ausgeschlossen. Für diese Arbeit wurden mit Phosphat, Biotin und NH₂-C6 drei kopplungs-relevante Markierungen ausgewählt, die jeweils über den Rückwärtsprimer an das Amplikon angefügt wurden. Die Abbildung 12 zeigt das Ergebnis der PCR mit den drei verschiedenen Modifikationen. Dabei zeigte sich, dass die Ausbeute an PCR-Produkt mit Phosphat- oder Biotinmarkierung vergleichbar hoch ausfällt. Positiv zu vermerken ist, dass die langen, nicht-kodierenden Bereiche der Primer das Binden an die DNA-Matrize nicht verhindern. Dagegen scheint sich die NH₂-C6-Modifikation negativ auf die Amplifikation auszuwirken, was wahrscheinlich auf die behinderte Anlagerung der Polymerase an den Primer-DNA-Komplex zurückzuführen ist, da die Ausbeuten an PCR-Produkt mit längeren Synthesezeiten, vermehrter Zykluszahl und Verringerung der Primerbindungstemperatur nicht erhöht werden konnten (Abbildung nicht gezeigt).

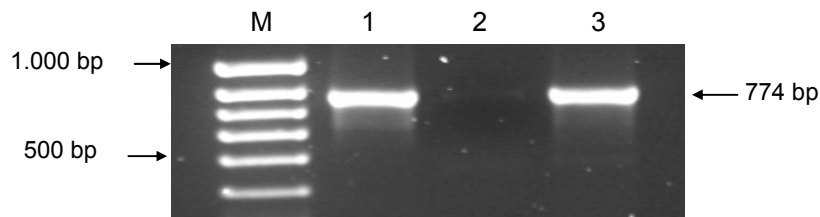


Abb. 12: Amplifikation der EGFP-Gensequenz mit einem 5'-Phosphat- (1), 5'-NH₂C₆- (2), 5'-Biotin-markierten (3) Rückwärtsprimer. Der Vorwärtsprimer besitzt keine Modifikation. M) Hyperladder IV.

Für die Oberflächen-Transkription wurde aufgrund der PCR-Ergebnisse sowie einer einfachen, nukleasefreien und zeitsparenden Handhabung der EDC-Methode mit der Phosphatmarkierung, der Vorzug gegenüber der affinen Kopplung mit Biotinmarkierung gegeben. Alle späteren Arbeiten wurden mit 5'-Phosphat-modifizierten DNA-Konstrukten durchgeführt.

Neben der Kopplungsart wurden auch der Aufbau und die Immobilisationsrichtung der PCR-Produkte berücksichtigt. Für andere Oberflächenreaktionen war der Abstand der DNA-bindenden Sequenz zur Oberfläche von entscheidender Bedeutung (Beier & Hoheisel, 1999). In einem zweiten PCR-Schritt wurde daraufhin vor den Promotor eine 20 nt lange, nicht-kodierende Sequenz als Abstandshalter (Spacer) an das bereits fertige EGFP-Transkriptionskonstrukt gesetzt (G20T7PromEGFP-Primer).

Für die unterschiedliche Ausrichtung des Transkriptionskonstrukts auf einer Oberfläche wurde die zweite PCR entweder mit einem phosphorylierten Vorwärtsprimer oder mit einem phosphorylierten Rückwärtsprimer durchgeführt (Abb. 13).

Mit der Fertigstellung der Expressionplasmide wurde auch die Grundlage zur Amplifikation

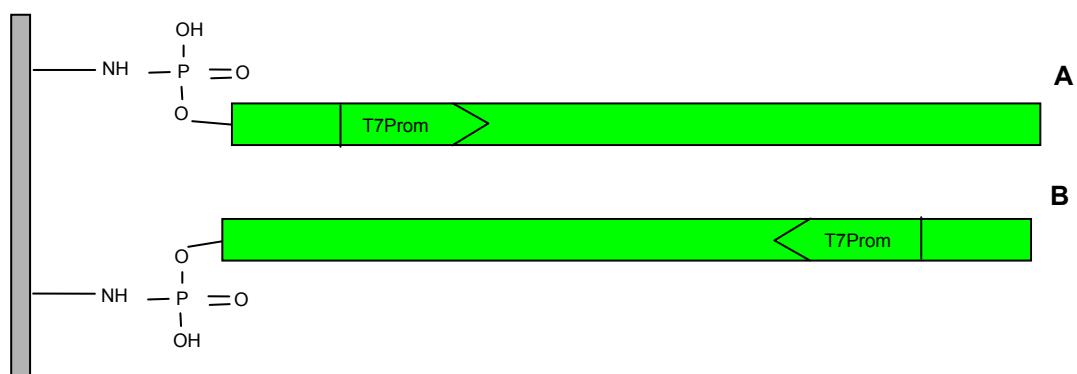


Abb. 13: Schema der möglichen Kopplungsrichtungen des EGFP-Transkriptionskonstrukts. Die PCR-Produkte sind über ihre Phosphatmodifikation kovalent an die Aminosilane der Glasoberfläche gebunden. Die Syntheserichtung verläuft entweder von der Oberfläche weg (A) oder zur Oberfläche hin (B).

der kompletten T7-Expressionskassette aus dem pET-3a-Vektor möglich. Zum einen ist dieses System für eine effiziente bakterielle Expression konzipiert und getestet worden und zum anderen wird mit der Amplifikation die Voraussetzung für den Vergleich zwischen zirkulärer und linearer Transkription auf der Oberfläche geschaffen.

Die PCR-Produkte aus den Expressionsplasmiden wurden mit Primern synthetisiert, die 28 bp vor dem T7-Promotor (T7Promfor) und 34 bp nach dem T7-Terminator (T7Termrev) binden. Da bereits über die Klonierung eine Polythymidin-Sequenz inseriert wurde, waren mit dieser Amplifikation die Transkriptionsmatrizen vollständig.

Alle generierten PCR-Produkte sind in einer Tabelle im Anhang aufgelistet.

4.2.2 Expression der Gene

4.2.2.1 BI21-Expression

Die rekombinanten Plasmide können in den JM109 Zellen nicht als Expressionsvorlagen dienen, da diesem Bakterienstamm das Gen für die T7-RNA-Polymerase fehlt. Der *E. coli* Bakterienstamm BI21 trägt in seinem Genom dieses Gen, welches unter der Kontrolle des lac-Operons steht. Nach der Transformation der Expressionsplasmide in diesen Bakterienstamm wird die Proteinsynthese durch Gabe von IPTG induziert.

Alle drei Plasmide mit den klonierten Genen EGFP, FY und Myogenin wurden in den Bakterienstamm transformiert und die Proteine in Bakterienkulturen exprimiert. Die Bakterienlysate wurden in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und in einem Immunoblot mit ihren spezifischen Antikörpern detektiert (Abb. 14)

Dabei zeigte sich, dass das Myogenin mit einem Molekulargewicht von 34 kDa (1b) sowie das EGFP mit einer Größe von 28 kDa (3b) nachgewiesen werden konnten. Nur das DARC-

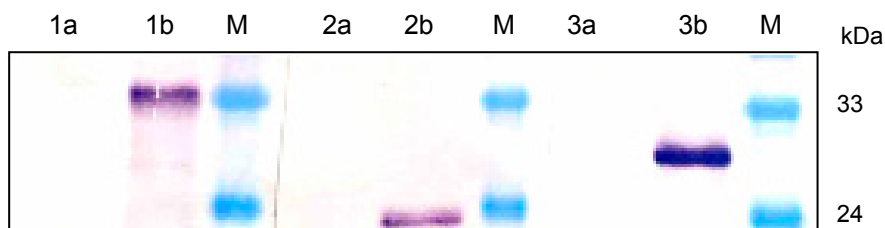


Abb. 14: Immunoblot der BI21-Expression von Myogenin (1b), DARC (2b) und EGFP (3b). Die Proteine wurden nach der SDS-Gelelektrophorese auf eine Nitrocellulosemembran (NC-Folie) transferiert und anschließend mit spezifischen IgG-Maus-Antikörpern (1:1.000) und einem Anti-Maus-Kaninchen-Antikörper (1:2.500) über eine alkalische Phosphatasereaktion nachgewiesen. Als Kontrolle (a) dienten kultivierte BI21-Zellen ohne Plasmid. M) Page Ruler™ Prestained Protein Ladder.

Protein (2b) läuft nicht entsprechend seinem erwarteten Molekulargewicht von 36 kDa, sondern knapp unterhalb des 24 kDa-Standards. Neben den fehlenden posttranslationalen Modifikationen wie Glykosylierungen, die zu einer Reduktion der Gesamtgröße beitragen, kann eine fehlerhafte Basenabfolge z.B. Basensubstitution mit einer Leserahmenverschiebung als eine mögliche Ursache für das geringe Molekulargewicht des DARC-Proteins angenommen werden.

Da in dieser Arbeit nicht die Proteine selbst als Forschungsschwerpunkte im Vordergrund stehen, sondern die der Expression zugrunde liegende Transkriptions- und Translationskassette, war das Ergebnis der BI21-Expression für die fortführenden Arbeiten ausreichend. Es wurde nachgewiesen, dass alle drei in den pET-3a-Vektor klonierten DNA-Sequenzen unter der Kontrolle des T7-Promotors sowie mit der durch den Primer variierten Einbau der RBS expressionsfähig sind.

4.2.2.2 *In vitro* Translation

Im Gegensatz zu der vektoriiellen Expression kann die Proteinsynthese aus linearen DNA-Sequenzen nicht in Bakterien erfolgen. Hierfür wurden spezielle *in vitro* Translationskits entwickelt, die bei prokaryotischer Expression auf modifiziertem *E. coli*-Bakterienlysat basieren. Das Qiagen EasyXpress Protein Synthesis Kit enthält das Lysat zusätzlich die T7-RNA-Polymerase, wodurch in einer gekoppelten Transkriptions- und Translationsreaktion auch Proteine unter der Kontrolle des T7-Promotors synthetisiert werden können.

Für den Nachweis, dass die T7TermMyo-, T7TermFY- und T7TermEGFP-PCR-Produkte ebenfalls für eine Proteinsynthese funktionell sind, wurden jeweils 500 ng PCR-Produkt in einer Reaktion eingesetzt. Anschließend wurde der Erfolg der Proteinsynthese mittels SDS-Gelelektrophorese und Immunoblot überprüft. In der Abbildung 15 ist das Ergebnis der *in vitro* Translation dargestellt. Auch hier bestätigte sich die exakte Expression des Myogenin-(1) und des EGFP-Gens (3), wie bereits bei der *in vivo* Translation. Das DARC-Protein zeigt neben der deutlichen Bande unterhalb der 24 kDa-Marke eine weitere Bande, die ähnlich bei dem Myogenin, auf eine mögliche Degradation des Proteins hinweist. Da alle PCR-Produkte Derivate der Expressionsplasmide sind, entsprechen auch die exprimierten Proteine denen der BI21-Expression. Die aus dem pET-3a-Vektor stammende T7-Expressionskassette kann somit für die *in vitro* Translation mit diesem Kit eingesetzt werden, auch ohne die vom Hersteller empfohlenen Primerkonstrukte. Alle PCR-Produkte sind unter Anwendung dieses Kits funktionell.

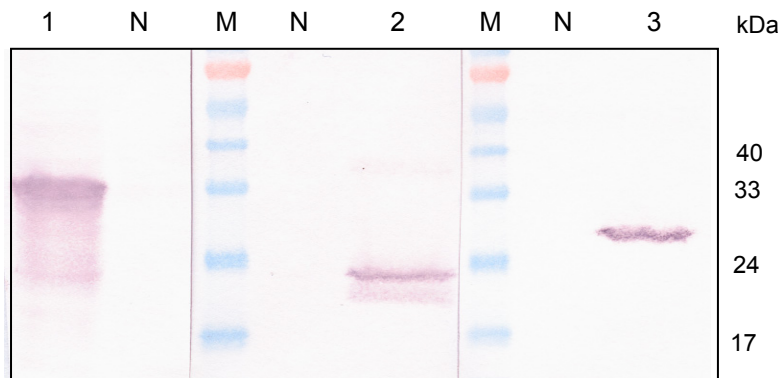


Abb. 15: Immunoblot der *in vitro* Translationsreaktion der T7Term-PCR-Produkte Myogenin (1), FY (2) und EGFP (3) mit dem Qiagen EasyXpress Protein Synthesis Kit. Als Negativkontrolle diente eine Reaktion ohne PCR-Produkt (N). Nachdem die Proteine in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine NC-Folie transferiert wurden, erfolgte der spezifische Nachweis über IgG-Maus-Antikörper (1:1.000) mit anschließender Farbreaktion durch das Alkalische Phosphatasegekoppelte Konjugat (Kaninchen-Anti-Maus-IgG (1:2.500). M) Page Ruler™ Prestained Protein Ladder.

4.2.2.2.1 Vergleich der *in vitro* Translationskits

Für die Translation von immobilisierten Nukleinsäuren wurden zwei konventionelle *in vitro* Translationssysteme, das EasyXpress-Kit der Firma Qiagen und das *in-vitro*-PBS-Kit der Firma RiNA, miteinander verglichen. Beide basieren auf dem gleichen gekoppelten Transkriptions- und Translationssystem unter Verwendung von T7- oder *E. coli*-Promotoren. Die Proteinsynthese, mit dem T7TermEGFP-PCR-Produkt (630 ng) als Matrize, erfolgte hierfür in 1,5 ml Reaktionsgefäßen. Neben der Standardsynthese mit den mitgelieferten Reaktionsbestandteilen wurde die Proteinsynthese in Anlehnung an eine nachfolgende Oberflächenreaktion durch zusätzliche Komponenten erweitert. Zu den Komponenten zählten Ribonukleotide (rNTPs), T7-RNA-Polymerase, Methionin und acetyliertes Kälberserumalbumin (*bovines serum albumine*, BSA). Das Ergebnis dieser Experimentierreihe wurde mittels SDS-Gelelektrophorese und Immunoblotting ausgewertet (Abb. 16).

Das EGFP wurde sowohl bei den unmodifizierten (2) als auch bei den modifizierten (3) Reaktionen über den sensitiven Antikörperblot nachgewiesen. Der Vergleich zwischen dem Qiagenkit (a) und dem RiNA-Kit (b) zeigt, dass die Ausbeuten an Protein bei dem RiNA-Kit höher ausfallen. Zusätzlich zeigte sich, dass die Translation von EGFP geringfügig effizienter ablief, wenn die Reaktion keine zusätzlichen Komponenten enthielt (3). Dieser Effekt wurde bei beiden Kits gleichermaßen festgestellt.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde das RiNA-Kit für die Festphasen-Translation ausgewählt.

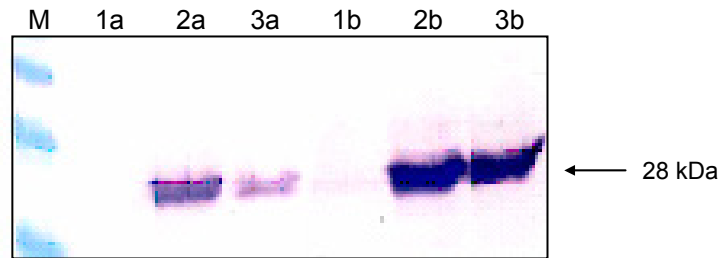


Abb. 16: Immunoblot zum Vergleich der *in vitro* Translation von EGFP mit dem Qiagen EasyXpress (a) und dem *in vitro*-PBS-Kit (b). Als Kontrollen dienten eine Reaktionen ohne DNA (1). Die Translationsreaktionen wurden ohne (2) und mit Zusätzen (3) durchgeführt. Die Proben wurden in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Der Nachweis erfolgte mit einem monoklonalen Anti-IgG_{2a} GFP-Maus-Antikörper (1:1.000) und einem Alkalische Phosphatase konjugierten Kaninchen-Anti-IgG_{2a}-Antikörper (1:2.500).
M) Page Ruler™ Prestained Protein Ladder

4.2.3 Hybridisierung von Cy5-markierter RNA

Im Rahmen eines Forschungsprojekts mit der Firma Agowa sollte getestet werden, ob die Cy5-Markierung und Hybridisierung von RNA für eine spätere sensitive Detektion möglich ist. Über den Einbau von Aminoallyl-UTPs mit einer Cy5-Modifikation können die so entstandenen RNA-Moleküle an immobilisierten Sonden gebunden und somit nachgewiesen werden.

Hierfür wurde die RNA-Synthese im 1,5 ml Reaktionsgefäß mit Cy5-markierten Aminoallyl-UTPs durchgeführt und die überschüssigen Nukleotide über eine Membranfiltration entfernt. Für die Hybridisierung wurden der EGFP_{Prev}-Primer (30 µM), eine PolyA-Sonde (30 µM), eine Hybridisierungskontrolle (P8) (30 µM) und eine Immobilisierungskontrolle (1 µM) auf Genetix-Objektträger getropft, mittels EDC-Methode gekoppelt und die Oberfläche geblockt. Der Erfolg der Hybridisierung wurde mit Hilfe des ArrayWorx-Scanners überprüft (ex 657 nm/ em 670) (Abb. 17).

Die Signale der Immobilisationskontrolle, die neben einer 5'-Phosphatmodifikation eine 3'-Cy5-Markierung trägt und somit als Marker für die Kopplung dient, sind deutlich zu erkennen. Die Hybridisierung von fluoreszenzmarkierter RNA wird über die Signale der EGFP_{Prev}-Reihen bestätigt. Diese Signale sind zwar schwächer als die der Immobilisationskontrolle, aber signifikant, da die Kontroll-Reihen (PolyA und P8) keine Fluoreszenzsignale aufweisen. Mit diesem Experiment gelang es, zum einen *in vitro* synthetisierte RNA über den Einbau von Cy5-gekoppelten Uracil-Nukleotiden zu markieren und zum anderen die Hybridisierung der RNA über diese Fluorophore nachzuweisen.

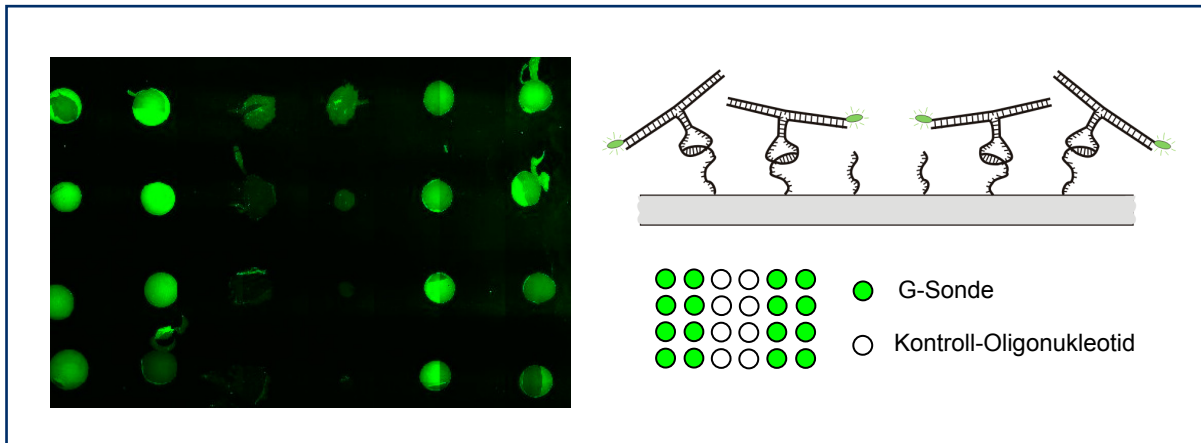


Abb. 18: Hybridisierung eines Haarnadelschleifen-Fragmentes an eine immobilisierte Sonde. Getropft wurden eine G-Sonde sowie das Kontroll-Oligonukleotid 21926-20 auf einen im Haus silanisierten Objektträger. Nach der Kopplung über die silanisierte 5'-NH₂C₆-Modifikation der Oligomere erfolgte die Detektion der Hybridisierung über eine FAM-Markierung am Haarnadelschleifen-Fragment mit dem Laser Scanning Mikroskop LSM (ex 488 nm).

der Lage, an die G-Sonde zu binden und über die FAM-Markierung ein Fluoreszenzsignal zu liefern.

Damit wurde gezeigt, dass die Hybridisierung einer Haarnadelschleifen-Struktur an eine Oberflächen-gebundene Sonde möglich ist.

4.3.2 Modifikation des Stammschleifen-Plasmids

Für die Ausbildung einer Haarnadelschleifen-Struktur ist es notwendig, die komplementären Palindrome voneinander zu trennen. *In vivo* werden Plasmide natürlich superspiralisiert verpackt. Ohne Strangbrüche ist es somit unmöglich, diese durch denaturierende Prozesse z.B. Hitzeeinwirkung oder in stark alkalischer Umgebung, in Einzelstrangringe zu zerlegen. Deshalb wurde mit der Klonierung einer Schnittstelle für die Einzelstrang-schneidende Nickase, die Voraussetzung für die Trennung beider Stränge, unter Beibehaltung einer Ringstruktur, geschaffen.

Für den Beweis, dass die Nickase nur einen Einzelstrangbruch induziert, wurde das Plasmid pX-n (300 ng) mit dem Restriktionsenzym Spe I linearisiert, mit der Nickase N.BbvC IB relaxiert und mit beiden Nickasen N.Bbv C IA und IB zusammen geschnitten und alle Proben zum Vergleich in einem 0,7%igen Agarosegel aufgetrennt (Abb. 19). Bei dem unbehandelten Plasmid (1) sind deutlich 3 Banden zu erkennen, wovon die beiden kleineren unterschiedlichen Zustandsformen des Plasmids zugeordnet werden. Dazu gehören die verschiedenen stark negativ superspiralisierten Formen (3-4 kb) und die relaxierte Form (6 – 8 kb), wie sie natürlich in Bakterien vorkommen. Die Bande mit dem höchsten Molekulargewicht repräsentiert vermutlich das Bakterienchromosom, welches bei der

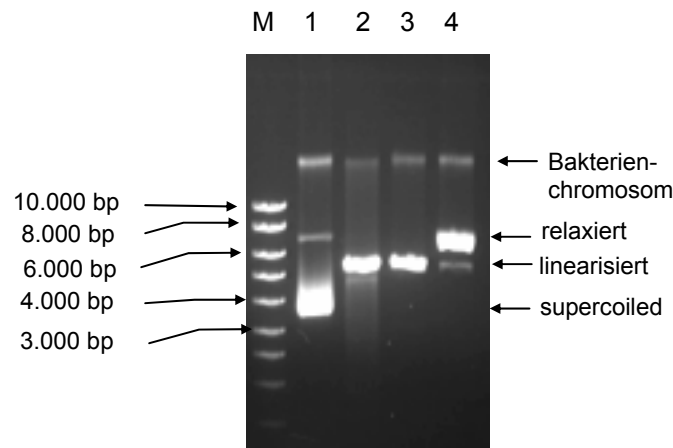


Abb. 19: Relaxation des Plasmids pX-n mittels Nickase-Verdau. Unverdautes Plasmid (1), gemeinsamer Verdau mit N.BbvC IA und N.BbvC IB (2), SpeI-linearisiert (3) und Einzelstrangbruch mit Nickase N.BbvC IB (4). M) Hyperladder I.

Plasmidisolation ebenfalls aufgereinigt wurde. Dafür spricht, dass es sich mit dem Restriktionsenzym Spe I nicht fragmentieren lässt. Ebenfalls könnte es sich bei dieser Bande um Catenane handeln, d.h. mehrfach verknottete Plasmide, die aber vermutlich nach dem Restriktionsverdau (3) nicht definiert sichtbar wären.

Die Nickaseschnittstelle im Plasmid pX-n (5,3 kb) wird von beiden Nickasen eindeutig erkannt, denn mit der Inkubation beider Enzyme wird das Plasmid linearisiert (2), während es bei der Behandlung mit nur einem Enzym die relaxierte Form annimmt (4). Hiermit wird auch der Nachweis erbracht, dass beide Enzyme jeweils nur ihren Matrizenstrang schneiden. Mit einer schwachen Bande (4), die auf der Höhe der linearisierten Form läuft, scheint aber keine hundertprozentige Substratspezifität der Nickasen vorzuliegen.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Nickaseschnittstelle von beiden Enzymen erkannt wird, wurden die Plasmide pX-DLn und pX-n (je 30 µg) separat mit den Nickasen N.BbvC IA und IB relaxiert und die entspannte Form aus dem Agarosegel extrahiert. Mit einer nachfolgenden Phenol/Chloroform- und Ethanol-fällung wurde die Plasmidstruktur aufgereinigt.

Für die Trennung vom geschlossenen Strang wurde mit dem T7-Exonukleaseverdau der geöffnete Strang enzymatisch hydrolysiert. Die Hydrolyse des geöffneten Stranges wurde dabei in einem T7-Exonukleaseverdau des relaxierten pX-n Plasmids zu verschiedenen Zeitpunkten dokumentiert und überprüft. Hierfür wurden dem Nukleaseansatz zu definierten Zeitpunkten (1, 5, 10, 20, 60, 120, 240 und 720 min) Aliquots entnommen und mit dem Komplexbildner EDTA (10 mM) die Reaktion abgestoppt. Für die bessere Detektion von einzelsträngiger DNA wurden den Proben vor der Auftragung auf ein 0,7 %iges Agarosegel

zusätzlich Sybrgreen II oder Oligogreen (1:1.400) zugesetzt. Die Abbildung 20 zeigt den gesamten Verlauf des T7-Exonukleaseverdaus.

Das Experiment zeigt, dass ein relaxiertes Plasmid als Substrat für die T7-Exonuklease geeignet ist. Unter der Hydrolyse des geöffneten Stranges nimmt das Molekulargewicht der DNA stetig ab (2 - 8), bis nach zwölfstündiger Inkubation noch eine schwache DNA-Struktur im Agarosegel mit einer Laufhöhe von ca. 1.500 bp detektierbar ist (9, gelber Pfeil). Auffällig ist das Laufverhalten der relaxierten Form ohne Enzymwirkung (1), da eine erwartete Laufhöhe zwischen 6 und 8 kb deutlich überschritten wird. Dies veränderte Laufverhalten kann auf die Einwirkung der zugesetzten DNA-bindenden Farbstoffe zurückzuführen sein.

Mit der verbliebenen Bande (9) ist auch gezeigt, dass der geschlossene Strang keinen Angriffspunkt für die T7-Exonuklease besitzt. In einem Vergleichsversuch mit linearisiertem pX-n-Plasmid konnte nach einem 720 minütigen Verdau solch ein Bande nicht detektiert werden (Abbildung nicht gezeigt). Es lässt sich aber nicht auszuschließen, dass bei dem Experiment mit dem genickten Plasmid die T7-Exonuklease nach einer langen Inkubationszeit keine Aktivität mehr besitzt und somit den Verdau nicht vollständig abschliessen konnte. Im Gegensatz zu diesen beiden Plasmidformen mit mindestens einem freien 3'-OH Ende konnte die T7-Exonuklease spiralisiertes Plasmid nicht verdauen (Abbildung nicht gezeigt).

Mit diesen Analysen konnte gezeigt werden, dass das durch eine Nickase induziertes, nun frei zugängliches 3'-OH-Ende, als Ausgangspunkt für die Hydrolyse eines geöffneten DNA-Strang mittels T7-Exonuklease dient.

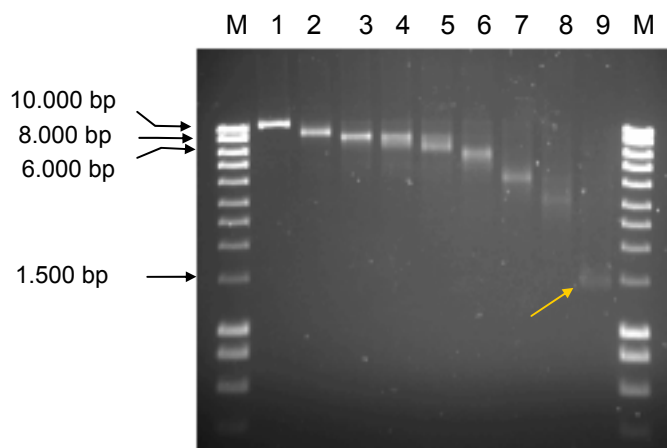


Abb. 20: Zeitlicher Verlauf des T7-Exonukleaseverdaus von pX-n genickt. Ausgangspunkt ist vor Zugabe des Enzyms (1). Weiter Zeitpunkte: 1 min (2), 5 min (3), 10 min (4), 20 min (5), 60 min (6), 120 min (7), 240 min (8) und über Nacht (9). Zu den Proben sowie dem Marker wurde Sybrgreen II (1:1.400) zugegeben. M) Hyperladder I.

4.3.3 Hybridisierung eines Einzelstrangrings an eine immobilisierte Sonde

Der kodogene (Transkriptionsmatrize) Strang des EGFP-Gens kann durch den gewählten Einsatz der Nickase-Enzyme entweder auf dem linearisierten oder dem zirkulären Einzelstrang liegen. Nur bei einer Behandlung mit dem N.BbvC IA-Enzyms (IA) liegt der kodogene Strang als Einzelstrangring vor. Bei einer Verknüpfung zweier Einzelstrangringe zu einem Plasmidhybrid spielt aber die Zuordnung des kodogenen Stranges keine Rolle, da sich die Ringe nur durch den Besitz oder das Fehlen der Stammschleifen-Struktur voneinander unterscheiden.

Für die spätere Zusammenführung eines Einzelstrangrings mit und ohne Stammschleifen-Strukturen wurde als nächstes getestet, ob ein Einzelstrangring über seine Schleifen-Struktur an eine Oberflächen-immobilisierte Sonde gebunden werden kann.

Dafür wurden die Plasmide pX-DIn und pX-n einmal mit der Nickase N.Bbv CIA oder IB relaxiert. Durch einen Hitzeschritt wurden die DNA-Stränge separiert und die IA-behandelten Plasmide mit der Cy5-markierten Loop-CCCAC-Sonde und die IB-behandelten Plasmide mit Loop-gggTg-Sonde unter langsamer Abkühlung inkubiert. Die DNA-Fragmente wurden vor der Oberflächen-Hybridisierung aufgereinigt. Mit der Auswahl der Sonden wurde festgelegt, dass nur die komplementären Stammschleifen der Einzelstrangringe und nicht die der linearisierten ssDNA fluoreszenzmarkiert wurden.

Die Oligonukleotide für dieses Experiment, darunter die spezifischen Sonden Catch-GA- und Catch-CT-Loop (30 μ M) sowie die Immobilisationskontrolle CH3 (10 μ M) und die Hybridisierungskontrolle G-Sonde (30 μ M) wurden mittels EDC-Methode auf Genetix-Objektträger gekoppelt und die Oberfläche anschließend geblockt. Nach der Oberflächen-Hybridisierung wurden die Objektträger im ArrayWorx (ex 657nm/em 670 nm) ausgelesen.

In der Abbildung 21A ist das Ergebnis der Hybridisierung eines Cy5-markierten, IB-behandelten pX-DIn-Ringes gezeigt. Neben der Immobilisationskontrolle ist auch das Signal der Hybridisierung, wenn auch schwächer, aber deutlich zu erkennen. Zu einem besseren Überblick wurden neben der ArrayWorx-Aufnahme das idealisierte Schema der Hybridisierung dargestellt. Die beiden Stammschleifen-Fragmente eines IB-behandelten Plasmids unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Sequenz. Somit wird gewährleistet, dass im ersten Hybridisierungsschritt die Cy5-markierte Sonde nur an ihre komplementäre Schleife bzw. die 2. Schleife an ihrer immobilisierten Sonde bindet. Die Spezifität der Bindung wird durch die Kontroll-Reihen der Catch-CT-Loop- sowie der G-Sonde bestätigt. Für eine genauere Untersuchung wurden neben der qualitativen Analyse die Intensitäten aller Signale sowie deren Hintergrund mit der ImaGene-Software ermittelt. Anhand dieser Intensitäten wurde der Kontrast mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Signal} - \text{Hintergrund}}{\text{Signal} + \text{Hintergrund}} = \text{Kontrast}$$

Mit der Berechnung der Kontrastwerte wird der Helligkeitsunterschied zwischen dem Hintergrund und dem Signal ermittelt, so dass die absoluten Werte auch mit den Daten anderer Experimente bzw. Oberflächen verglichen werden können. Die Grenzwerte des

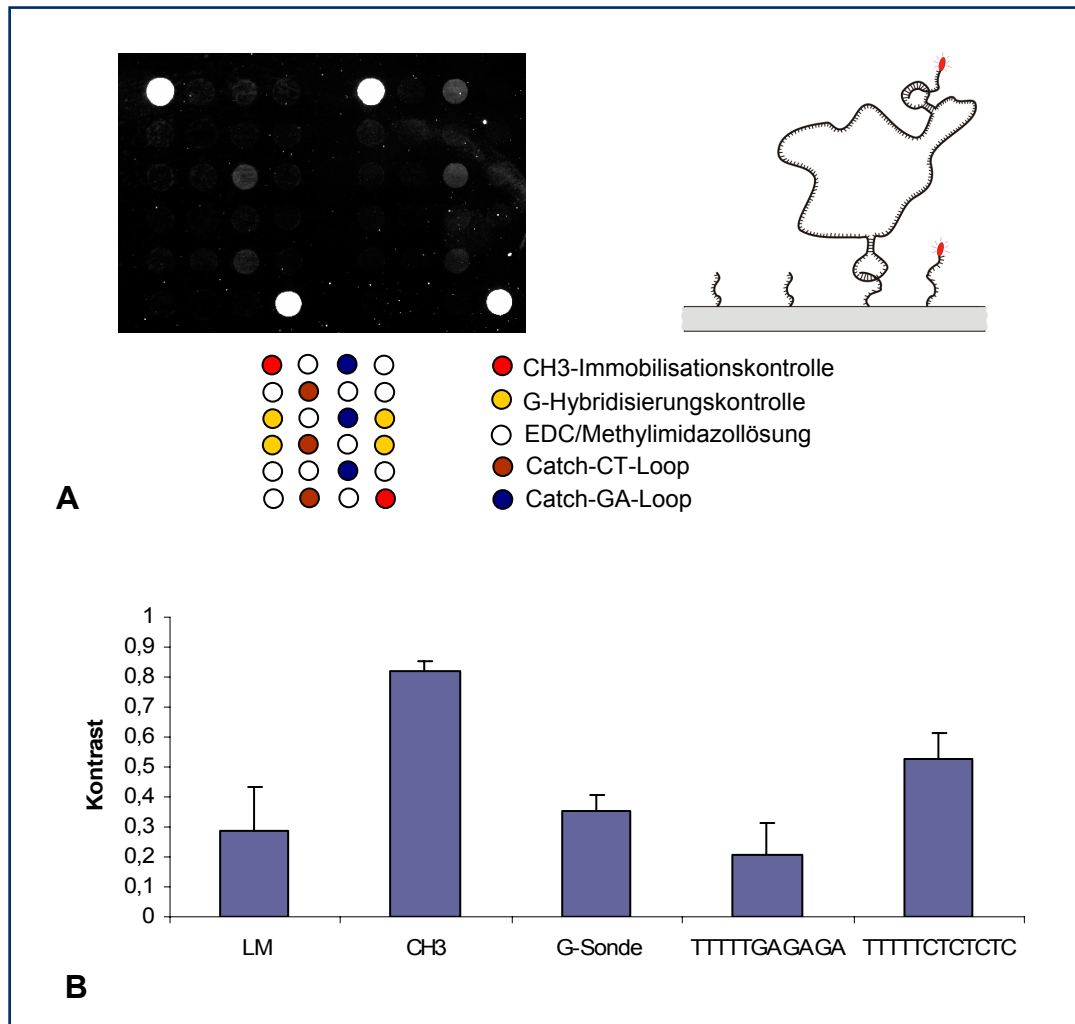


Abb. 21: Hybridisierung eines Cy5-markierten Einzelstrangringes an eine immobilisierte Sonde. Es wurden die 5'-modifizierten Catch-CT-Loop (TTTTGAGAGAGA) und Catch-GA-Loop (TTTTTCTCTCTC), sowie eine Hybridisierungskontrolle G-Sonde und die Immobilisationskontrolle CH3 mittels EDC-Methode auf Genetix-Objektträger gekoppelt. Zusätzlich wurde die EDC/Methylimidazolösung (LM) getropft. Das Plasmid pX-Dln wurde relaxiert (N.BbvC IB) und eine Stammschleife mit einer Cy5-Sonde markiert. Nach der Oberflächen-Hybridisierung erfolgte die Detektion mit Hilfe des ArrayWorx (ex 657 nm/ em 670 nm) (A). Aus den generierten Daten wurden mit der ImaGene-Software, die Signalintensitäten sowie deren Hintergrund ausgewertet. Diese bildeten die Grundlage zur Berechnung der Kontrastwerte. Die Kontrastwerte wurden gemittelt und zusammen mit ihren Standardabweichungen im Balkendiagramm dargestellt (B).

Kontrasts liegen zwischen 0 und 1, wobei hier entweder keine Signalintensität bzw. keine Hintergrundfluoreszenz gemessen werden konnte.

Das Balkendiagramm 21B zeigt das Ergebnis der gemittelten Kontrastwerte und ihrer Standardabweichungen. Hier wird das qualitative Ergebnis bestätigt. Neben dem Kontrastwert des spezifischen Signals von $0,52 (\pm 0,085)$ steht ein deutlich höherer Wert der CH3-Immobilisationskontrolle von $0,81 (\pm 0,036)$. Der Kontrastwert des reinen Hintergrundsignals, repräsentiert durch das getropfte Lösungsmittel, liegt mit $0,29 (\pm 0,143)$ zwar unterhalb des spezifischen Kontrastwertes, zeigt aber eine höhere Varianz auf. Das kann auf ein unzureichend stringentes Waschen zurückgeführt werden. Somit ist das Hybridisierungssignal nicht eindeutig signifikant. Auch die anderen Kontrollen wie die G-Sonde mit $0,35 (\pm 0,054)$ und die Catch-CT-Loop-Sonde $0,2 (\pm 0,107)$ erreichen nicht das Niveau des Hybridisierungssignals. Da nur die Cy5-markierte Sonde die Detektion bestimmt, kann eine DNA-Bindung mit der G-Sonde ausgeschlossen werden, da diese keine Komplementarität zueinander besitzen. Deshalb müssen die Kontrollsignale möglicherweise auf Oberflächeneffekten wie Eigenfluoreszenz von Salzen und Artefakten basieren, was natürlich die Hybridisierungs-Reihen mit einschließt.

Zusammen mit den schwachen visuellen Signalen lässt sich die Hybridisierung eines Einzelstrangringes über eine Haarnadelschleifen-Struktur belegen. Zusätzliche Kontroll-Experimente mit Einzelstrangringen ohne Haarnadelschleifen-Struktur sowie ohne DNA oder nur die Cy5-markierte Sonde selbst lieferten keine Signale in einer Oberflächen-Hybridisierung. Dies unterstützt die Aussage des gezeigten Experimentes. Leider konnte mit dem IA-behandelten, Cy5-markierten pX-DIn-Ring kein positives Ergebnis erzielt werden. Da die Signale der Hybridisierung sehr schwach waren, kann eine nicht ausreichende DNA-Menge als mögliche Ursache in Betracht gezogen werden.

4.3.4 Verknüpfung zweier Einzelstrangringe

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, ein doppelsträngiges Plasmid mit ausgeprägten Stammschleifen zu generieren (Abb. 22).

In den ersten Schritten wurde gezeigt, dass mit einem Einzelstrangbruch und einem anschließenden T7-Exonukleaseverdau ein separater Einzelstrangring erzeugt werden kann. Als nächstes wurde relaxiertes und verdautes pX-n-Plasmid in einer Topoisomerasereaktion eingesetzt. Der Nachweis, dass es sich bei dem Plasmid tatsächlich um ein neu zusammengesetztes Plasmid handelt, kann indirekt mit der Transformation von T7-Exonuklease-verdauten Proben erfolgen. Bakterien sind nicht in der Lage, linearisierte DNA aufzunehmen bzw. zerstören ssDNA durch Nukleasen.

Ausgehend von $10 \mu\text{g}$ DNA wurde das Plasmid mit IA oder IB behandelt und anschließend mittels Gelelektrophorese aufgereinigt. Die kompletten Ansätze wurden mit der T7-

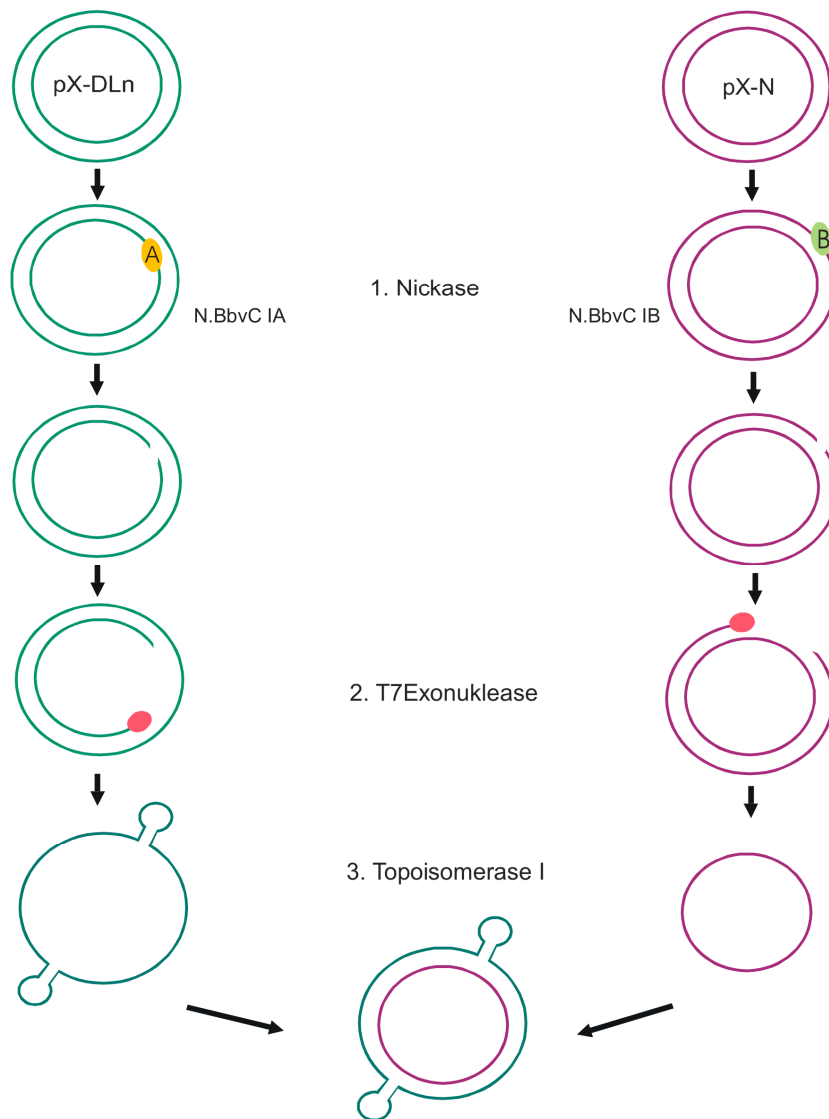


Abb. 22: Konstruktionsschema zur Generierung eines Plasmidhybrids mit ausgeprägten Stammschleifen. Hierfür werden die Plasmide pX-Dln und pX-n mit zwei unterschiedlichen Nickasen realisiert (1.) und der geöffnete Strang mit Hilfe der T7-Exonuklease entfernt (2.). Die verbliebenen Einzelstrangringe werden durch die Topoisomerase I mit einander verknüpft (3.).

Exonuklease verdaut und erneut aufgereinigt. Zum Schluss wurden die Proben vereinigt und in einer Topoisomerasereaktion eingesetzt.

Der Transformationsversuch wurde mit *E. coli* JM109 durchgeführt, wobei jeweils die gleiche Menge an relaxierten Plasmiden, Einzelstrangringen und der komplette Topoisomeraseansatz eingesetzt wurden. Die Ansätze wurden auf LB-amp-Platten selektioniert und die gewachsenen Klone ausgezählt. In der Tabelle 5 ist das Ergebnis des Transformationsversuches dargestellt.

Der Ansatz pX-n-IB enthielt noch viele Moleküle des geschlossenen Plasmids, da hier eine sechsfach höhere Kolonienzahl gegenüber dem IA-Ansatz gezählt wurde. Nach dem T7-Exonuklease-Verdau sank die Anzahl der Kolonien auf maximal fünf. Möglicherweise waren noch geschlossene Plasmide vorhanden, wenn auch nur in sehr geringer Zahl. Bei dem IB-Ansatz sank die Transformationsrate um mehr als 100%.

Da die T7-Exonuklease nur an offenen Enden aktiv ist, sollte sich die Menge der geschlossenen Plasmide nicht ändern und somit die Anzahl der transformierten Bakterien nicht verringern. Dieser Effekt ist aber wahrscheinlich auf den Verlust an DNA-Material durch die Aufreinigung zurückzuführen.

Die Transformation des Topoisomeraseansatzes blieb komplett erfolglos. Das Transformationsexperiment zeigt, dass nach dem T7-Exonukleaseverdau die Zahl der transformierbaren Plasmidstrukturen deutlich abnahm und die Verknüpfung der Plasmide fehlschlug.

Da dieses Ergebnis aber nicht weiter verifiziert wurde, kann keine endgültige Aussage über die Transformierbarkeit von neugeknüpften Plasmiden getroffen werden. Es besteht die Möglichkeit, dass mit einer höheren Menge an DNA-Material dieses Experiment erfolgreich abgeschlossen werden kann.

Die Arbeiten mit dem Stammschleifen-Plasmid wurden nur bis zu diesem Punkt durchgeführt, da der Arbeitsaufwand sowie die Ergebnisse der Transkription den Schwerpunkt auf die Oberflächen-Transkription mit dem PCR-Produkt verlagerten.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der Einbau von Stammschleifen-Sequenzen und ihre Ausprägung in einem Plasmid erfolgreich über eine Oberflächen-Hybridisierung gezeigt wurde. Auch die Relaxierung des Plasmids und die Trennung der beiden Plasmidstränge mit Hilfe der T7-Exonuklease waren erfolgreich. Der enzymatische Zusammenschluss zweier Plasmidstränge gelang bisher nicht.

Tab. 5: Auswertung des Transformationsversuchs mit *E. coli*-Bakterien. Neben den ausplattierten Volumina von 50 und 100 μ l wurden auch der über Nacht gekühlte Transformationsansatz ausplattiert (ÜN 100 μ l, ÜN Rest). Alle gezählten Kolonien der Schritte 1-3 wurden summiert.

Transformationsansatz	50 μ l	100 μ l	ÜN100 μ l	ÜN Rest	Gesamt
pX-n - IA	5	6	7	0	18
pX-n - IB	15	45	44	8	112
pX-n - IA, T7Exo	0	2	0	3	5
pX-n - IB, T7Exo	0	0	0	0	1
Topoisomeraseansatz aus pX-n - IA -, T7Exo und pX-n - IB -T7Exo	0	0	0	0	0

4.4 Enzymatische Oberflächen-Synthesen

4.4.1 Oberflächen-Transkription (OnChip-Transkription)

4.4.1.1 Oberflächenbehandlung und Kopplungsparameter

Für die Oberflächen-Transkription muss silanisiertes Glas neben funktionsfähigen Kopplungseigenschaften auch eine RNase-freie Oberfläche besitzen. Für die Zerstörung bzw. Inhibition von extrem widerstandsfähigen RNasen wird Glas entweder mit DEPC behandelt oder für 3 h bei 180°C stark erhitzt. Beide Verfahren wurden an im Haus silanisierten Objektträgern getestet, auf die anschließend phosphorylierte Kontroll-Oligonukleotide mittels TopSpot getropft wurden.

Die Aufnahmen der TopSpot integrierten Kamera belegen den Einfluss der DEPC-Behandlung auf die silanierte Glasoberfläche (Abb. 23A). Diese Oberfläche ist im Vergleich zur erhitzten Oberfläche (23B) hydrophiler, so dass die Tropfen aufgrund ihrer Affinität verlaufen und kein einheitliches Array mehr bilden. Da das DEPC kovalent an primäre und sekundäre Amine bindet, werden somit die Aminogruppen der Silanoberflächen angegriffen. Es ist anzunehmen, dass dadurch die Oberfläche stark verändert wird. Die Carbodiimid-vermittelte kovalente Kopplung von phosphorylierten Oligonukleotiden ist aber abhängig von diesen Aminogruppen. Somit ist die DEPC-Behandlung keine geeignete Methode zur Dekontamination der Glasobjektträger.

Das Erhitzen der silanisierten Objektträger im Trockenschrank für 3h bei 180°C zeigte keinen negativen Einfluss auf die Oberflächenbeschaffenheit. Die Aufnahmen der TopSpot-Kamera

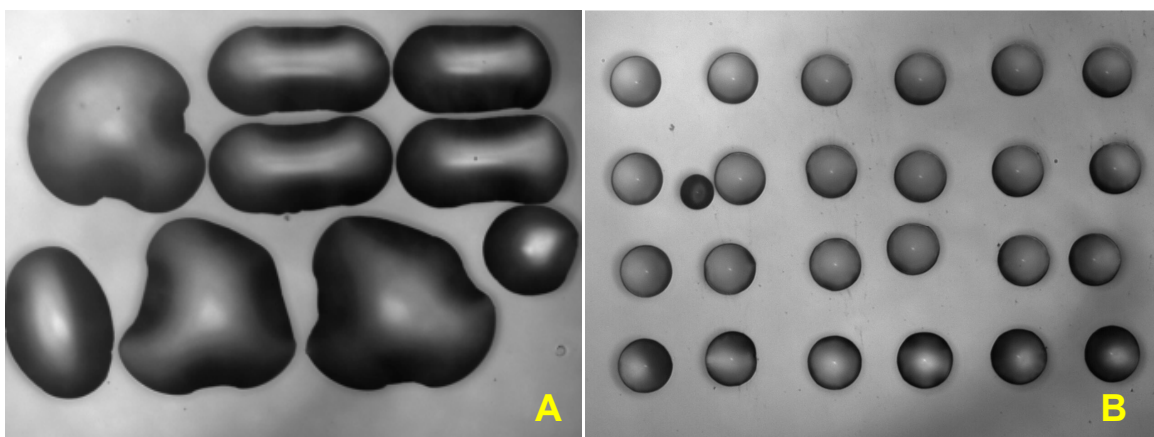


Abb. 23: Vergleich zweier silanisierter Oberflächen mit DEPC-Behandlung (A) und Temperaturbehandlung (3h, 180° C) (B) nach Betropfung mit phosphorylierten Oligonukleotiden. Die Oligonukleotide wurden in einer Konzentration von 30 μM in EDC/Methylimidazolösung auf die Oberfläche gebracht. Die Aufnahme zeigt ein gedrucktes Array in dem Format von 4x6. Die Aufnahmen wurden von der in den TopSpot integrierten Kamera aufgenommen (Abbildungsmaßstab der TopSpot-Kamera 1:5).

dokumentierten sauber abgegrenzte Tropfen entsprechend unbehandelter Silanoberflächen. Für die weiteren Arbeiten an Oberflächen wurden auch nukleasefreie, aminosilanisierte Objektträger der Firma Genetix und Schott verwendet.

Bei der kovalenten Kopplung von phosphorylierten PCR-Produkten spielt die Kopplungsdauer sowie die Länge der zu immobilisierenden Produkte eine große Rolle (Ghosh & Musso, 1987). Die beginnenden Arbeiten der Oberflächen-Transkription wurden angelehnt an die Erfahrungen mit zu immobilisierenden Oligonukleotiden. Die aufgereinigten P-T7PromEGFP-PCR-Produkte in EDC/Methylimidazolösung wurden per Hand auf die Objektträger getropft und für 30 bzw. bis zu 120 min inkubiert. Nach dem Waschen wurde die Transkription auf der Oberfläche durchgeführt, nach Abschluss die Reaktionslösung abpipettiert und abgelöste oder nicht entfernte PCR-Produkte durch einen DNA-Verdau degradiert. Nach der Aufreinigung wurde die RNA in einer RT-PCR in cDNA umgeschrieben und amplifiziert. Die RT-PCR-Proben wurden in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt und die Ergebnisse ausgewertet.

Bei den ersten Versuchen konnte keine RNA-Synthese nachgewiesen werden. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen von bis zu 900 ng pro Reaktion getropft. Es gelang jedoch nicht, RNA auf der Oberfläche zu transkribieren.

Die Kopplungsdauer wurde daraufhin auf bis zu 72 h ausgedehnt. Die Abbildung 24 zeigt das Ergebnis der OnChip-Transkription mit dem P-T7PromEGFP-PCR-Produkt, nachgewiesen mit Hilfe der RT-PCR. Das PCR-Produkt wurde in einer Konzentration von 320 ng/ μ l zu 9x 0,3 μ l Tropfen pro Reaktion auf Genetix-Objektträger transferiert. Für die Mehrfachbestimmung wurden pro Objektträger drei Reaktionsrahmen geklebt und somit drei Transkriptionen durchgeführt.

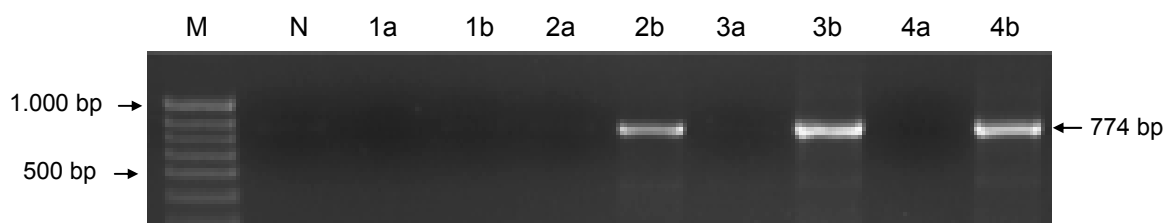


Abb. 24: RT-PCR der OnChip-Transkription mit dem P-T7PromEGFP-PCR-Produkt. Das PCR-Produkt wurde auf Genetix-Objektträger getropft, so dass pro Kopplungsreaktion eine DNA-Menge von 880 ng vorlag. Als Negativkontrolle wurde nur EDC/Methylimidazolösung auf den Objektträger pipettiert (1). Pro Objektträger wurden drei Rahmen geklebt, d.h. drei OnChip-Reaktionen durchgeführt (2, 3, 4).

Die Kopplungsreaktion erfolgte für 72 h und die Objektträger wurden vor der Transkription gewaschen. Die synthetisierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und diese in einer PCR amplifiziert (b). Für den Ausschluss einer DNA-Kontamination wurden in der PCR auch Aliquots der RNA nach dem DNA-Verdau bzw. vor der Reversen Transkription eingesetzt (a). N repräsentiert die PCR-Kontrolle ohne DNA-Matrize.

M) Hyperladder IV.

Die RT-PCR lieferte den Beweis, dass die Oberflächen-Transkription erfolgreich war (Abb. 24 2b, 3b, 4b). Bei allen drei Reaktionen wurde eine deutliche EGFP-PCR-Produkt-Bande mit einer Größe von 774 bp detektiert. Damit eine mögliche Verschleppung an PCR-Produkt während der einzelnen Waschschriffe ausgeschlossen werden konnte, wurde ein Objektträger nur mit EDC/Methylimidazolösung betropft. Diese Kontrolle (1) wurde entsprechend den anderen Proben behandelt. Da hier kein PCR-Signal detektiert wurde, ist eine DNA-Verschleppung zwischen den einzelnen Reaktionsräumen auszuschließen.

Zusätzlich wurde gezeigt, dass das PCR-Signal ausschließlich auf RNA-Moleküle zurückzuführen ist, da die Proben vor der cDNA-Synthese keine PCR-Signale lieferten (a) und die Taq-Polymerase keine RNA-DNA-Hybride vermehren kann.

Da bei allen drei Transkriptionsreaktionen RNA synthetisiert wurde, kann die längere Kopplungszeit als der entscheidende Faktor für den Erfolg der Oberflächenreaktion betrachtet werden.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde das Experiment mit dem T7TermEGFP-PCR-Produkt unter gleichen Reaktionsbedingungen wiederholt (Abb. 25). Auch hier bestätigte sich die erfolgreiche Oberflächen-Transkription. Die Proben vor der Reversen Transkription (a) zeigen, dass die PCR-Signale (b) eindeutig von der in cDNA umgeschriebenen RNA stammen.

Für alle weiteren OnChip-Transkriptionen und anderen Oberflächenreaktionen wurde eine Kopplungszeit von 72 h bei Oligonukleotiden sowie PCR-Produkten eingehalten.

Mit dem entscheidenden Durchbruch in der Oberflächen-Transkription wurden erneut sterilisierte (3h, 180°C), im Haus silanisierte Objektträger in einer RNA-Synthese eingesetzt, die aber weiterhin erfolglos blieb (Abbildungen nicht gezeigt). Unter dem Einfluss von Sauerstoff reagieren die Aminogruppen der Oberflächen zu inerten Iminen, die somit einer Verbindung mit DNA-Molekülen verloren gehen. Dieser negative Effekt wird durch eine hohe Temperatur stark beschleunigt. Deshalb wurden in einem neuen Experiment, im Haus silanisierte Objektträger in einer Stickstoff-Atmosphäre für jeweils eine Stunde oder drei

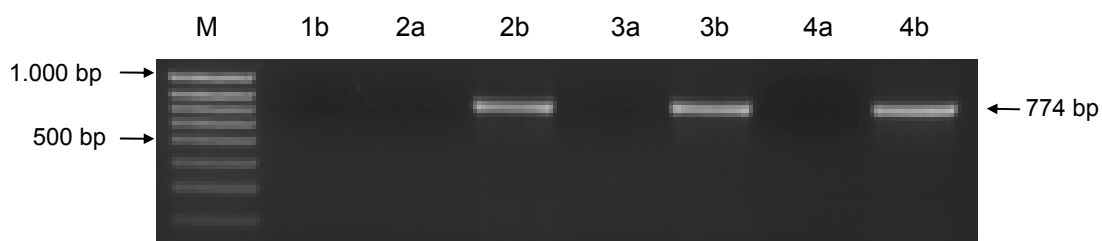


Abb. 25: RT-PCR der OnChip-Transkription mit dem T7TermEGFP-PCR-Produkt. Es wurden drei Reaktionen (2, 3, 4) auf einem Genetix-Objektträger durchgeführt und die Proben vor der Reversen Transkription (a) und nach der Reversen Transkription in einer PCR eingesetzt (b). Als Kontrolle wurde EDC/Methylimidazolösung getropft (1). M) Hyperladder IV.

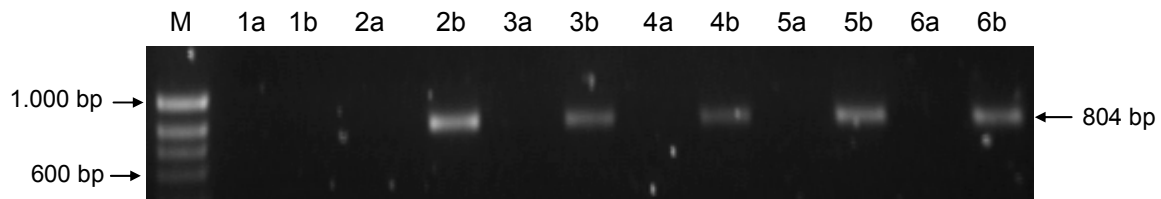


Abb. 26: RT-PCR der Transkription von T7TermEPFP-PCR-Produkt gekoppelt auf N_2 -sterilisierten, im Haus silanisierten Objektträgern. Die H_2O -silanisierten Chips wurden für 3 h (2, 3) oder 1 h (4, 5) unter einer N_2 -Atmosphäre ausgebacken. Als Kontrolle wurde ein Genetix-Objektträger mit EDC/Methylimidazolösung (1) und gekoppelten PCR-Produkt (6) mitgeführt. Es wurden neben der cDNA (b) auch RNA (a) in der PCR eingesetzt. M) Hyperladder IV.

Stunden sterilisiert ($180^\circ C$) und in einer Oberflächen-Transkription eingesetzt ($100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ T7TermEGFP-PCR-Produkt in $5 \times 0,3 \mu\text{l}$ Tropfen).

Erst jetzt gelang mit im Haus silanisierten Objektträgern eine Oberflächen-Transkription (Abb. 26), die außerdem vergleichbar mit der Transkription auf Genetix-Objektträgern ist (6). Dabei ist kein Unterschied, zwischen einer dreistündigen (2, 3) oder einstündigen (4, 5) N_2 -Begasung zu erkennen.

Mit der energieschonenden, einstündigen N_2 -Begasung bei $180^\circ C$ können auch im Haus silanisierte Objektträger von Nukleasen befreit bzw. sterilisiert werden. Die Silanisierung von Objektträgern in großen Mengen, sowie deren spätere Stickstoffbehandlung sind in unserem Institut nur bedingt realisierbar. Daher unterliegen diese Chargen starken Qualitätsschwankungen, so dass auch in weiteren Experimenten aminosilanierte Genetix-Objektträger verwendet wurden.

Da bei einer langen Kopplungsdauer von 72 h auch der Anteil an adsorptiv gebundenen PCR-Produkten steigt, wurde in einem nächsten Experiment der Einfluss des Carbodiimids auf die Kopplung untersucht. Das Carbodiimid bildet mit den Phosphoratomen der DNA einen reaktiven Harnstoff, der den Angriff auf die NH_2 -Gruppen der silanisierten Oberflächen erleichtert. Somit findet die Kopplung wesentlich schneller statt. Unter dem Einfluss des Methylimidazols wird das Carbodiimid in wässriger Umgebung stabilisiert.

Für dieses Experiment wurde das T7TermEGFP-PCR-Produkt gelöst in Methylimidazol einmal ohne und einmal mit EDC auf Genetix-Objektträger pipettiert. Die getropfte DNA-Menge pro Reaktion betrug 50 ng . Das Ergebnis dieses Experimentes ist in der Abb. 27 dargestellt. Deutlich zu erkennen ist, dass die Proben von EDC-vermittelter DNA-Immobilisation ein starkes PCR-Signal liefern (E1b, E2b), während bei der Kopplungsreaktion ohne EDC nur sehr wenige RNA-Moleküle (1b, 2b) amplifiziert werden konnten. Dies zeigt zum einen, dass das Carbodiimid die Kopplungsreaktion beschleunigt und dass die Immobilisation der PCR-Produkte zu einem hohen Anteil kovalent über die

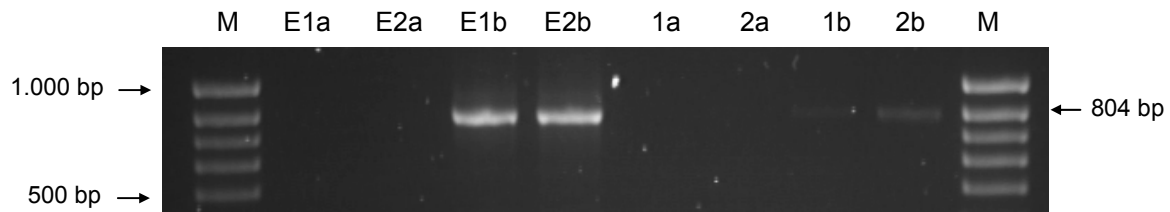


Abb. 27: RT-PCR der OnChip-Transkription des T7TermEGFP-PCR-Produktes nach der Kopplung mit (E1, E2) und ohne EDC (1, 2). Die RNA-Proben wurden in cDNA umgeschrieben und jeweils RNA (a) und cDNA (b) in einer PCR eingesetzt. Jede Kopplungsreaktion wurde als Doppelbestimmung durchgeführt. M) Hyperladder IV.

Phosphatgruppen erfolgt. Die schwachen Banden bei der Kopplung ohne EDC können zum einen auf adsorptiv oder auf einige kovalent gebundene PCR-Produkte hinweisen. Unabhängig von der Kopplungsart unterstützt dieses Experiment die Aussage der vorangegangenen Versuche, dass es sich um eine Festphasen-Transkription handelt.

4.4.1.2 Kopplungs- und Syntheserichtung

Ein weiterer Punkt bei der näheren Untersuchung der Oberflächen-Transkription ist der Einfluss der Kopplungsrichtung auf die Synthese.

Hierfür wurde ein EGFP-PCR-Produkt ohne Terminatorsequenz mit einer 5'-Phosphatmodifikation vor (P-T7PromEGFP) oder nach der DNA-Sequenz (EGFP-PolyT-P) generiert. Je 50 ng der PCR-Produkte wurden auf Genetix-Objektträger getropft. Die Auswertung der Oberflächen-Transkription mittels RT-PCR ist in der Abbildung 28 dargestellt.

Die PCR-Signale der EGFP-PolyT-P- (2) und der P-T7PromEGFP-RNA-Proben (3) sind gleich stark. Es kann kein Unterschied in der Transkriptionsausbeute zwischen beiden Reaktionen festgestellt werden. Hier muss angemerkt werden, dass die PCR nur eine semi-quantitative Analyse zulässt. Unabhängig davon, scheint keine Transkriptionsrichtung bevorzugt bzw. die Transkriptionsleistung nicht vermindert zu sein.

Die Syntheserichtung zur Oberfläche hin oder von dieser weg ist somit nicht für eine Festphasen-Transkription ausschlaggebend.

Die Wiederwendbarkeit der Oberflächen sowie die Transkriptionen mehrerer DNA-Sequenzen konnten ebenfalls erfolgreich gezeigt werden.

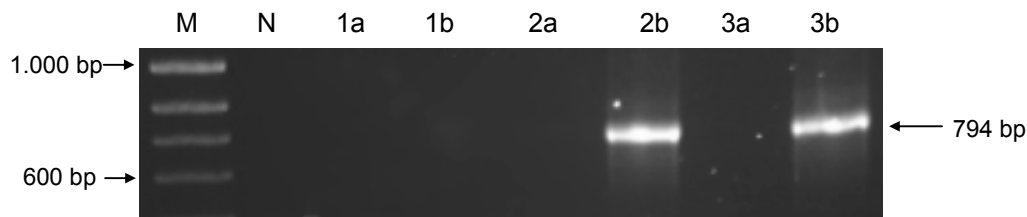


Abb. 28: RT-PCR der OnChip-Transkription mit verschiedenen Syntheserichtungen (b). Hierfür wurden das EGFP-PolyT-P (2) und das P-T7PromEGFP-PCR-Produkt (3) auf Genetix-Objektträger getropft (je 50 ng). Als Kontrollen wurden PCRs mit RNA-Aliquots (a) sowie ohne DNA mitgeführt (N). M) Hyperladder IV.

4.4.1.3 Oberflächen-Polymerasekettenreaktion (OnChip-PCR)

Eine andere Möglichkeit PCR-Produkte an eine Oberfläche dauerhaft zu binden, ist, diese direkt dort synthetisieren zu lassen. Hierfür wurde in unserem Institut die OnChip-PCR auf aminosilanisierten Objektträgern etabliert (von Nickisch-Roseneck *et al.*, 2005a). Basierend auf dieser Arbeit wurde die dort entwickelte OnChip-PCR an die Oberflächen-Amplifikation des EGFP-Gens angelehnt.

In Anbetracht dessen, dass die für die PCR verwendete DNA (z.B. T7TermEGFP oder pET-EGFP) selbst als Transkriptionsvorlage dienen kann, wurde hierfür einzelsträngige cDNA ausgewählt. Die T7-Promotorsequenz wird wie bei dem P-T7PromEGFP-PCR-Produkt über den Vorwärtsprimer, der zuvor auf der Oberfläche immobilisiert wurde, kodiert. Somit wird gewährleistet, dass nur die mittels PCR amplifizierte EGFP-Sequenz, transkriptionsfähig ist. Dazu wurde in einer *in vitro* Transkription mit 1,5 µg pX-Plasmid EGFP-RNA synthetisiert. Die RNA wurde durch einen Verdau von DNA gereinigt und anschließend in cDNA umgeschrieben. Um sicher zu gehen, dass die cDNA keine Kontaminationen von doppelsträngiger DNA beinhaltet, wurden Aliquots der RNA sowie der cDNA in einer PCR, mit den für die spätere OnChip-PCR vorgesehenen Primern (P-CTAG-EGFP-for und EGFPPrev) eingesetzt (Abbildung nicht gezeigt).

Als nächstes wurden mittels EDC-Methode verschiedene Oligonukleotide, darunter der spezifische EGFP-Primer (P-CTAG-EGFP-for), ein Kontroll-Primer (P-CTAG-DFY-for) und die Cy5-markierte Immobilisationskontrolle (CH3) auf Genetix-Objektträger gekoppelt. Hierfür wurden mit dem TopSpot die beiden Primer (100 µM), die Immobilisationskontrolle (10 µM) und die EDC/Methylimidazol-Lösung auf die Objektträger getropft.

Vor der Oberflächenreaktion wurden die Objektträger mit unterschiedlichen Blockreagenzien behandelt und die OnChip-PCR mit verschiedenen EGFP-cDNA-Konzentrationen durchgeführt. Zusätzlich wurde getestet, ob die EGFP-PCR auch ohne einen in Lösung vorhandenen Vorwärtsprimer (T7PromEGFP-for) funktioniert. Der Syntheserfolg wurde über den spezifischen Einbau eines Cy3-markierten Rückwärtsprimers (Cy3-EGFPPrev)

dokumentiert, wofür die Objektträger nach der Reaktion mit dem Affymetrix-Scanner untersucht wurden.

Das Vorliegen eines Vorwärtsprimers in der Reaktionslösung war für den Erfolg der Oberflächen-Reaktion essentiell, da somit die Amplifikation in Lösung gestartet wurde. Auch die DNA-Konzentration war für diese Reaktion entscheidend. Dabei wurden die besten Ergebnisse mit einer Konzentration unter 20 ng pro Reaktion erzielt. Das Blocken der Oberfläche mit BSA sowie der Einsatz der Immobilase-Polymerase zeigten deutlich stärkere Signale bzw. Ausbeuten an amplifizierter DNA (Abbildungen nicht gezeigt). Nach der Optimierung wurden in einer OnChip-PCR die immobilisierten Matrizen für eine spätere OnChip-Transkription geschaffen.

Der Erfolg der OnChip-PCR ist in der Abbildung 29A dokumentiert. Es sind bei allen EGFP-Reihen eines Reaktionsbereiches (4 Arrays) deutliche Fluoreszenzsignale nachweisbar. Neben diesen sind auch schwach fluoreszierende Kontroll-Reihen sichtbar. Möglicherweise repräsentieren diese Signale eine unspezifische Amplifikationsreaktion, bei der die immobilisierte FY-Sequenz als Primer diente. Wahrscheinlicher ist, dass aufgrund von Sequenzhomologien (T7Promotor und RBS) die in Lösung befindliche Cy3-markierte, einzelsträngige EGFP-Sequenz an den Kontroll-Primer hybridisierte. Als zusätzliche Kontrolle wurde eine PCR ohne Taq-Polymerase durchgeführt, d.h. ohne Vervielfältigung der DNA-Sequenz, bei der kein einziges Signal, sei es bei den Kontroll- oder EGFP-Reihen, detektiert werden konnte. Damit wurde auch bewiesen, dass es sich um keine unspezifische Anlagerung des Cy3-markierten EGFP-Rückwärtsprimers an den EGFP-Vorwärts- bzw. den FY-Primer handelt (Abbildungen nicht gezeigt).

Für die Vollständigkeit der Kontrollen erfolgte in einem Nachfolgeexperiment die Dissoziation des nicht-gekoppelten DNA-Stranges durch Erhitzen der Oberfläche. Danach konnten keine Fluoreszenzsignale mehr detektiert werden (29B). Erst mit der anschließenden Hybridisierung des Cy3-markierten Rückwärtsprimers sind die EGFP-Reihen wieder deutlich sichtbar (29C). Dieses Experiment beweist, dass der immobilisierte EGFP-Primer tatsächlich verlängert wurde, denn der zur Sonde umfunktionierte Cy3-Primer ist nur zu dem vollständig neu-synthetisierten DNA-Strang komplementär.

Neben der qualitativen Analyse wurden die Intensitäten aller Signale sowie deren Hintergrund mit der ImaGene-Software ermittelt. Mit einem Kontrastwert der EGFP-Signale von 0,78 ($\pm 0,099$) und der Kontroll-Signale (schwarze Balken) von 0,47 ($\pm 0,189$) wird die erste visuelle Auswertung anhand des Balkendiagramms (Abb. 30) bestätigt. Nach der Dissoziation (weiß) und anschließender Hybridisierung (grau) des Cy3-EGFP-Primers fällt der EGFP-Kontrastwert um 27% auf 0,57 ($\pm 0,174$). Mit der Hybridisierung des markierten Rückwärtsprimers an den neu-synthetisierten, immobilisierten DNA-Strang wurde nur der Nachweis der Amplifikation erbracht. Dabei wurde eine maximale Bindungskapazität nicht erreicht, was sich in dem etwas niedrigeren Kontrastwert widerspiegelt. Zusätzlich kann die

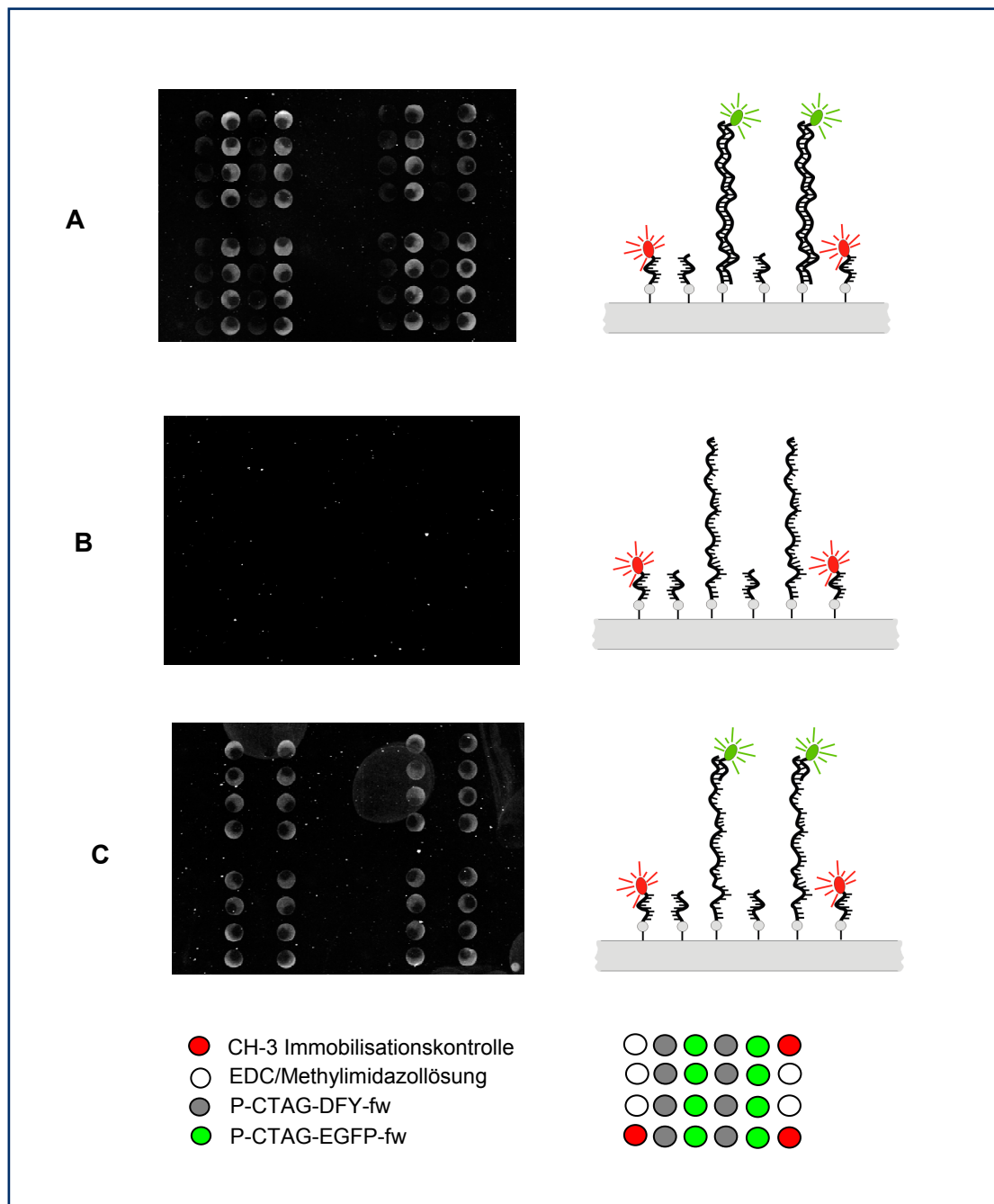


Abb. 29: OnChip-PCR zur Amplifikation einer immobilisierten Transkriptionsmatrize für die EGFP-RNA-Synthese. Es wurden mit Hilfe des TopSpots der EGFP-Primer (P-CTAG-EGFP-fw, 100 μ M), ein Kontrollprimer (P-CTAG-DFY-fw, 100 μ M), eine Immobilisationskontrolle (10 μ M) in Methylimidazol/EDC-Lösung auf aminosilanisierte Objektträger (Genetix) getropft. Zusätzlich wurde auch das Lösungsmittel selbst auf die Oberfläche gebracht. Insgesamt wurden zwei Reaktionsbereiche mit jeweils vier Arrays (4x6) gedruckt. Die OnChip-PCR erfolgte zur späteren Detektion der PCR-Produkte mit einem Cy3-markierten EGFP-Rückwärtsprimer (Cy3-EGFPprev) (A).

Für den Nachweis, dass es sich tatsächlich um verlängerte DNA-Sequenzen handelt, wurden die hybridisierten Stränge durch Erhitzen abgelöst. Vor der erneuten Hybridisierung wurde überprüft, dass keine Cy3-Markierungen mehr detektierbar sind (B).

Zum Schluss wurden diese Objektträger in einer Hybridisierung eingesetzt, bei der der Rückwärtsprimer als Cy3-markierte Sonde (100 nm) eingesetzt wurde (C). Die Auswertung sämtlicher Ergebnisse erfolgte mit dem Affymetrix-Scanner (ex 548nm/em 570nm) mit einer Signalverstärkung von 50 db.

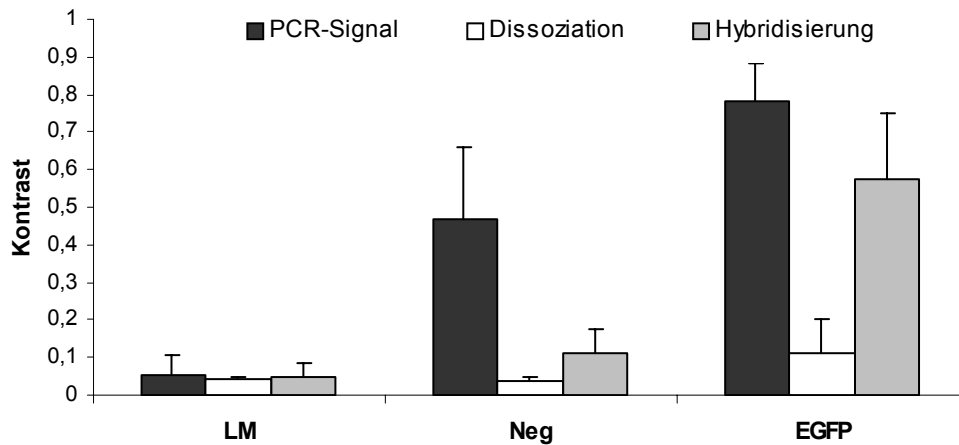


Abb. 30: Balkendiagramm zur Auswertung der OnChip-PCR-Experimente mit Hilfe der berechneten Kontrastwerte. Hierfür wurden die Objektträger am Affymetrix-Scanner ausgelesen (50 db) und die Intensitäten der Signale und deren Hintergrund mit der ImaGene-Software ermittelt. Neben dem getropften Lösungsmittel (LM) wurden die Kontraste der Kontroll- (Neg) und der EGFP-Reihen (EGFP) berechnet. Die PCR-Signale (schwarz) wurden mit den Dissoziations- (weiß) und Hybridisierungssignalen (grau) verglichen.

zur Dissoziation eingesetzte starke Erhitzung der Oberfläche, zu einer Ablösung schollenartiger Silanschichten und den darauf gebundenen DNA-Sequenzen geführt haben. Mit einem deutlich geringeren Kontrastwert der Primer-Kontrolle (Neg grau) von 0,11 ($\pm 0,089$), was einem Verlust von 79% entspricht, wird die Hypothese, dass die unspezifische DNA-Bindung von der einzelsträngigen, neu-synthetisierten EGFP-Sequenz und nicht von einer Amplifikation stammt, favorisiert. Um diesen Effekt zu verhindern, kann durch Temperaturerhöhung des letzten PCR-Hybridisierungsschrittes, eine höhere Spezifität erzielt werden.

Diese Experimente haben gezeigt, dass sich die EGFP-Sequenz auf einer Oberfläche synthetisieren lässt. Die gebundenen DNA-Moleküle bilden nun die Grundlage für eine Oberflächen-Transkription.

4.4.1.3.1 Transkription von Oberflächen-synthetisierten PCR-Produkten

Die mittels OnChip-PCR synthetisierten, nun auf der Oberfläche immobilisierten EGFP-Sequenzen können nun als Transkriptionsmatrizen dienen. Für diese Transkriptionsexperimente wurden neben den Reaktionsbereichen mit detektierten EGFP-Sequenzen (Abb. 31/3) auch zwei Kontroll-Reaktionen durchgeführt. Die Kontroll-Reaktionen umfassen einerseits einen Reaktionsbereich, bei dem trotz Anwesenheit aller PCR-Komponenten keine Fluoreszenzsignale der EGFP-Reihen gemessen werden konnten (31/1) und andererseits einen Reaktionsbereich, bei dem die Taq-Polymerase fehlte (31/2). Bei

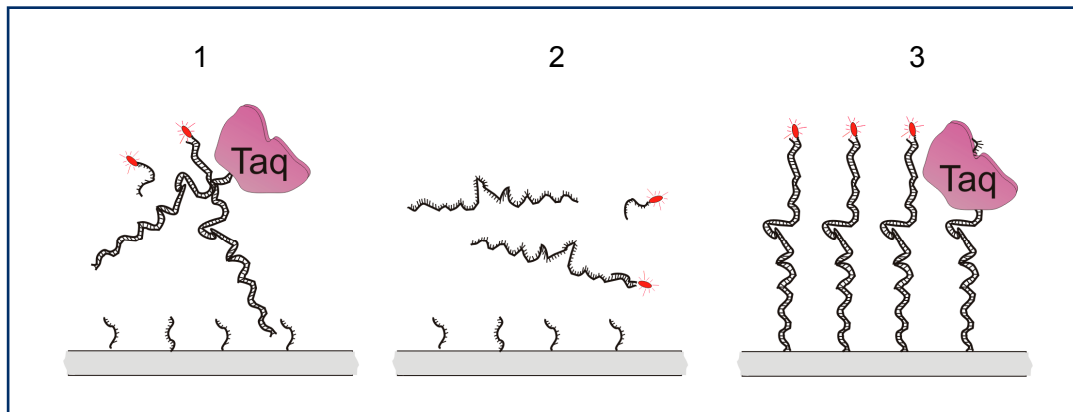


Abb. 31: Übersicht über die OnChip-PCR-Reaktionen bzw. die daraus generierten Reaktionsbereiche, die später für eine Oberflächen-Transkription dienen. Neben einer PCR-Reaktion ohne detektierbare EGFP-Reihen (1) wurde eine Reaktion ohne Taq-Polymerase (2) mitgeführt. Zu diesen Kontrollen wurde der Reaktionsbereich mit den EGFP-Signalen (3) für die Transkription ausgewählt.

dem Reaktionsbereich mit den EGFP-Reihen ist nach der RT-PCR eine deutliche EGFP-DNA-Bande (32/3b) im Agarosegel sichtbar. Da davon ausgegangen werden kann, dass in den ersten PCR-Zyklen die DNA-Moleküle in Lösung vermehrt werden, besteht die Möglichkeit, dass diese ungebundenen, transkriptionsfähigen Matrizen ein positives Signal nach der RT-PCR liefern können. Diese Vermutung wurde mit der ersten Kontrolle widerlegt (32/1b). Mit der zweiten Kontroll-Reaktion wurde nachgewiesen, dass die hybridisierte cDNA selbst, sei es auf der Oberfläche oder in Lösung, keine Transkriptionsmatrize darstellt (32/2b).

Dieses Experiment zeigt erneut, dass eine Transkription an Glasoberflächen-gebundenen DNA-Sequenzen möglich ist.

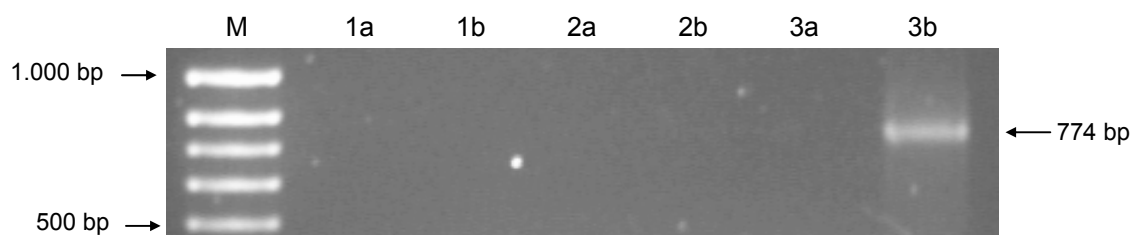


Abb. 32: RT-PCR der OnChip-Transkription von EGFP an Oberflächen-synthetisierten Transkriptionsmatrizen. Die RNA-Proben wurden in cDNA umgeschrieben und jeweils RNA (a) und cDNA (b) in einer PCR eingesetzt. Es wurde ein Reaktionsbereich ohne detektiertes EGFP-PCR-Produkt (1), ein Reaktionsbereich ohne EGFP-Amplifikation (2) und mit EGFP-PCR-Produkt (3) für eine Transkriptionsreaktion eingesetzt. M) Hyperladder IV.

4.4.1.4 Maschinelles Tropfen der PCR-Produkte mit dem sciFLEXARRAYER

4.4.1.4.1 *Blocken der Oberfläche*

Das Tropfen mit der Hand ist eine schnelle, handliche und kostensparende Methode, die gewünschten PCR-Produkte auf einer Oberfläche zu platzieren. Dazu kann mit der Verwendung von Filterspitzen eine RNase-Kontamination eingeschränkt werden. Die gesetzten Tropfen können aber in ihrer Ausdehnung und ihrem Volumen voneinander abweichen.

Für den Transfer eines homogenen Arrays steht eine Reihe von Mikroarrayern zur Verfügung, darunter auch der sciFLEXARRAYER der Firma Scienion. Es sollte für spätere Anwendungen sowie die Miniaturisierung der Oberflächen und Reaktionsbereiche getestet werden, ob diese Mikroarrayer für das RNase-freie Tropfen einsetzbar sind. Neben der Gewährleistung einer RNase-freien Oberfläche ist das Verstopfen von Kapillaren, Nadeln und Druckköpfen mit langen DNA-Molekülen ein Problem.

Während bei der OnChip-PCR die synthetisierte Nukleinsäure über die DNA-Basenpaarung direkt an der Oberfläche gebunden wird, liegt die RNA nach der Transkription in Lösung vor. Es besteht damit die Möglichkeit, dass die negativ geladenen RNA-Moleküle mit den positiven geladenen Aminogruppen in Wechselwirkung treten und damit der Lösung und ihrem Nachweis verloren gehen. Hierfür wurde mit der Passivierung durch Ladungsumkehrung, bei der die Aminogruppen der Silanoberfläche mit der Ringstruktur eines reaktiven Anhydrids reagieren und so mit einer endständigen Carboxylgruppe verknüpft werden (Blocken nach Diehl), der Einfluss auf die Nachweisbarkeit der RNA-Moleküle untersucht. Es wurde für dieses Experiment mit einer Konzentration von T7TermEGFP-PCR-Produkt von 150 pg/nl gearbeitet. Die zu koppelnde DNA-Menge wurde in 15 x 15 Tropfen (500 µm Abstand) a 500 pl auf vier Objektträger transferiert. Nach der EDC-Kopplung wurden zwei Objektträger entsprechend der vorangegangenen Versuche gewaschen, während die Oberflächen der anderen beiden nach der Diehl-Methode geblockt wurden. Die anschließende Oberflächen-Reaktion wurde im gleichen Verfahren durchgeführt. In der Abbildung 33 ist das Ergebnis dokumentiert. Zur Kontrolle der Transkription wurden wieder Aliquots der RNA in der PCR eingesetzt (A). Neben der PCR-(1) und Transkriptionskontrolle ohne DNA (2) sind die RT-PCR-Signale der Oberflächen-Transkriptionen deutlich zu sehen (3-6). Hiermit konnte mit maschinell getropften PCR-Produkten eine erfolgreiche Festphasen-Transkription gezeigt werden.

Auffällig dabei ist, dass es zwischen den geblockten (3, 6) und ungeblockten (4, 5) Oberflächen keinen Intensitätsunterschied gibt.

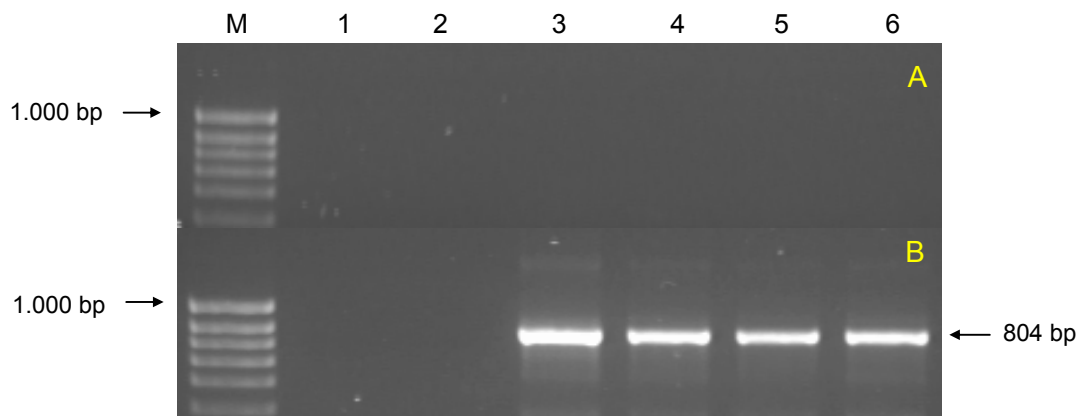


Abb. 33: RT-PCR der Oberflächen-Transkription mit geblockten (3, 6) und ungeblockten (4, 5) Oberflächen. Auf die Oberfläche wurde mit dem sciFLEXARRAYER ein 15x 5 Array des T7TermEGFP-PCR-Produktes (150 ng/ μ l) getropft. Nach der EDC-Kopplung wurden die Objektträger entweder gewaschen (4, 5) oder aber nach der Diehl-Methode behandelt (3, 6). Die synthetisierte RNA wurde entweder direkt in einer PCR (A) eingesetzt bzw. für den Nachweis in cDNA umgeschrieben (B). Die PCR-Kontrolle (1B) sowie die Transkriptionskontrolle im Reaktionsgefäß (2) wurden ohne DNA durchgeführt (M) Hyperladder IV.

Dieses Ergebnis weist daraufhin, dass keine Erhöhung der Matrizenzahl durch einen abstoßenden Effekt der Oberfläche gewährleistet wird. Da die PCR aufgrund ihrer exponentiellen DNA-Verzehrung nur eine semi-quantitative Analyse zulässt, kann kein absoluter Vergleich zwischen den Signalen gezogen werden. Eine positive Tendenz wäre aber trotzdem messbar. Somit werden alle weiteren Versuche, wie bereits vorgenommen, durchgeführt.

4.4.1.4.2 Variation des maschinellen Tropfens

Im nächsten Schritt wurde, um die zu koppelnde DNA-Menge an der Oberfläche zu erhöhen, zum einen auf zwei Genetix-Objektträger 30 x 30 Tropfen (250 μ m Abstand) a 500 pl transferiert und zum anderen auf zwei Objektträger 30 x 30 Tropfen, wobei an jeder Position der DNA-Tropfen zweimal gesetzt wurde (1 nl). Es wurde für dieses Experiment mit einer Konzentration (T7TermEGFP-PCR-Produkt) von 100 pg/nl gearbeitet. Die absolute DNA-Menge bei dem einmaligen Tropfen betrug 45 ng bzw. 90 ng beim zweimaligen Tropfen. In der Abbildung 34 ist das Ergebnis der Oberflächen-Transkription mittels RT-PCR gezeigt. Als Kontrollen wurden wieder Aliquots der RNA der PCR eingesetzt (A). Die Oberflächen-Transkription aller getropften Arrays verlief erfolgreich (3B-6B), während die PCR- (1) und Transkriptionskontrolle ohne DNA (2) eindeutig negativ sind.

Wiedererwartend ist kein Intensitätsunterschied zwischen den Signalen von 45 (3B, 4B) und 90 ng (5B, 6B) erkennbar. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die gekoppelte PCR-Produkt-Menge bei allen Oberflächen gleich ist. Es ist bekannt, dass auf einer

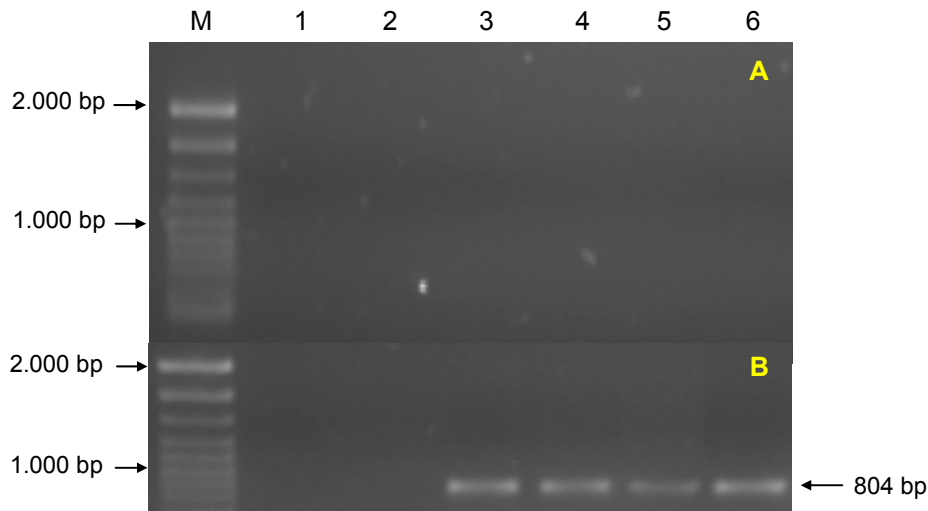


Abb. 34: RT-PCR der Oberflächen-Transkription von maschinell getropftem PCR-Produkt. Hierfür wurde das T7TermEGFP-PCR-Produkt mit dem sciFLEXARRAYER in einer Konzentration von 100 ng/ μ l in 30 x 30 Tropfen (500 μ l) (3, 4) oder 30 x 30 Tropfen (1 nl) (5, 6) auf die Oberfläche gesetzt und mittels EDC-Methode gekoppelt. Es wurden jeweils Aliquots der RNA (A) und der cDNA (B) in der PCR eingesetzt. Als Kontrollen wurde DEPC-H₂O in der PCR (1) sowie in einer Transkriptionsreaktion im Reaktionsgefäß verwendet (2). M) Hyperladder II.

aminosilanisierten Fläche von 1 mm² maximal 16 fmol an 15 nt langen Oligonukleotiden über eine endständige Phosphatmodifikation binden können.

Anhand der Kreisfläche eines Tropfens ($d=0,2$ mm) von ca. 0,047 mm² kann eine Bindungskapazität von 0,752 fmol berechnet werden. Mit dem einmaligen Setzen eines Tropfens gelangen auf 0,047 mm² 0,075 fmol an EGFP-PCR-Produkt (1.002 bp), das entspricht ca. einem Zehntel der maximalen Bindungskapazität der Tropfenfläche. Bei dem zweimaligen Tropfen erhöht sich der Wert nur um das Doppelte auf 0,15 fmol.

Die Bindungskapazität von 16 fmol/mm² wurde für kurze Oligonukleotide ermittelt; diese kann aber, aufgrund der verstärkten abstoßenden Wechselwirkungen bei großen ds DNA-Molekülen, deutlich herabgesetzt sein. Das bedeutet, dass mit dem einmaligen Setzen eines Tropfens mit 100 pg/nl PCR-Produkt, die möglichen Kopplungsstellen bereits abgesättigt sind. Mit der schwankenden Qualität der aminosilanisierten Oberflächen variiert auch die Bindungskapazität stark und erschwert somit den Vergleich zwischen verschiedenen getropften Konzentrationen.

4.4.1.5 Kopplungseffizienz

Da das maschinelle Betropfen sehr zeitaufwendig, mit einem großen Durchsatz an DNA verbunden und anfällig für das Verstopfen der Kapillaren ist, wurden die nächsten Experimente mit handgetropften Arrays durchgeführt.

Dafür wurden auf Genetix-Objektträger zwei Arrays (5x 0,3 μ l) mit 10 ng/ μ l oder 50 ng/ μ l T7TermEGFP-PCR-Produkt getropft. Die RNA-Synthese verlief bei allen Reaktionen erfolgreich (Abb. 35), während die Kontrollreaktionen ohne getropfte DNA (2,3) keine Signale in der RT-PCR lieferten. Auch hier wurde wieder gezeigt, dass die PCR-Signale exklusiv von der in cDNA umgeschriebenen RNA stammen (B). Als zusätzliche Kontrollen wurde die PCR ohne DNA (1A) sowie mit 0,6 ng/ μ l pX-Vektor (1B) durchgeführt.

In der Gelanalyse, ist bei den Arrays mit 15 ng getropfter DNA-Menge (4B, 5B) ein schwächeres Signal als bei den Arrays mit 78 ng (6B, 7B) zu erkennen, was auf eine größere Anzahl an gekoppelten PCR-Produkten hinweist.

In dem vorherigen Experiment konnte mit einer höheren Anzahl an DNA-Molekülen, keine Verstärkung der Signalintensität erzielt werden, was auf eine abgesättigte Oberfläche mit dem T7Term-EPGF-PCR-Produkt (1,6 fmol/ mm^2) zurückgeführt wurde.

Ein handpipettierter Tropfen mit einem Volumen von 0,3 μ l, besitzt einen ungefähren Durchmesser von 1,5 bis 2 mm, je nach Hydrophobizität der Oberfläche. Daraus errechnet sich unter Einbezug einer Tropfenfläche von 3,1 mm^2 eine maximale Bindungskapazität von 5 fmol. Bei 3 ng pro Tropfen, das entspricht 4,5 fmol, wären 10% der Oberfläche für eine DNA-Kopplung noch zugänglich. Unter diesem Aspekt, lässt sich die erhöhte Ausbeute an RNA mit der getropften DNA-Konzentration von 50 ng/ μ l erklären.

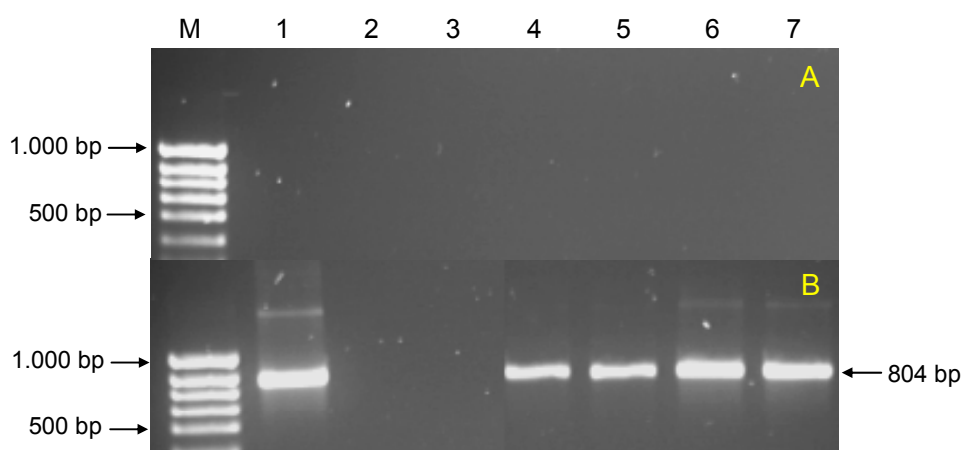


Abb. 35: RT-PCR der Oberflächen-Transkription verschiedener getropfter PCR-Produkt-Konzentrationen. Es wurden je 5 Tropfen a 0,3 μ l mit einer Konzentration von 10 ng/ μ l (4,5) und 50 ng/ μ l (6, 7) getropft und die synthetisierte RNA (A) sowie die cDNA (B) in der PCR eingesetzt. Neben der PCR- (1A) und Transkriptions-Kontrolle ohne DNA (2, 3) wurde eine PCR mit 0,6 ng/ μ l pX-Plasmid durchgeführt (1B). M) Hyperladder IV.

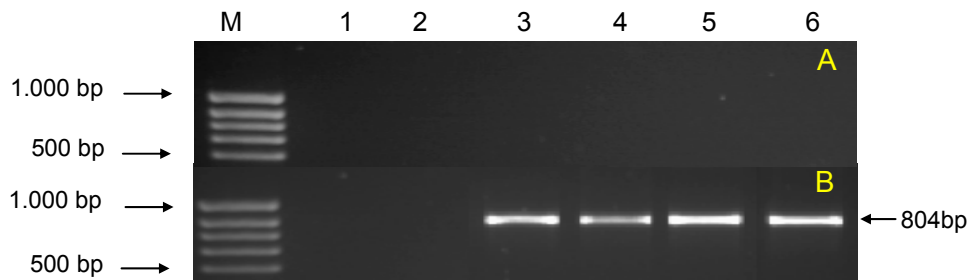


Abb. 36: RT-PCR der Oberflächen-Transkription getropfter T7TermPCR-Produkt-Konzentrationen. Es wurden 50 ng/μl (3), 100 ng/μl (4), 200 ng/μl (5) und 400 ng/μl (6) zu jeweils 5x 0,3 μl getropft. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben und Aliquots der RNA (A) sowie cDNA (B) in einer PCR eingesetzt. Zusätzlich wurde die PCR (1B) und die Transkription ohne DNA (2) durchgeführt. M) Hyperladder IV.

Ein weiterer Beweis für die Absättigung der Oberfläche wurde mit dem nächsten Versuch erzielt, wobei hier die Konzentration des PCR-Produktes schrittweise von 50 ng/μl, 100 ng/μl, 200 ng/μl auf 400 ng/μl erhöht wurde (Abb. 36). Es konnte kein Intensitätsanstieg der RT-PCR-Signale verzeichnet werden (3B-6B). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass bereits eine Konzentration ca. 10 ng/μl pro Tropfen für eine fast vollständige Absättigung der Oberfläche ausreichen kann. Die zu koppelnde DNA-Menge kann somit nur durch eine größere Oberflächennutzung erhöht werden.

Da die PCR, wie bereits beschrieben, nur eine semi-quantitative Analyse zulässt, wurde in einem weiteren Experiment, Cy5-markiertes PCR-Produkt in verschiedenen Konzentrationen auf Genetix-Objektträger getropft. Die PCR-Produkte wurden unter der Verwendung eines Cy5-markierten Primers endständig mit einem Fluorophor versehen, so dass die fluoreszierenden DNA-Moleküle mit Hilfe eines Scanners detektiert werden können.

Nach dem Betropfen mit den PCR-Produkten wurden die ungewaschenen Objektträger im ArrayWorx-Scanner ausgelesen und mit den aus der ImaGene-Software ermittelten Signalintensitäten eine Kalibrierkurve erstellt. Hierfür wurden die Signalintensitäten der PCR-Produkt-Tropfen von den Signalintensitäten ohne PCR-Produkt abgezogen. Die daraus resultierenden Werte wurden als Intensität im Balkendiagramm (Abb. 37) dargestellt. Dieses zeigt einen kontinuierlichen Anstieg der Intensitäten in Abhängigkeit von der PCR-Produkt-Konzentration. Mit dieser Kalibrierkurve kann eine Aussage über die gekoppelte DNA-Menge getroffen werden. Dafür wurden Genetix-Objektträger mit 75 ng/μl Cy5-markiertem PCR-Produkt betropft und anschließend gewaschen. Diese Objektträger wurden nach dem gleichen Prinzip ausgewertet und die gemittelte Intensität mit den Werten der Kalibrierkurve verglichen.

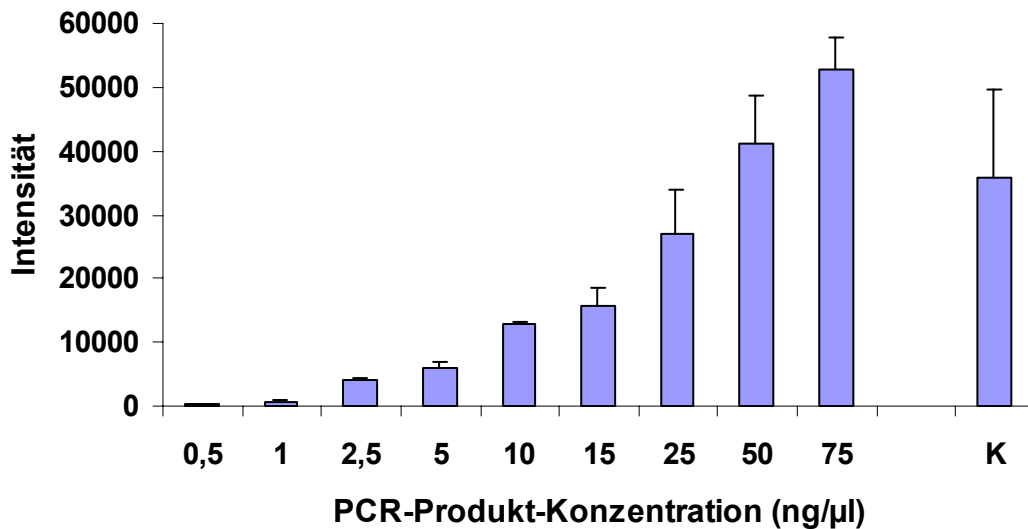


Abb. 37: Balkendiagramm zur Analyse der gekoppelten, Cy5-markierten T7TermEGFP-PCR-Produkt-Menge. Das PCR-Produkt (75 ng/µl) wurde mittels EDC-Methode gekoppelt und die nicht-gebundenen DNA-Moleküle durch verschiedene Waschschriffe von der Oberfläche entfernt. Die Objektträger wurden im ArrayWorX-Scanner ausgelesen und die Spotintensitäten mit Hilfe der ImaGene-Software ermittelt. Die Intensitäten der Tropfen wurden gemittelt und zusammen mit der Standardabweichung ins Balkendiagramm eingefügt (K). Die Kalibrierkurve wurde mit verschiedenen Konzentrationen an Cy5-markiertem PCR-Produkt bestimmt (ohne Waschschriffe).

Für die gekoppelten PCR-Produkte wurde eine Intensität von 35964,1 (\pm 13535,5) berechnet (K). Im Vergleich mit den Werten der Kalibrierkurve ergibt sich daraus eine Kopplungseffizienz von ca. 40 ng/µl. Das entspricht einer PCR-Produkt-Menge von 12 ng bzw. einer Molekülanzahl von 18,1 fmol pro Tropfen (5,8 fmol/mm²). Dieser Wert liegt im Vergleich zu der Belegungsdichte der maschinell getropften PCR-Produkte um das 3,5fache höher, aber immer noch unter dem verifizierten Wert von 16 fmol/mm². Ausgehend von 12 ng gekoppelten PCR-Produkten errechnet sich für jede Transkriptionsreaktion eine DNA-Menge von 60 ng. Diese Aussage ist mit den Ergebnissen der RT-PCR-Analyse vergleichbar, da hier bereits ab 75 ng getropfter Gesamt-DNA-Menge kein Intensitätsanstieg der PCR-Signale mehr verzeichnet wurde. Sicherlich treten bei dem Tropfen per Hand größere Volumenschwankungen auf, die neben der Qualität der Oberfläche, die Kopplungseffizienz am meisten beeinflussen. Deshalb können bei verschiedenen Objektträger-Chargen diese Werte noch stärker variieren.

Eine Verringerung der getropften DNA-Menge auf 3 ng (5x 0,3 µl mit 2 ng/µl T7TermEGFP-PCR-Produkt) pro Reaktionsbereich lieferte in einer Oberflächen-Transkription noch detektierbare Signale (Abb. 38). Die PCR-Produkt-Banden waren aber so schwach, dass sie

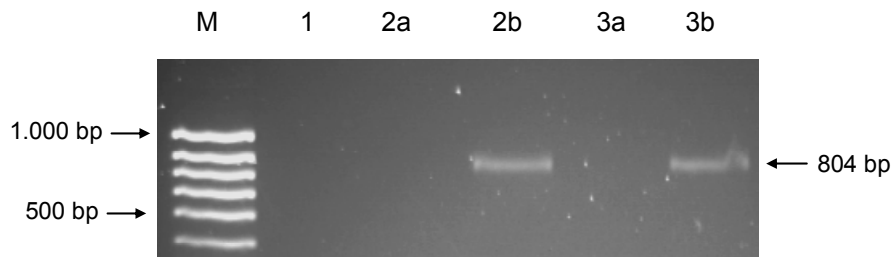


Abb. 38: RT-PCR der Oberflächen-Transkription mit T7TermEGFP-PCR-Produkt. Für jedes Array wurden 3 ng PCR-Produkt getropft (2, 3) und als Kontrolle ein Array ohne DNA (1) mitgeführt. Neben den PCR-Proben mit RNA (a) wurden die PCR-Proben mit cDNA (b) aufgetragen. M) Hyperladder IV.

nicht direkt mit den Reaktionen größerer DNA-Mengen verglichen werden konnten. Trotzdem wurde mit dieser Doppelbestimmung gezeigt, dass auch bei DNA-Mengen von 3 ng noch genügend PCR-Produkt für eine RNA-Synthese auf der Oberfläche gebunden ist.

Das OnChip-PCR-Experiment (Abb.32) beweist ebenfalls, dass mit geringen Mengen an gekoppelten PCR-Produkten noch RNA-Moleküle nachgewiesen werden können. Dazu wurde auch eine Cy3-PCR-Produkt-Kalibrierkurve erstellt, wobei das Cy3-markierte T7PromEGFP-PCR-Produkt mit Hilfe des TopSpots auf die Objektträger gedruckt wurde.

Alle weiteren Schritte wurden, wie bei der Cy5-Kalibrierkurve beschrieben, durchgeführt,

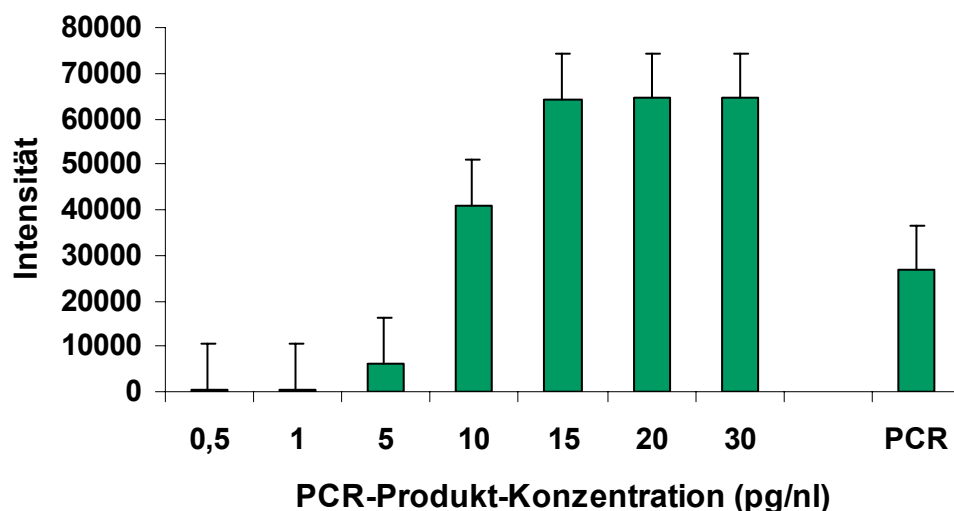


Abb. 39: Balkendiagramm zur Auswertung der OnChip-PCR-Produkt-Menge mit Hilfe einer Cy3-Kalibrierkurve. Das Cy3-markierte T7PromEGFP-PCR-Produkt wurde in verschiedenen Konzentrationen mit Hilfe des TopSpots auf Genetix-Objektträger gedruckt. Die am Affymetrix-Scanner ausgelesenen Signale wurden mit der ImaGene-Software in Intensitäten umgewandelt. Neben den verschiedenen Konzentrationen wurde die Signalintensität der OnChip-PCR-Experimente eingetragen (PCR).

wobei die Auswertung mit dem Affymetrix-Scanner bei einer Verstärkung von 50 db erfolgte (Abb. 39). Die Kalibrierkurve zeigt zwischen 1 und 15 pg/nl einen linearen Anstieg, der ab 15 ng/ μ l stagniert. Da bei einer Scanner-Einstellung von 50 db aufgenommen wurde, sind die Reihen mit den höheren Konzentrationen stark überstrahlt bzw. haben die Signale einen maximalen Graustufenwert von 65.535 erreicht. Bei einer geringeren Verstärkung (20-30 db) gibt es diesen Effekt nicht (Diagramm nicht gezeigt). Das PCR-Signal mit einer Intensität von 26.595,2 (\pm 7826,7) liegt genau im linearen Bereich (1-15 pg/nl). Dieser wurde einzeln herausgenommen und mittels linearer Regression die Konzentration des gebundenen PCR-Produktes berechnet ($y=5.782,8x - 2.0728$), Korrelationskoeffizient von 0,99). Für ein einzelnes PCR-Signal ergibt sich anhand dieser Formel eine Konzentration von 8,18 pg/nl, das entspricht einer PCR-Produkt-Menge von 4,1 pg (0,13fmol/ mm^2). Auf die Gesamtheit der Signale (32) eines Reaktionsbereiches bezogen, errechnet sich eine absolute DNA-Menge von 0,13 ng. Mit dieser DNA-Menge war es auch möglich, eine RNA-Synthese im detektierbaren Maßstab durchzuführen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit handpipettierten PCR-Produkten erzielt, die aber nicht zuverlässig reproduzierbar waren (Abbildungen nicht gezeigt).

4.4.1.6 Reproduktion der Transkription auf einer Oberfläche

Die Bindung von DNA-Molekülen an einer Oberfläche bringt den Vorteil, dass diese Moleküle mehrfach als Matrizen zur Verfügung stehen. Die nächsten Experimente zeigen, dass mit der Kopplung von PCR-Produkten auf einer Oberfläche, diese mehrfach als Vorlagen für Transkriptions-Reaktionen genutzt werden können (Abb. 40). In der ersten Reaktion wurde sowohl bei 3, 15, 75 und 150 ng getropfter DNA (T7TermEGFP-PCR-Produkt), RNA-Moleküle synthetisiert (5, 9). Das gilt auch für die erste Wiederholung, obwohl hier die Signale etwas schwächer ausfallen (6, 10). Um sicher zu gehen, dass die RT-PCR-Signale von neu-synthetisierter RNA stammen, wurde die zweite Wiederholung einmal mit Enzym (7, 11) und einmal ohne Enzym (8, 12) durchgeführt. Hier zeigt sich eindeutig, dass zum einen die Ausbeute an RNA-Molekülen weiter abnimmt und zum anderen, die Signale nicht von RNA-Kontaminationen aus vorangegangenen Transkriptionen stammen.

Parallel dazu wurden 100 ng/ μ l Cy5-markiertes T7TermEGFP-PCR-Produkt getropft (9 x 0,3 μ l) und die Objektträger vor sowie nach jeder Reaktion bzw. Waschen im ArrayWorx ausgelesen. Als Kontrolle wurde eine Reaktion simuliert, bei der anstatt der Transkriptionskomponenten eine Lösung mit 6% Glycerol und 0,1 μ g/ μ l BSA auf das Array pipettiert wurde.

Die errechneten Kontrastwerte aus den Mittelwerten der gemessenen Signalintensitäten der Transkriptionsreaktionen wurden den Simulationen in einem Balkendiagramm gegenübergestellt (Abb. 41). Aufgrund von abgeänderten Scanner-Einstellungen bei den

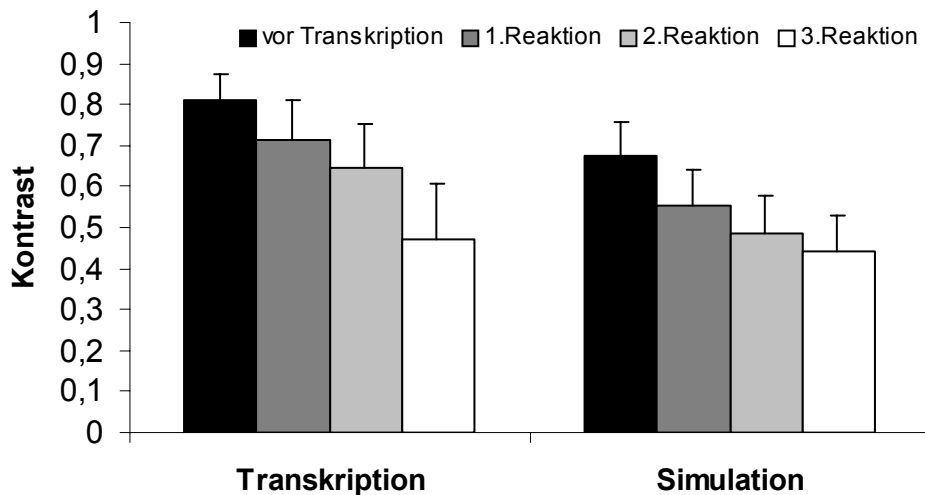


Abb. 41: Balkendiagramm zur Wiederverwendbarkeit von Oberflächen gebundenem PCR-Produkt. Das Cy5-markierte T7Term-EGFP-PCR-Produkt wurde in einer Konzentration von 100 ng/μl auf einen Genetix-Objektträger getropft (9x 0,3 μl). Nach der EDC-Kopplung wurden die Objektträger gewaschen (vor Transkription). Anschließend wurden die Objektträger in einer Transkriptionsreaktion bzw. Simulation eingesetzt (1.Reaktion). Die Reaktionen wurden zweimal wiederholt (2. und 3. Reaktion). Nach jeder Reaktion wurden die Objektträger gewaschen und die Fluoreszenzsignale mit dem ArrayWorx-Scanner gemessen (ex 657 nm/em 670 nm). Die Signalintensitäten sowie der Hintergrund wurden mit der ImaGene Software ausgewertet und die errechneten Kontrastwerte gemittelt und deren Standardabweichungen berechnet.

führt. Sicherlich sind diese Anwendungen sowie die Transkription gleichermaßen an der Signalabnahme beteiligt.

Den Erfolg der Transkription zeigt die Abbildung 42, bei der die Proben der aufeinander folgenden Transkriptionen mittels RT-PCR analysiert wurden (a-c). Auch hier nimmt nach jeder Transkriptionsreaktion das PCR-Signal ab (2B-3B).

Damit sind die Oberflächen-gebundenen PCR-Produkte mehrfach als Matrizen für die

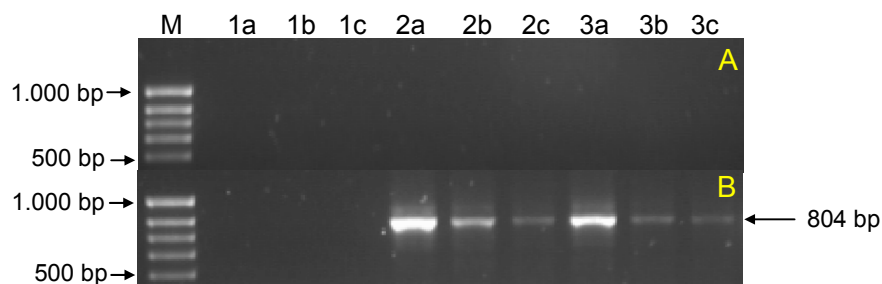


Abb. 42: RT-PCR der OnChip-Transkription mit zwei Wiederholungen (B). Es wurden 100 ng/μl Cy5-markiertes T7TermEGFP-PCR-Produkt auf Genetix-Objektträger getropft. Es wurden insgesamt drei Transkriptionen durchgeführt (a, b, c) mit einem Array ohne immobilisierte DNA (1) sowie zwei Arrays mit PCR-Produkt (2, 3). Als Kontrollen wurden RNA-Aliquots (A) in der PCR eingesetzt. M) Hyperladder IV.

Transkription einsetzbar. Die Abnahme der Signale kann mit der mehrfachen Nutzung der Oberflächen erklärt werden, wobei sich die hybridisierten Stränge bzw. ganze DNA-Doppelstränge womöglich ablösen.

4.4.1.7 Oberflächen-Transkription mit mehreren DNA-Sequenzen (Duplex- und Triplex-Transkription)

Die häufigste Anwendung von Oberflächen-immobilisierten DNA-Sequenzen findet man bei der Analyse mehrerer Gensequenzen.

Dafür wurde das T7TermFY-PCR-Produkt zusammen mit dem T7TermEGFP-PCR-Produkt (je 100 fmol) auf Genetix-Objektträger getropft und eine Transkriptionsreaktion durchgeführt (Abb. 43). Die umgeschriebene cDNA wurde in einer Duplex-PCR, bei der neben den FY-Primern auch die EGFP-Primer in einer Reaktion vorliegen, amplifiziert (b). Zur Kontrolle wurde die RNA ebenfalls in der Duplex-PCR eingesetzt (a).

Die Duplex-PCR zeigt, dass beide Sequenzen parallel amplifiziert werden konnten. Die RNA-Synthese in einer Reaktion war erfolgreich. Daraufhin wurde die Mehrfachtranskription um eine dritte DNA-Sequenz erweitert (Abb. 44). Auch hier wurden jeweils 100 fmol T7TermEGFP, T7TermFY und T7TermMyo auf Genetix-Objektträger pipettiert. In einer Oberflächen-Reaktion wurden alle drei Sequenzen transkribiert. Der Nachweis erfolgte diesmal, aufgrund des geringen Größenunterschieds zwischen dem Myogenin- und dem EGFP-PCR-Produkt, in getrennten PCR-Ansätzen. Mit allen drei Sequenzen gelang die Oberflächen-Transkription in einer Reaktion bzw. in einem Reaktionsbereich (1b, 2b, 3b). In der Effizienz der Transkription kann kein Unterschied festgestellt werden, wobei hier die RT-PCR als Analysemittel unzureichend, aber für eine qualitative Aussage geeignet ist.

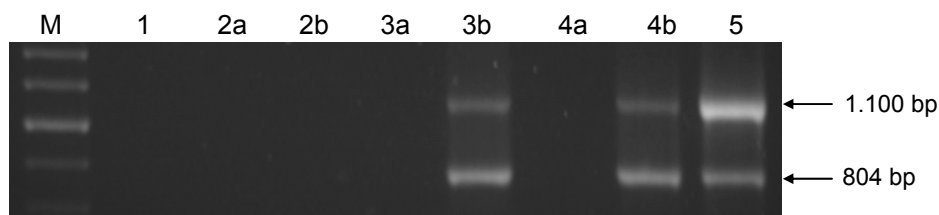


Abb. 43: Duplex-PCR der RNA (a) sowie der umgeschriebenen cDNA (b) einer Duplex-Transkription. Es wurden je 100 fmol von T7TermEGFP- und T7TermFY-PCR-Produkt pro Array auf Genetix-Objektträger getropft (3, 4). Als Kontrollen wurde die Oberflächen-Transkription ohne DNA (2) sowie die Duplex-PCR ohne DNA (1) und mit DNA (5) mitgeführt.
M) Hyperladder II.

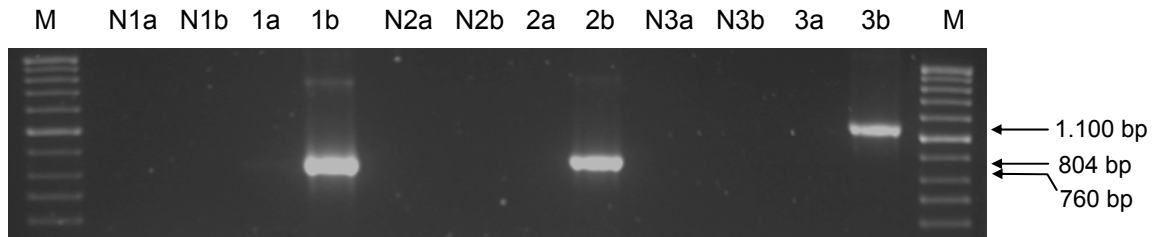


Abb. 44: RT-PCR der Triplex-OnChip-Transkription (b). Es wurden das T7TermMyo-, T7TermEGFP und T7TermFY-PCR-Produkt (je 100 fmol) auf Genetix-Objektträger getropft. Als Kontrolle diente ein Objektträger ohne DNA (N). Für den Nachweis wurde die PCR mit Myogenin-Primern (1), mit EGFP-Primern (2) und FY-Primern (3) in getrennten Ansätzen durchgeführt. Zusätzlich erfolgten die Kontroll-PCRs mit RNA-Aliquots (a). M) Hyperladder II.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Transkription von mehreren DNA-Sequenzen auf einer Oberfläche möglich ist. Die OnChip-Transkription, bei der PCR-Produkte auf Glasoberflächen immobilisiert wurden, konnte mit dieser Arbeit erfolgreich etabliert werden. Dabei wurde gezeigt, dass auch mit dem Einsatz von geringen PCR-Produkt-Mengen, noch RNA-Moleküle detektiert werden können. Dabei spielt die Syntheserichtung der Polymerase keine Rolle. Die Wiederverwendbarkeit der Oberflächen sowie die Transkriptionen mehrerer DNA-Sequenzen konnte ebenfalls erfolgreich gezeigt werden.

4.4.2 Oberflächen-Translation (OnChip-Translation)

4.4.2.1 Etablierung der Oberflächen-Translation

Neben der RNA-Synthese auf einer Glasoberfläche ist auch die Proteinsynthese ein interessanter Aspekt. Auch unter der Betrachtung, alle bisher experimentell erarbeiteten Synthesen miteinander zu verbinden.

Deshalb wurde in diese Forschungsarbeit die Oberflächen-Translation integriert. Die Experimente zur Translation wurden an die der OnChip-Transkription angelehnt. Auch hier wurde ausschließlich mit der EGFP-Sequenz (T7TermEGFP) gearbeitet. Die Detektion erfolgte nicht mit einer Signalverstärkung, wie bei einer RT-PCR üblich, sondern die Proben wurden direkt mittels Immunoblot analysiert. Aufgrund von ersten erfolglosen Experimenten wurde die Synthesezeit bis auf maximal 18 Stunden verlängert. Auch hier konnte kein Protein nachgewiesen werden.

Da Proteine eine natürlich hohe Affinität zu Glasoberflächen besitzen, wurde versucht, durch Blocken der Oberfläche nach Diehl diese unspezifische Bindung zu unterdrücken. Auch diese Experimente blieben erfolglos.

Aus den Ergebnissen der Kopplungseffizienz wurde die Tropfenanzahl eines Reaktionsbereiches auf 15 bis 20 erhöht. Es wurden auf aminosilanisierte Schott-Objektträger Cy5-markierte T7TermEGFP-PCR-Produkte (75 ng/μl) getropft und nach der Kopplung sowie dem Waschen die Kopplungseffizienz ermittelt.

Aus der Analyse ergab sich für diese Objektträger ein Intensitätswert von 49.108,3 (± 57.41,3). Daraus ergibt sich unter Zuhilfenahme der Kalibrierkurve (Abb. 37) eine DNA-Konzentration von 60 ng/μl sowie eine DNA-Menge pro Tropfen von 30 ng. Im Vergleich mit den Genetix- Objektträgern liegt die Kopplungseffizienz um das 1,5fache höher.

Da der Tropfenumfang ($d = 1,3 - 1,5$ mm) nur unwesentlich kleiner als bei den Genetix-Objektträgern ausfiel, kann eine höhere Qualität der Oberfläche ein Kriterium für die verbesserte Kopplungseffizienz sein. Mit 15 Tropfen (0,5 μl) pro Reaktionsbereich kann so eine gekoppelte DNA-Menge von 450 ng berechnet werden. Parallel dazu wurde das PCR-Produkt mit dem sciFLEXARRAYER in einem 25 x 25 Array auf Schott-Objektträger transferiert, wobei jeder Tropfen 25 x auf die gleiche Position gesetzt wurde. In Tabelle 6 sind die Parameter des maschinellen Betropfens dem Tropfen per Hand gegenübergestellt. Anhand der Fläche lässt sich so die gekoppelte DNA-Menge beider Vorgänge berechnen. Da die betropfte Fläche bei beiden Vorgängen fast gleich groß ist, ergibt sich daraus auch eine annähernd gleiche immobilisierte DNA-Menge von 424 ng. Für einen experimentellen Durchbruch in der OnChip-Translation wurde neben der Vergrößerung der Kopplungsfläche die Durchmischung als erfolgsversprechender Parameter in die Durchführung mit aufgenommen.

Tab. 6: Vergleich der Oberflächen-Kopplung zwischen maschinell und hand-getropftem T7TermEGFP-PCR-Produkt.

	maschinell	hand
getropfte Konzentration	75 ng/μl	75 ng/μl
Tropfenzahl pro Position	25	1
Tropfenvolumen	0,5 nl	500 nl
Gesamtvolumen pro Position	12,5 nl	500 nl
Array-Tropfenanzahl	625	15
Tropfendurchmesser pro Position	0,3 mm	2 mm
Tropfenfläche pro Position	0,071 mm ²	3,14 mm ²
betropfte Gesamtfläche	44,4 mm ²	47,1 mm ²
kalkulierte, gekoppelte DNA-Menge (gesamt)	424 ng	450 ng

Hierfür wurde die Ultraschall-Durchmischung mit dem SlideBooster von Advantix ausgewählt. Die Objektträger mit den immobilisierten DNA-Strängen und den pipettierten Lysaten mit den zugefügten Komponenten (T7-RNAP, rNTPs, Methionin, acetyliertes BSA) wurden in die Hybridisierungskammern platziert und über die örtlich wechselnde Einkopplung eines Ultraschallpulses (Durchmischungsfrequenz 3:7) die Durchmischung eingeleitet.

Nach der Synthese wurden die Proben eingeeengt und komplett auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen. Nach der Auftrennung wurden die Proteine auf eine NC-Folie transferiert und das EGFP über einen spezifischen Antikörper detektiert (Abb. 45). Bei beiden

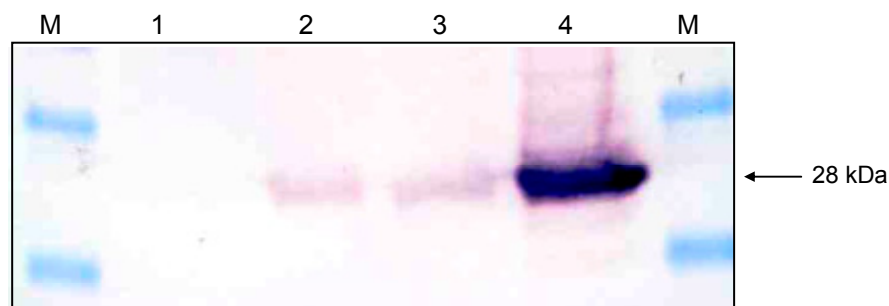


Abb. 45: Immunoblot zum Nachweis von Oberflächen-translatiertem EGFP. Auf Schott-Objektträger wurde 585 ng T7TermEGFP-PCR-Produkt maschinell (2) oder per hand (3) getropft. Parallel dazu wurden Kontroll-Objektträger ohne DNA (1) bzw. 370 ng nicht-immobilisiertes PCR-Produkt (4) mitgeführt. Die Synthese erfolgte mit Ultraschall-Durchmischung (Ratio 3:7 Mischungsstärke 14). Die Proben wurden anschließend mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Proteine auf eine NC-Folie transferiert. Der EGFP-Nachweis erfolgte mit einem monoklonalen IgG_{2a} GFP-Maus-Antikörper (1:1.000) und einem Alkalische Phosphatase konjugierten Kaninchen-Anti-IgGMaus-Antikörper (1:2.500). M) Page Ruler™ Prestained Protein Ladder.

immobilisierten Proben ist das Bandensignal gleich stark, was auf eine vergleichbare Syntheserate schließen lässt (2, 3). Als Kontrolle wurde eine Translationsreaktion in einem aufgeklebten Rahmen, in der das PCR-Produkt frei löslich vorlag, mitgeführt (4). Dieses wesentlich stärkere Signal basiert auf einer effizienteren EGFP-Translation, die womöglich auf die bessere Zugänglichkeit der frei löslichen Matrize zurückzuführen ist, und auf der 1,4fach höheren Gesamt-DNA-Menge. Mit diesem Experiment ließen sich nach der Translation mit Oberflächen-gebundenen PCR-Produkten Signale im Immunoblot nachweisen.

4.4.2.2 Reproduktion

Zur Wiederholung der Translation, wurde der maschinell betroffene Objektträger erneut in einer Reaktion eingesetzt (Abb. 46). Unter denselben Versuchsbedingungen wurde abermals ein EGFP-Signal im Immunoblot detektiert (2). Die Kontrolle mit ungebundenem PCR-Produkt zeigt ein deutlich stärkeres Signal (3). Leider kann kein direkter Vergleich zwischen der ersten und zweiten Translation getroffen werden. Auffällig war aber, dass die Detektion erst mit einer längeren Inkubation der Substratlösung gelang. Dafür könnte eine geringere Ausbeute an Protein verantwortlich sein.

Parallel zu der OnChip-Translation wurde mit maschinell betroffenen Objektträgern eine Oberflächen-Transkription durchgeführt, bei der die Reaktionslösung auch mittels Ultraschall durchmischt wurde. In der Abbildung 47 ist das Ergebnis der RT-PCR dargestellt. Auch hier konnte EGFP-RNA auf der Oberfläche synthetisiert werden (1b). Die Transkription war auch

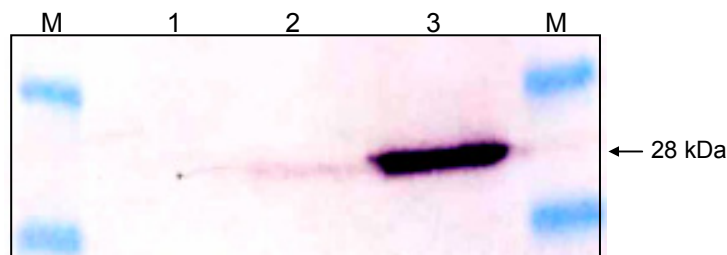


Abb. 46: Immunoblot zum Nachweis der zweiten Oberflächen-Translation von EGFP mit einem Array (2). Unter den gleichen Versuchsbedingungen wurde eine Translationsreaktion mit Ultraschall-Durchmischung. Für einen guten Vergleich mit der ersten Translation wurde wieder nicht-immobilisiertes PCR-Produkt (370 ng) in einer Reaktion eingesetzt, welche in einen aufgeklebten Rahmen pipettiert wurde (3). Ebenso wurde mit der Kontrolle ohne DNA verfahren (1). Die Auswertung des Experimentes erfolgte wie die erste Translation.

M) Page Ruler™ Prestained Protein Ladder.

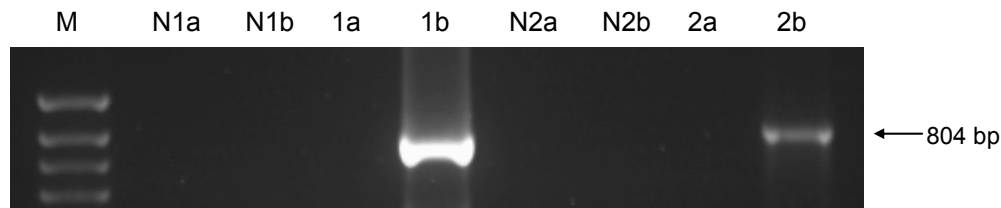


Abb. 47: RT-PCR der OnChip-Transkription mit einer Wiederholung. Das T7TermEGFP-PCR-Produkt wurde maschinell auf Schott-Objektträger getropft und diese in eine Oberflächen-Transkription mit Ultraschall-Durchmischung eingesetzt. Als Kontrolle wurde ein Objektträger ohne DNA mitgeführt (N). Nach der ersten Transkription (1) wurden die Objektträger gewaschen und in einer neuen Reaktion verwendet (2). Neben den cDNA-Proben (b) wurden auch die RNA-Proben in der PCR eingesetzt (a) M) Hyperladder IV.

in der zweiten Reaktion erfolgreich (2b), allerdings mit einer geringeren Ausbeute an RNA. Bei einer mehrfachen Verwendung einer Oberflächen-gebundenen Matrice kann sowohl bei der Transkription wie auch bei der Translation eine verminderte Syntheserate verzeichnet werden.

4.4.2.3 Modifikation

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, welche Zusammensetzung der zugefügten Komponenten für die verminderte Translationsleistung verantwortlich ist. In einer *in vitro* Translationsreaktion mit dem Qiagen EasyXpress-Kit wurde festgestellt, dass die Zugabe von T7-RNAP und rNTPs auf die Translation inhibitorisch wirkt. Das acetylierte BSA sowie das Methionin hatten keine positive oder negative Wirkung auf die Translation (Abbildung nicht gezeigt). Für eine Oberflächen-Reaktion muss dies aber nicht ausschlaggebend sein. Deshalb wurde in einer Oberflächen-Translation dieses Experiment wiederholt. Zusätzlich wurde untersucht, ob eine Temperatursenkung auf 30°C die Ausbeute an Protein steigert. Auch der Einsatz der Ultraschall-Durchmischung wurde in die Untersuchung miteinbezogen. Hierfür wurden 20 Tropfen (0,3 µl) des T7TermEGFP-PCR-Produktes (78 ng/µl) auf Schott-Objektträger pipettiert. Daraus ergab sich damit eine gekoppelte DNA-Menge von 340 ng. Die Abbildung 48 zeigt das Ergebnis der OnChip-Translation. Bei allen Oberflächen-Translationen sind Banden, wenn auch teilweise sehr schwach, im Immunoblot sichtbar. Die Positivkontrolle (P) repräsentiert die Synthese von ungebundenem PCR-Produkt ohne Ultraschall-Durchmischung bei 37°C Reaktionstemperatur. Da hier 470 ng eingesetzt wurden, fällt auch die Ausbeute an Protein entsprechend höher aus. Die Proben, die mit Ultraschall durchgemischt wurden (U), zeigen gegenüber den ruhenden Proben keine erhöhte Translationsleistung. Da aber die Banden allgemein sehr schwach sind, kann hier keine



Abb. 48: Immunoblot der OnChip-Translation unter verschiedenen Versuchsbedingungen. Es wurde das T7TermEGFP-PCR-Produkt (78 ng/ μ l) in 20 Tropfen a 0,3 μ l auf Schott-Objektträger pipettiert. Die Kontroll-Reaktionen erfolgten ohne (N) und mit PCR-Produkt (P). Einige Proben wurde mittels Ultraschall durchmischt U. Ebenso wurde die Reaktionstemperatur zwischen 30°C (a) und 37°C (b, c). Zu den Proben wurden entweder BSA und Methionin (1) oder zu diesen noch die T7-RNAP und rNTPs (2) pipettiert. Die Proben wurden in einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine NC-Folie transferiert. Das EGFP wurde über einen monoklonalen IgG_{2a} GFP-Maus-Antikörper (1:1.000) und einem Alkalische Phosphatase konjugierten Kaninchen-Anti-IgGMaus-Antikörper (1:2.500) detektiert. M) Page Ruler™ Prestained Protein Ladder.

absolute Aussage getroffen werden. Einzig die Probe U1a, bei der nur BSA und Methionin (1) zusätzlich zugegeben wurde, zeigt im Vergleich zur Probe U2a (2 = alle Komponenten) ein signifikantes Signal. Somit konnte das Experiment in Lösung bestätigt werden. Die Zugabe von T7-RNAP und Ribonukleotiden hemmt auch die Translation auf der Oberfläche. Viel wichtiger ist aber der Einfluss der Reaktionstemperatur auf die Translation von EGFP. Dies zeigt auch die Probe U1a. Bei 30°C (a) erhöht sich die Löslichkeit des Proteins, welches sich somit leichter detektieren lässt. Da die Translation ohne weitere Komponenten genauso effektiv ist, kann nur durch die Senkung der Temperatur ein besseres Ergebnis bei der EGFP-Ausbeute erzielt werden. Einzig der Einfluss der Ultraschall-Durchmischung bleibt bei diesem Versuch ungeklärt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Translation mit Oberflächen-gebundenen PCR-Produkten zu nachweisbaren Mengen an Protein führt, wobei eine Senkung der Reaktionstemperatur eine Verbesserung in der Ausbeute des EGFPs bewirkt. Die *E. coli* Lysate und deren Reaktionskomponenten konnten nicht weiter optimiert werden. Ob die Durchmischung mit Ultraschall die Translationsreaktion unterstützt, konnte nicht ausreichend geklärt werden.

5. Diskussion

5.1 Konstruktion der linearen Transkriptionsmatrizen

Für die Experimente der Oberflächentranskription wurden drei verschiedene Gene ausgewählt, wobei der größte Teil der Arbeit mit dem EGFP absolviert wurde (4.1.1). Die Gensequenz des EGFPs wurde bereits in der Arbeit von Andreadis und Chrisey (2000) als Bead-immobilisiertes Reportergen in einer Transkriptionsreaktion eingesetzt und in anderen Arbeiten als *in vitro* Translationsprodukt synthetisiert (Martin *et al.*, 2001; Sahly *et al.*, 2003; Hwang *et al.*, 2005). Als DNA-Quelle stand das Plasmid pEGFP zur Verfügung, wobei die Expression des GFPs der Kontrolle des lac-Operons unterliegt. Die *in vitro* Transkriptionsreaktionen, die auf diesem System beruhen, sind abhängig von der negativen Kontrolle des lac-Repressorproteins und der positiven Kontrolle des Genaktivatorproteins CAP (zyklisches Monophosphat Bindeprotein) und sind damit sehr sensibel gegenüber diesen Regulatoren (Eron & Block, 1971; Majors, 1975). Die meisten kommerziellen Transkriptions- und Translationssysteme basieren deshalb auf viralen Promotoren wie SP6, T3 und T7, da bei diesen die Transkription nicht von regulatorischen Ko-Faktoren abhängig ist.

Das humane FY-Gen und das murine Myogenin-Gen wurden aufgrund ihrer Sequenzlänge und des zur Verfügung stehenden Materials in unserem Institut ausgewählt. Aufgrund seines intronlosen Vorkommens, ist das humane FY-Gen leicht aus genomischer DNA zu amplifizieren. Mit der Klonierung und Transfektion der gespleißten Form konnte das rekombinante DARC-Protein in Tumorzellen exprimiert und als intaktes Membranprotein in diesen nachgewiesen werden (Addison *et al.*, 2004). Das Myogenin ist als Transkriptionsfaktor in der Muskelzelllinie C2C12 aktiv und wurde als mRNA-Transkript aus diesen Zellen extrahiert. Die Gensequenz wurde über die cDNA-Synthese mit einer anschließenden spezifischen PCR isoliert. Im Gegensatz zum DARC-Protein wurde das Myogenin mit Hilfe des T7-Expressionssystem bereits erfolgreich in *E. coli* exprimiert (Maleki & Hurlburt, 1997).

Die *in vitro* Transkription von klonierten cDNA-Sequenzen wurde als erstes mit dem SP6 Promotor etabliert (Krieg & Melton, 1984) und später für andere virale Promotoren angepasst. Hiermit wurde die Grundlage zur Herstellung funktioneller mRNA geschaffen, die außerhalb von lebenden Zellen verwirklicht werden konnte. Die heutigen *in vitro* Transkriptionssysteme sind aus dieser Arbeit hervorgegangen.

Der T7-Promotor ist wie der SP6-Promotor ein starker viraler Promotor, dessen Stärke auch auf optimalen Reaktionsbedingungen wie Ionenstärke, Temperatur und Stabilität der DNA-Helix beruht (McAllister & Carter, 1980). Die kommerziellen Expressionsvektoren sind mit diesen starken Promotoren ausgestattet, um rekombinante Proteine in *E. coli* zu exprimieren.

Deshalb wurde für diese Arbeit der Expressionsvektor pET-3a ausgesucht, um die optimalen Voraussetzungen für eine Oberflächen-Transkription zu gewährleisten. Die drei Gensequenzen wurden in den pET-3a Vektor kloniert, mit der Besonderheit, dass die Klonierung über eine Anpassung an die vorhandenen Schnittstellen erfolgte (4.1.1). Die gerichtete Klonierung der Sequenzen war dabei nur über die Schnittstellen XbaI und BamHI möglich, wobei die Restriktion auch die Entfernung der RBS zur Folge hatte. Deshalb wurde die RBS-Sequenz über die genspezifischen Primer angefügt. Im gleichen Verfahren wurden an die Gensequenzen eine 15 nt lange Polythymidinsequenz angehängt, die später bei der Umschreibung der RNA-Transkripte als Bindesequenz für den Oligo-dT-Primer diente. Dies schafft für alle drei Transkripte gleiche Voraussetzungen, da hier die Verwendung von Randomprimern oder unterschiedlich bevorzugten sequenzspezifischen Primern für einen Vergleich der linearen Amplifikationsausbeuten hinderlich wären.

Mit der Fertigstellung der rekombinanten Expressionsplasmide wurden auch die Matrizen zur Amplifikation der modifizierten PCR-Produkte geschaffen. Vorher wurde mit der Proteinexpression in BL21 Zellen überprüft, in wie weit die Plasmide als Expressionsmatrizen geeignet sind (4.2.2.1). Die Immunoblotanalysen zeigten, dass die Expression von EGFP und Myogenin erfolgreich war. Hingegen wurde das DARC-Protein mit einem geringeren Molekulargewicht als 36 kDa exprimiert. Es ist bekannt, dass das DARC-Protein in kotranslationalen Prozessen an dem N-terminalen Asparaginrest 16 glykosyliert wird. Zusätzlich wird es wie andere Membranproteine im Golgi-Apparat posttranslational remoduliert (Hadley & Peiper, 1997). Diese Glykosylierungen sind für die Struktur und Funktion des Proteins essentiell (Tornamille *et al.*, 2003). Bei der prokaryotischen Expression fehlen solch posttranslationale Modifikationen, so dass das Gesamtmolekulargewicht des Proteins geringer ausfällt. In Studien zur Untersuchung der Proteingröße und Struktur konnte ein Anteil am Gesamtgewicht von 5-7 kDa für die vorhandenen Oligosaccharide festgestellt werden (Wasniowska *et al.*, 1993). Das geringere Gewicht, das mit weniger als 20 kDa deutlich vom extrahierten Protein abweicht, ist auf eine Basensubstitution in der FY-Gensequenz zurückzuführen. Die Klonierung des FY-Gens wurde über die PCR-Amplifikation aus genomischer DNA realisiert, wobei eine Taq-Polymerase ohne 3' - 5'-Exonukleaseaktivität eingesetzt wurde. Besitzt die Taq-Polymerase diese 3' - 5'-Exonukleaseaktivität nicht, erhöht sich der Einbau falscher dNTPs (Tindall & Kunkel, 1988).

Die Sequenzierung der FY-Gensequenz ergab, dass ein fehlendes Guanin an der Position 521 des offenen Leserahmens zu einer Verschiebung zugunsten eines TGA-Stoppkodons führte. Von den drei Stoppkodons TGA, TAA und TAG wird nur das TAG-Triplett nicht vom bakteriellen Expressionssystem als Terminationssignal erkannt, so dass die Synthese des DARC-Proteins nach der 181. AS stoppte. Anhand der Länge der AS-Kette und den

speziellen Aminosäuren errechnet sich eine Molekularmasse von 19.157 Da. Dies entspricht auch der Größe des bakteriell exprimierten DARC-Peptids, das über das in der AS-Kette vorhandene Fy6-Antigen im Immoblot detektiert werden konnte. Die Transkription aber ist durch die Basensubstitution in der FY-Gensequenz nicht betroffen. Für die vollständige Expression des DARC-Proteins sollte die Klonierung des FY-Gens mit einer Taq-Polymerase, die eine Exonukleaseaktivität besitzt, wiederholt werden. Für die Entwicklung des Oberflächen-Transkriptionssystems steht die Größe des Proteins im Hintergrund.

Das Ziel, lineare Nucleinsäuren an Oberflächen zu binden, wird häufig über endständige Modifikationen erreicht. Die Kopplung kann dabei kovalent oder affin erfolgen. Bei der affinen Kopplung wird die hohe Bindungskonstante von Biotin und Avidin bzw. deren Derivaten genutzt. Avidin als Glykoprotein und das rekombinante nichtglykosilierte Streptavidin und Neutravidin besitzen jeweils vier Bindungsstellen für das Biotin (Green *et al.* 1975). Beschichtet man Oberflächen mit diesen Proteinen, können biotinmarkierte Makromoleküle auf diesen immobilisiert werden. Anders verhält es sich bei der kovalenten Kopplung, bei der Modifikationen wie Aminolinker oder Phosphat eine irreversible Bindung mit den Oberflächen eingehen. Dazu wird entweder die Aminogruppe eines Oligomers selbst über ein Silan zu einem sehr reaktiven DNA/RNA-Silylharnstoff umgesetzt, der mit den Hydroxylgruppen der Glasoberfläche reagiert oder aber die Phosphatgruppe am Oligomer kann mit den Aminogruppen der silanisierten Oberfläche zu einem stabilen Phosphoamid reagieren (Kumar *et al.*, 2000, Livnah *et al.*, 1982). In allen Fällen jedoch wird die Markierung über eine chemische Synthese an das Oligomer bzw. den Primer gekoppelt, der wiederum in einer Amplifikationsreaktion in das generierte PCR-Produkt eingebaut wird.

Die Amplifikation eines EGFP-PCR-Produktes mit verschiedenen modifizierten Primern zeigte, dass die Biotin- und Phosphatmarkierung zu ähnlichen Ausbeuten an PCR-Produkten führte (4.2.1). Allein die aminofunktionale Modifikation des Primers scheint einen negativen Einfluss auf die Amplifikationsreaktion auszuüben. Möglicherweise interagiert die positiv geladene Aminogruppe mit der negativ geladenen DNA. So wurde ein stabilisierender Effekt eines Aminolinkers auf die Schmelztemperatur von DNA beschrieben (Sandbrink *et al.*, 2005). Im hier beschriebenen Fall führte aber die Erhöhung der Temperatur während der Anlagerung des Primers an die Matrize zu keiner Verbesserung der PCR-Produktausbeute.

Die kovalente Kopplung besitzt gegenüber der affinen den Vorteil, dass die Immobilisierung unter RNasefreien Bedingungen schnell und günstig durchzuführen ist. Trotz all dem erfolgten die meisten Experimente in den Veröffentlichungen zur Festphasen-Transkription mit der affinen Kopplung. Daher wurde in dieser Arbeit die Oberflächentranskription über eine kovalente Kopplungsmethode realisiert. Neben der Kopplung wurde auch eine immobilisationsoptimierte Transkriptionsmatrize angestrebt, wofür in einer zweiten

Amplifikationsreaktion ein Primer mit einer 20 nt langen überhängenden Sequenz als Spacer an das PCR-Produkt angefügt wurde (4.2.1). Die Spacersequenz sorgt nicht nur für eine größere räumliche Trennung der benachbarten Nukleinsäuren, sondern kann auch die Interaktion mit einer Ziel-DNA in Hybridisierungsreaktionen positiv unterstützen (Southern *et al.*, 1999). Dies ist für die Bindung des Enzyms an die DNA-Sequenz ebenfalls denkbar.

Der gewonnene Abstand der DNA-Bindedomäne des Promotors zur Oberfläche wird bei den T7Term-PCR-Produkten über eine Amplifikation beginnend 28 bp vor der Promotorsequenz auf dem pET-3a gewährleistet. Zur Überprüfung wurden die T7Term-PCR-Produkte von DFY, EGFP und Myogenin in einer *in vitro* Translationsreaktion eingesetzt, die das gleiche Ergebnis wie die BI21-Expression lieferte, da die PCR-Produkte aus den Expressionsplasmiden generiert wurden (4.2.2.2).

5.2 Konstruktion der zirkulären Transkriptionsmatrizen (Stammschleifen-Plasmid)

Der Ansatz zur Kopplung eines Plasmids an eine Oberfläche kann über mehrere Methoden erfolgen. So z.B. mit Hilfe von PNA-Klammern, wo zwei PNA-Stränge über einen Linker verknüpft als Einzelmolekül (bis-PNA) an einen DNA-Strang binden. Hierdurch war es möglich, ein relaxiertes Plasmid an streptavidinbeschichteten Beads zu koppeln, welches später für eine *in vitro* Transkription als Matrize diente (Bentin & Nielsen, 2003). Da aber PNA-Klammern sehr kostenintensiv herzustellen sind und die Stabilität der Plasmidbindung stark abhängig von der Vielzahl von PNA-Bindungsstellen im Plasmid ist (Lundin *et al.*, 2004), müssen Alternativen gesucht werden. Dabei kann die Anlagerung von DNA-bindenden Proteinen von Vorteil sein. Mit der Bindung des fluoreszenzmarkierten synthetischen Zinkfingermotivs SP1 an eine immobilisierte DNA-Sequenz wurde dieses Verfahren bereits erfolgreich getestet (von Nickisch-Roseneck *et al.*, 2005b). Der Nachteil solcher Protein/DNA-Bindungen liegt in der kostenintensiven Synthese solcher Peptide, wobei zur Erhöhung der Bindungskonstante mehrere Zinkfinger motive hintereinander geschaltet werden müssen. Die rekombinante Expression solcher Fusionspeptide ist jedoch sehr aufwendig, da die Vielfalt der DNA-Motive über Peptidbanken bereitgestellt werden muss (Bae *et al.*, 2003). Diese Probleme können mit der Hybridisierung zweier komplementärer DNA-Sequenzen umgangen werden. Dafür ist es notwendig, dass die Plasmide eine dauerhaft zugängliche DNA-Struktur ausbilden, um die Bindung an eine Sonde zu ermöglichen. Hierfür können beliebig viele Sequenzen in ein solches Plasmid kloniert werden, die über die Vielzahl an möglichen Basenkombinationen eine große Varianz bieten.

Mit der mehrstufigen Klonierung der Stammschleifen-Sequenzen in den rekombinanten pET-EGFP Vektor wurde die Grundlage zur Ausprägung solcher Strukturen geschaffen (4.1.2). Das Zwischenprodukt pX-DL Plasmid trägt zwei verschiedene Stammschleifen-Sequenzen, wobei die eine als Zielsequenz an die immobilisierte Sonde hybridisiert, während die andere als Zielsequenz für eine farbstoffmarkierte Sonde fungiert. Die Ausprägung solcher Stammschleifen-Strukturen kann aber nur im einzelsträngigen Zustand erreicht werden, wofür in das Doppel-Stammschleifen-Plasmid eine Nickaseschnittstelle kloniert wurde.

Die strang- und sequenzspezifischen Nickasen N.BbvC IA sowie IB sind die beiden separierten Untereinheiten der Restriktionsendonuklease B.bvC I aus *Bacillus brevis* (Heiter *et al.*, 2005). Mit diesen Enzymen wurde z.B. untersucht, ob Einzelstrangbrüche die Verpackung viraler DNA behindern (Moll & Guo, 2005). Für die weitere Nutzung eines genickten Plasmids war es wichtig, dieses von den anderen Zustandsformen zu unterscheiden. Da die relaxierte Form eines Plasmids eine geringere Gelmobilität aufweist als die linearisierte oder supercoiled Form (Mikhailov *et al.*, 2004), konnte anhand der Agarosegelelektrophorese eindeutig gezeigt werden, dass die Nickasen in der Lage waren, das Plasmid zu relaxieren (4.3.2). Das Prinzip des Einzelstrangbruchs wurde bereits bei Hybridisierungsversuchen von Ziel-DNA mit *molecular beacons* eingesetzt. Hierbei wird nach der Hybridisierung an die Ziel-DNA mit Hilfe einer Nickase ein Einzelstrangbruch induziert, wonach die beiden nur wenige Nukleotide kurzen Sonden-Fragmente von der Ziel-DNA dissoziieren. Bei dieser Technik bleibt die Ziel-DNA intakt und die nur wenigen nt langen Fragmente können nicht mehr miteinander hybridisieren, womit ein Auslöschen der Fluoreszenz verhindert wird (Zheleznaya *et al.*, 2001).

Die Ausbildung der gewünschten Stammschleifen-Strukturen ist nur dann dauerhaft möglich, wenn der geöffnete Strang vom Ring getrennt wird. Das geschlossene Plasmid kann aufgrund seiner Verdrillung nicht denaturiert werden, während die beiden linearisierten Plasmidstränge nach ihrer Hybridisierung nur sehr ineffizient zirkularisiert werden können, wie beschrieben mit dem ringförmigen Chromosom des λ -Phagen (Reuben & Skalka, 1976). Der Vorteil eines Exonukleaseverdau liegt in der degradativen Entfernung des geöffneten Stranges. Die hier verwendete Nuklease ist die T7-Exonuklease, deren Sequenz vom Gen 6 des Bakteriophagen T7 kodiert wird und die zur Degradation der Wirts-DNA dient (Kerr & Sadowski, 1971). Mit diesem Enzym konnte die Hydrolyse des geöffneten Stranges erfolgreich durchgeführt werden (4.3.2). Hierbei war es wichtig zu zeigen, dass relaxierte Strukturen als Substrate für die T7-Exonuklease dienen können. Leider konnte nicht festgestellt werden, ob der geöffnete Strang komplett verdaut wurde. In einer Arbeit mit *DNA dumbbells*, kleinen hantelförmigen DNA-Strukturen mit zwei sich gegenüberliegenden Schleifen, wurde die Aktivität der T7-Exonuklease an Einzelstrangbrüchen getestet. Das Enzym war in der Lage, die genickten DNA-Strukturen am freien 3'-OH-Ende bis zu den Schleifenregionen

hin zu verdauen (Kuhn *et al.*, 2001). Diese Enzymeigenschaft ist für den vollständigen Verdau des Stammschleifen-Stranges von Nachteil, weshalb ein nachfolgender Temperaturschritt die Trennung vom Ring komplettieren sollte. Eine andere Arbeitsgruppe nutzte sogar die Kombination von Nickase und Exonuklease zur Generierung von *sticky ends* mit variablen Längen (Xin *et al.*, 2003).

Eine Alternative zu der herkömmlichen Gelelektrophorese ist die Alkaline Agarosegelelektrophorese, bei der die DNA durch einen pH-Wert von 12 denaturiert im Gel wandert. Aufgrund der langsameren Migration der ringförmigen ssDNA gegenüber der linearen ssDNA können diese zwei Formen diskriminiert und voneinander separiert werden (Kirkegaard & Wang, 1978).

Damit ein Plasmidhybrid aus Stammschleifen-Ring und komplementärem, ursprünglichem Ring generiert werden kann, wurde das Enzym Topoisomerase I verwendet. Die Topoisomerase I aus *E. coli* entspannt negativ spiralisierte DNA im Gegensatz zur Gyrase, die sie wieder spiralisiert. Die meisten ringförmigen DNA-Moleküle liegen wahrscheinlich als negative Superhelix vor, was vermutlich für die Bindung von regulatorischen Proteinen essentiell ist (Watson *et al.*, 1993). Ebenso ist dieses Enzym in der Lage, Einzelstrangringe wieder zu einem Plasmid zu verknüpfen (Kirkegaard & Wang, 1978). Außerdem wird es zum Verknoten von zirkulärer DNA zu Catenanen bzw. deren Entknoten eingesetzt (Tse & Wang, 1980).

Es konnte aber durch die Transformationsanalyse kein neukonstruiertes Plasmid nachgewiesen werden (4.3.4). Sollte das Enzym tatsächlich die beiden Ringe miteinander verknüpfen, dann sind diese Plasmide sicherlich transformationsfähig, denn ligierte Plasmide können direkt in Bakterien eingeschleust werden und müssen dazu nicht *in vitro* spiralisiert werden. Die Verknüpfung zweier Einzelstrangringe war mit der Erzeugung UV-induzierter Photodimere erfolgreich, bei der eine Endonuklease die lädierte DNA verdaute (Shavitt & Livneh, 1989). Die modifizierten Einzelstrangringe wurden in einer Re- und Denaturierungsprozedur mit linearisiertem Plasmid inkubiert und somit zu Plasmidhybriden zusammengefügt, die mit einem Ligationsmix bestehend aus DNA Polymerase II, DNA Ligase und DNA Gyrase vervollständigt, vervielfältigt und spiralisiert wurden. Dass eine Stammschleifen-Struktur nur dann dauerhaft ausgeprägt wird, wenn ausschließlich ein Strang des Plasmidhybrids diese Sequenz trägt, stellt die Bedingung an die Nutzung dieser DNA-Struktur als molekularbiologisches Werkzeug.

In den Vorversuchen mit einem kurzen Stammschleifen-Fragment gelang die Hybridisierung der Schleife an eine immobilisierte Sonde (4.3.1). Dies konnte auch auf das Einzelstrangplasmid übertragen werden (4.3.3). Bei einer Ligationsreaktion im Mikroarrayformat ergab der Vergleich zwischen einer Stammschleifen-Sonde und ihrem linearen Pendant keine signifikanten Unterschiede (Bordoni *et al.*, 2002). Der Vorteil einer

hybridisierten Transkriptionsmatrize wie z.B. eines Plasmids liegt in der Wiederverwendbarkeit der gekoppelten Sonden auf der Oberfläche. Diese stehen in keiner Abhängigkeit zur transkribierten Sequenz, anders als das bei der beständigen Kopplung von PCR-Produkten der Fall ist. Die Generierung eines doppelsträngigen Stammschleifen-Plasmids kann unabhängig von der Gensequenz erfolgen, so dass mehrere Plasmide an der Oberfläche gebunden und wieder abgelöst werden. Der Vorzug einer zirkulären Transkriptionsmatrize gegenüber einer linearen wurde in der Veröffentlichung eines Oberflächen-Translationsexperiments nicht genauer beschrieben (Ramachandran *et al.*, 2004).

5.3 Enzymatische Synthesen an modifizierten Oberflächen

Glasoberflächen bieten für die parallele Analyse von genetischen und funktionellen Informationen eine inerte, widerstandsfähige, planare Oberfläche mit Eigenschaften wie geringer Eigenfluoreszenz, Transparenz und der Möglichkeit unterschiedlicher chemischer Modifikationen (Holloway *et al.*, 2002). Für die Quantifizierung eines Mikroarrays ist eine planare Oberfläche essentiell, die nicht nur eine akkurate Bildwiedergabe sondern auch die Verwendung von geringen Reaktionsvolumina garantiert, was bei der Nutzung von Beads oder Mikrotiterplatten oft nicht gewährleistet ist (Sчена, 2003). Im Gegensatz zu Membranen oder Filtern werden für die Visualisierung fluoreszenzmarkierte Sonden verwendet, die eine genaue Diskriminierung zwischen starken und schwachen Signalen erlauben und die für eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den verwendeten Oberflächen sorgen (Holloway *et al.*, 2002). Mit ihnen kann aus 300.000 mRNA-Spezies ein mRNA-Molekül detektiert werden, was sonst nur mit radioaktivmarkierten und damit toxischen Sonden auf Nylonmembranen möglich ist (Bertucci *et al.*, 1999).

Für die Kopplung von PCR-Produkten werden die Glasoberflächen häufig mit einem Polymer, dem Poly-L-Lysin, oder einem Aminosilan aktiviert (Sचना *et al.*, 1995; Hegde *et al.*, 2000). Beide Oberflächen-Beschichtungen binden über ein monomeres Netz aus Aminogruppen die negativ geladene DNA elektrostatisch, wobei das Poly-L-Lysin aufgrund seiner einfachen Handhabung mit geringem Kostenaufwand gegenüber dem Aminosilan häufig bevorzugt wird. Die Vorteile einer Silanoberfläche gegenüber der Polymeroberfläche liegen zum einen in der Beständigkeit der Oberfläche mit einem geringen Hintergrund und zum anderen in der Möglichkeit, DNA über chemische Markierungen kovalent an der Oberfläche zu binden oder mit Hilfe von UV-Licht kreuz zu vernetzen (Benters *et al.*, 2002; Cheung *et al.*, 1999).

Bei der Behandlung der aminosilanisierten Glasoberfläche mit DEPC zur Dekontamination von RNasen nahm die Hydrophobizität der Oberfläche ab (4.4.1.1). Das DEPC wird zur

Inhibition von RNasen verwendet, da es kovalent an die Amine der Histidinseitenketten des aktiven Zentrums bindet (Williamson *et al.*, 1971). Damit ist die Behandlung von aminosilanisierten Oberflächen mit DEPC ungeeignet, da die Oberflächenamine angegriffen und alkyliert werden, so dass sie ihre Reaktivität verlieren. Anders verhält es sich bei der Dekontamination bei hohen Temperaturen unter Sauerstoffatmosphäre. Die Oberfläche behält ihre Hydrophobizität, trägt aber ebenfalls keine reaktiven Gruppen, da unter den verstärkten Reaktionsbedingungen der natürliche Vernetzungs- oder auch Alterungsprozess von Aminen zu Iminen deutlich schneller abläuft. Dieser Oxidationsprozess, der bei Temperaturen von über 120°C auftritt (Culler *et al.*, 1986), konnte durch das Einleiten von reaktionsträgem Stickstoff unterbunden werden.

Eine gerichtete Kopplung über eine endständige Modifikation begünstigt die freie Zugänglichkeit für biochemische Reaktionen z.B. für die Verlängerung des 3'-OH-Endes eines Primers in einer PCR (Adessi *et al.*, 2000). Mit der Carbodiimid-vermittelten Kopplungsreaktion wurden die EGFP-Transkriptionsmatrizen auf aminosilanisierten Objektträgern gekoppelt (4.4.1.1). Die nach der Transkriptionsreaktion gewonnene mRNA wurde in einer RT-PCR zuerst in cDNA umgeschrieben und anschließend mit EGFP-spezifischen Primern amplifiziert. Die Erfolge der Oberflächentranskription stellten sich erst mit einer verlängerten Kopplungsdauer ein. Ghosh und Musso beschrieben 1987 die Abhängigkeit der Kopplungseffizienz bzw. -dauer von der Länge des zu koppelnden Oligonukleotids, wonach 80% von 17 nt langen Nucleinsäuren erst nach 24 Stunden kovalent auf der Oberfläche immobilisiert waren. Dies bestätigten auch die Experimente mit der Kopplung des PCR-Produktes, die für eine zuverlässige Oberflächentranskription mindestens 72 Stunden durchgeführt wurde. Die kovalente Kopplung von Oligomeren ist sehr stabil und kann auch dem Einfluss hoher Temperaturen (bis 95°C) standhalten. In Hybridisierungsexperimenten konnten die gekoppelten Nucleinsäuren bis zu 60 mal hintereinander regeneriert werden, ohne einen signifikanten Verlust an Hybridisierungssignalen (Kleinjung *et al.*, 1997). Außerdem kann davon ausgegangen werden, dass die Hybridisierungseffizienz von adsorptiv gebundenen Sonden nur 10% im Vergleich zu aminogekoppelten beträgt (unveröffentlichte Ergebnisse, Kleinjung). Diese Regenerationsfähigkeit ist auch für die Transkriptionsexperimente von Vorteil, da nachgewiesen werden konnte, dass der Anteil an den EDC-gekoppelten DNA-Molekülen gegenüber der adsorptiven Kopplung ohne EDC sehr hoch ist.

Mit der längeren Reaktionsdauer der EDC-Kopplung wurde der entscheidende Durchbruch in der *in vitro* Transkription auf einer planaren Oberfläche erzielt. Die Transkription einer immobilisierten Matrize zur Oberfläche hin oder von ihr weg zeigte keine Unterschiede (4.4.1.2). Die Immobilisation der T7-RNAP *in vitro* hingegen bewirkt eine fünffach abgeschwächte Transkriptionsinitiation (Cook & Gove, 1992). Es scheint aber, dass die

Immobilisation von Polymerasen *in vivo* ein wichtiger Bestandteil der Replikations- und Transkriptionsmaschinerie ist, die vor allem in eukaryotischen Zellen für den Zusammenhalt von Matrize und Polymerase im Zellkern sorgt. Dabei rotiert die helikale DNA während der Bindung an die verankerte RNA-Polymerase um ihre eigene Längsachse, um dem wachsenden Torsionsstress entgegen zu wirken (Cook, 1994; Cook, 1999). Ein genauerer Einfluss der Kopplungsrichtung auf die Syntheserichtung konnte aber mit dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuchsaufbau nicht untersucht werden. So wäre z.B. die Echtzeitmessung mit der SPR-Technologie oder Faseroptischen Systemen eher geeignet, da hier die Anlagerung und Elongation direkt gemessen werden kann (Bier *et al.*, 1997). Diese Methodik könnte dann auch Aufschluss über eine mögliche sterische Rotationsbehinderung des gekoppelten kodogenen Stranges während der Transkription geben.

Die Möglichkeit, die Transkriptionsmatrizen direkt an der Oberfläche synthetisieren zu lassen, kann mit der Oberflächen-PCR realisiert werden. Besonders hier ist es wichtig, eine widerstandsfähige Oberfläche zu verwenden, die dem schnellen Wechsel von hohen zu niedrigen Temperaturen und umgekehrt standhält. Ebenso gilt dies auch für die Kopplungen. Die affine Kopplung an Avidin und Neutravidin ist für die Oberflächen-PCR eher ungeeignet. Allein die Streptavidinbeschichtung besitzt genügend Stabilität (Marschan, Dissertation 2005). Gleiches wurde auch bei der Festphasen-PCR an avidinbeschichteten Beads festgestellt (Andreadis & Chrisey, 2000). Mit der Verwendung von frei löslichen Primern kann die Amplifikationseffizienz erhöht werden, da somit die Initiation der Amplifikation unterstützt wird (Tillib *et al.*, 2001).

Die Hybridisierungskontrolle mit dem fluoreszenzmarkierten Rückwärtsprimer zeigte, dass das komplette EGFP-Gen synthetisiert wurde und keine unspezifische Amplifikation des Kontroll-Primers stattgefunden hat (4.4.1.3). Für die Amplifikation wurde cDNA als Matrize verwendet, mit der später eine Transkription an nicht-synthetisierter DNA ausgeschlossen werden konnte. Ebenso konnte nur mit den detektierten und immobilisierten PCR-Produkten eine erfolgreiche Transkription nachgewiesen werden. Die Amplifikation des EGFP-Gens auf der Oberfläche war aber nicht optimal, da die Hybridisierung des EGFP-Zwischenproduktes an die komplementäre Promotorsequenz des Kontroll-Primers, die Matrizen der EGFP-Amplifikationsreaktion möglicherweise entzogen hat. Das erklärt eventuell auch die geringe Kopplungseffizienz von $0,13 \text{ fmol/mm}^2$ (4.4.1.5). Eine amplifizierte PCR-Produktmenge von $0,019 \text{ fmol/mm}^2$ wurde bei anderen Festphasen-PCRs ermittelt, wobei hier allerdings der Vorwärts- und der Rückwärtsprimer immobilisiert vorlagen (Adessi *et al.*, 2000). Die so entstandenen Amplifikate hybridisierten miteinander und bildeten dabei DNA-Brücken aus, die so nicht mehr für eine neue Amplifikationsreaktion zur Verfügung standen.

Trotzdem war die Summe der immobilisierten PCR-Produkte für eine Transkription ausreichend. Somit wurde auch erneut bestätigt, dass eine Transkription an planaren Oberflächen möglich ist (4.4.1.3.1).

Die Ausbeuten an synthetisierten PCR-Produkten kann auch durch die Verwendung von 5'-Thiolmodifizierten Primern mit heterobifunktionalen Linkern verbessert werden (Adessi *et al.*, 2000). Mit GPS (3-Glycidoxypropyltrimethoxysilan) als einer anderen Silanschicht, die über Epoxygruppen aminierte DNA bindet (Zammatteo *et al.*, 2000), könnte die Oberflächen-PCR optimiert werden. Die Kombination aus Amino- und Epoxysilanoberflächen erhöht die Kopplungseffizienz von aminierten Oligonukleotiden und PCR-Produkten um das Doppelte gegenüber einer Beschichtung der Oberfläche mit den einzelnen Silanen (Chiu *et al.*, 2003). Zusätzlich könnten auch stringendere Reaktionsbedingungen die Kreuzhybridisierung an die Promotorsequenz der immobilisierten Primer verhindern, was die Grundlage für die Generierung von verschiedenen Transkriptionsmatrizen darstellen würde.

Die Technologie des maschinellen Tropfens ermöglicht die schnelle und präzise Anordnung von Kleinstvolumina auf definierten Oberflächenbereichen. Bei einigen Mikroarrayern werden die Flüssigkeiten mit Hilfe von Mikrokapillaren auf die Oberfläche gedruckt. Dabei kann es durch den direkten Kontakt von Kapillare und Oberfläche zu deren Beschädigung kommen (Brown *et al.*, 1998). Neben diesem Kontaktverfahren existieren weitere non-Kontaktverfahren wie die Piezo-Ink-Jet-Technik, bei der ein Piezokristall und ein Düsenkanal in der Mikrokapillare integriert sind. Über einen Spannungsimpuls dehnt sich der Kristall aus, wobei die im Pikolitermaßstab verdrängte Flüssigkeit durch die Kapillare nach außen gedrängt wird (Asain *et al.*, 1988). Bei allen Verfahren sollte eine Konzentration von 2 µg/µl an Oligonukleotiden nicht überschritten werden, da eine zu viskose Lösung leicht zum Verstopfen der Kapillaren führen kann (Cheung *et al.*, 1999). Das Tropfen von langen PCR-Produkten kann ebenfalls problematisch werden, da die DNA durch Scherkräfte Strangbrüche erleiden kann. Deshalb werden häufig PCR-Produkt-Konzentrationen von nicht mehr als 0,5 µg/µl getropft (Sчена *et al.*, 1996; Ying-Hao *et al.*, 2002). Die PCR-Produkte werden vor dem Tropfen aufgereinigt, um die störenden Reaktionskomponenten aus der Tropflösung zu entfernen. Der damit verbundene Verlust an DNA-Material kann mit dem Tropfen unaufgereinigter PCR-Produkte umgangen werden (Diehl *et al.*, 2002).

Bei dem Tropfen von Plasmiden muss die Anzahl der Moleküle noch deutlicher herabgesetzt werden, da sie oft Größen von 3 kb und mehr besitzen. So wurde eine GFP-Plasmidlösung in einer Konzentration von 0,04 µg/µl mit Hilfe eines Mikroarrayers auf Objektträger appliziert, die später von auf dem Objektträger wachsenden Zellen aufgenommen wurden (Ziauddin & Sabatini, 2001). Die Applikation der Plasmide und die Handhabung der betroffenen Oberflächen mussten somit unter sterilen Bedingungen ablaufen.

Die Möglichkeit, dass mit dem maschinellen Betropfen die Arbeiten mit Oberflächen auch RNAsefrei durchgeführt werden können, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden (4.4.1.4). Dabei wurden maximale PCR-Produkt-Konzentrationen von 0,15 µg/µl getropft, da die Viskosität der Lösung nicht nur von der DNA-Molekülanzahl, sondern auch von den in Lösung befindlichen Reaktionskomponenten abhängig ist. Besonders deutlich wird es bei dem Tropfen von silanisierten Nucleinsäuren. Die Silan-DNA-Lösung ist äußerst viskos und konnte somit nur mit einer Silicakapillare, die Volumina bis zu 1 µl applizieren kann, im Kontaktverfahren getropft werden, in dem Falle nur für Oligonukleotide (4.4.1.4.2). Allgemein können aktivierte Nucleinsäuren oder ausgefallene Nebenprodukte die Düsen oder Kapillaren der Arrayer unbrauchbar machen. Deshalb wurde eine Vielzahl von reaktiven Oberflächen entwickelt, auf die die inaktiven Nucleinsäuren in wässriger Lösung getropft und somit kovalent gekoppelt werden (Heise *et al.*, 2004).

Die Aminogruppen silanisierter Oberflächen werden in wässriger Lösung, so z.B. bei Hybridisierungs- oder Enzymreaktionen, deprotoniert. Die entstehenden Ammoniumionen können mit dem negativ geladenen Sauerstoffatom des DNA-Rückgrats in Wechselwirkung treten. Dies führt in Hybridisierungsexperimenten häufig zu unspezifischen Hintergrundsignalen, die aufgrund ihrer inhomogenen Verteilung die Auswertung der Daten erschweren. Mit verschiedenen Lösungen aus Magermilchpulver oder Serumalbuminen können die unspezifischen Bindungsstellen abgeblockt werden (Hedge *et al.*, 2000).

Bei der Passivierung der Oberfläche reagiert die Aminogruppe mit einem Kohlenstoffatom eines Anhydrid, so dass die nun von der Oberfläche abstehende Carboxylgruppe die negativ geladene DNA abstößt (Diehl *et al.*, 2001). Der Vergleich zwischen einer Passivierung und dem Blocken der Oberfläche mit BSA zeigte, dass die Hintergrundsignale des BSA-Blockens denen von ungeblockten Oberflächen entsprachen, während die Passivierung nur halb so hohe Hintergrundintensitäten lieferte (Taylor *et al.*, 2003). Ein positiver Effekt auf die Erhöhung der EGFP-RNA-Ausbeuten durch eine Passivierung vor der Oberflächen-Transkription konnte in dieser Arbeit nicht festgestellt werden (4.4.1.4.1).

Anhand von Studien zur Belegungsdichte von Oberflächen wurde für die Avidin-Biotinkopplung eines Oligomers ein Maximalwert von 11 fmol/mm² ermittelt (Kleinjung *et al.*, 1997). Damit wird deutlich, dass die Kopplung von Nucleinsäuren durch die möglichen Bindungsstellen auf der Oberfläche limitiert ist. Bei einer silanisierter Oberfläche liegt die maximale Belegungsdichte mit 16 fmol/mm² für ein Carbodiimid-gekoppeltes Oligomer höher als bei der affinen Kopplung (Heise, Dissertation 2004). Die Oberflächen geben für die optimale Kopplung von Nucleinsäuren den entscheidenden Ausschlag. So können schon zwischen einzelnen Objektträger-Chargen große Schwankungen in der Qualität der Oberflächen auftreten (Holloway *et al.*, 2002). Auch die Länge der DNA-Sequenz hat einen

großen Einfluss auf die Kopplungseffizienz, da es aufgrund von Abstoßungseffekten zwischen den einzelnen Molekülen zu einer sterischen Behinderung kommt. Ein ähnlicher Effekt wurde bei der Hybridisierung von 157 und 345 nt langen einzelsträngigen PCR-Produkten beobachtet, wobei die knapp 200 nt Unterschied mit einem Verlust an Hybridisierungseffizienz von 10% einherging (Guo *et al.*, 1994). Dies kann möglicherweise auch der Grund für die deutlich geringeren Kopplungsraten des phosphorylierten EGFP-PCR-Produktes sein, die mit minimal 1,6 und maximal 5,8 fmol/mm² unter der für Oligomere ermittelten Belegungsdichte lagen (...). Der entscheidende Parameter ist und bleibt aber die aminosilanisierte Oberfläche. Die während der experimentellen Durchführung verwendeten Objektträger-Chargen variierten stark in ihrer Kopplungsqualität. Mit PCR-Produkt-Konzentrationen von 40 bis 60 ng/µl konnte bei qualitativ hochwertigen Objektträgern eine maximale Kopplung erzielt werden. Bedarf es einer größeren Anzahl an Immobilisaten sollte anstatt einer Konzentrationserhöhung der Nukleinsäuren die betroffene Oberfläche vergrößert werden.

Für einen qualitativen Nachweis der Oberflächen-Transkription reichen, wie schon bei der Oberflächen-PCR, beschrieben 0,13 ng PCR-Produkt aus (4.4.1.5). Eine gute Reproduzierbarkeit wurde mit einer getropfte DNA-Menge von 3 ng erzielt, wobei hier wieder die hochwertige Oberfläche unabdingbar war (4.4.1.5) (Steffen *et al.*, 2005).

Ein interessanter Aspekt der Oberflächen-Transkription ist, dass durch die Immobilisierung der PCR-Produkte, diese von den generierten Transkripten nach der Reaktion separiert werden können. Normalerweise würde für die Detektion von *in vitro* transkribierten, geringen RNA-Mengen die RNA in einer RT-PCR vervielfältigt werden, wofür die Matrize über einen DNA-Verdau und einen Aufreinigungsschritt entfernt werden muss. Dies kann mit der Immobilisation umgangen werden. Weit wichtiger ist aber, dass die Matrizen durch die Immobilisation erhalten bleiben und in weiteren Transkriptionsexperimenten verwendet werden können. So konnte mit 60 nt langen DNA-Sequenzen, die an komplementären Streptavidin/Biotin-gekoppelten Oligomeren hybridisierten, die Transkription über 15 mal reproduziert werden, wobei die Bead-gekoppelten Matrizen über einen Waschvorgang von dem vorherigen Reaktionskomponenten gereinigt wurden (Marbles & Davies, 1995). Die Wiederholungsraten mit kompletten Gensequenzen hingegen betragen nur 5-7mal (Andreadis & Chrisey, 2000). Vielleicht führen auch hier die auf die wesentlich längeren DNA-Moleküle einwirkenden Scherkräfte zu einem „Abreißen“ der PCR-Produkte. Der Vorteil bei der Verwendung von Beads ist der Einfluss der Durchmischung z.B. durch Schütteln. Somit werden die Reaktionspartner zwar zufällig aber aktiv zum Reaktionsort transportiert. Anders verhält es sich bei der Diffusion oder passiven Sedimentation zu einer planaren Oberfläche. Durch die Topologie der flachen Reaktionskammer herrschen hier Bedingungen

wie in einer schmalen Röhre, so dass positiv wirkende Verwirbelungen der Flüssigkeiten ausbleiben. Die Experimente zur Wiederverwendbarkeit zeigten, dass die Festphasen-Transkription an planaren Oberflächen mit einmalig immobilisierten PCR-Produkten möglich ist (4.4.1.6) (Steffen *et al.*, 2005). Die mit jeder Anwendung einhergehende Verminderung der RNA-Ausbeute kann auch hier wieder vom Ablösen der PCR-Produkte herrühren, da Simulationen ohne eine aktive Transkription zu einem ähnlichen Ergebnis führten. Die maximale Wiederholungsrate oder die Ursache für dieses Phänomen konnten nicht weiter verifiziert werden, da keine gleichwertige Objektträgerqualität mehr zur Verfügung stand.

Die Hybridisierung von RNA-Molekülen an immobilisierten Oligonukleotiden ist ein oft verwendetes Prinzip in der Arraytechnologie. Vor allem die lineare Amplifikation, bei der *low abundance* mRNA über eine Kombination aus Reverser Transkription und anschließender Transkription, wird zur Analyse eines unverfälschten Transkriptomstatus eingesetzt (Van Gelder *et al.*, 1990). Dabei wird die amplifizierte antisense RNA (aRNA) über den Einbau von radioaktiven, fluoreszierenden oder biotinylierten Ribonukleotiden markiert (Melton *et al.*, 1984; Richardson & Gumpert, 1983; Bijl *et al.*, 1994). Die sehr stabilen Carbocyanine bilden ein breites Spektrum der Fluoreszenzfarbstoffe, darunter werden häufig das Cy3 (Indocarbocyanin) und das Cy5 (Indodicarbocyanin) bei Genexpressionsanalysen verwendet (Mujamar *et al.*, 1989). Mit der Verknüpfung der Cyaninfluorophore über einen Linker kann die aus Zellen isolierte mRNA auch direkt markiert werden, da diese modifizierten Fluorophore mit den Guaninen der RNA eine stabile Verbindung eingehen (Gupta *et al.*, 2003).

Das Prinzip der EGFP-RNA-Markierung über den Einbau von Cy5-aminoallyl UTPs während der *in vitro* Transkription konnte anhand eines Hybridisierungsexperimentes gezeigt werden (4.2.3). Für ein optimales Ergebnis war es besonders wichtig, die markierte RNA von freien Cy5-UTPs zu separieren. Damit wird die Umsetzung in eine Oberflächen-Transkription mit markierten Ribonukleotiden kaum realisierbar, da die unspezifischen Hintergrundsignale eine Diskriminierung erschweren würde. Die Problematik lässt sich aber mit der Verwendung von mikrofluidischen Systemen umgehen. So konnte *in vitro* transkribierte und nach diesem Protokoll markierte RNA ohne Aufreinigungsschritte an spezifischen Sonden hybridisiert und mit einem Durchfluss-Biochip-Scanner detektiert werden (unveröffentlichte Ergebnisse, von Nickisch-Rosenegk). Dies war aber nur durch ein langsames und kontinuierliches Einleiten der Transkriptionslösung in den Reaktionsraum möglich, wobei über einen längeren Prozess die ungebundenen Fluorophore aus dem Reaktionsraum entfernt wurden. Mit Hilfe dieses Durchflussprinzips gelang die SNP-Analyse von 24 Genotypen, wobei die schnellere Dissoziation des DNA-Stranges mit Einzelbasenmutation gegenüber der DNA ohne Mutation als Unterscheidungskriterium herangezogen wurde (Schwonbeck *et al.*, 2004).

Der Aufbau eines mikrofluidischen Systems erlaubt also den Abtransport von überschüssigen Fluorophoren aus dem Hybridisierungsraum. Liegen die Transkriptionsmatrize sowie die spezifische DNA-Sonde nur wenige μm entfernt voneinander immobilisiert vor, kann die während der Oberflächen-Transkription entstehende RNA am gleichen Ort an die Sonde gebunden werden. Aufwendige Aufreinigungs- und Aufkonzentrierungsschritte entfallen damit. Dieser Versuchsaufbau wäre somit ideal für die Untersuchung von Aktivatoren, Repressoren und Transkriptionsfaktoren, die gleichzeitig parallel an einem oder verschiedenen Promotoren stattfinden kann. Dass parallel unterschiedliche Gene auf Oberflächen transkribiert werden können, wurde mit der Duplex- und Triplextranskription von EGFP, FY und Myogenin bestätigt (4.4.1.7). Da alle PCR-Produkte den T7-Promotor gemein haben, sind die Ausbeuten an transkribierter RNA bei allen Genen identisch.

Im Hinblick auf die Entdeckung der intergenischen Transkription, bei der allein der Transkriptionsvorgang von nicht-kodierender RNA für die Repression eines anderen Gens verantwortlich ist, kann das Feld zur Anwendung der Oberflächen-Transkription erweitert werden. Ein wichtiger Fakt bei dieser Form der Repression ist, dass die RNA-Polymerase am Promotor für die nicht-kodierende RNA startet und den Promotorbereich des anschließenden Gens einfach übergeht und damit die Anlagerung wichtiger Transkriptionsfaktoren zur Aktivierung des kodierenden Gens unterbindet (Martens *et al.*, 2004). Dieser vor kurzem erst bekannt gewordene Mechanismus der Stilllegung von Genen bedarf der Charakterisierung solcher Genbereiche, wofür die Oberflächen-Transkription eingesetzt werden könnte. In dem Fall würde das Fehlen oder Vorhandensein der kodierenden RNA darüber entscheiden, ob die vorgeschaltete Genregion für das *transcriptionale interference* verantwortlich ist.

Die Proteinsynthese resultiert aus der Kombination von Transkription und Translation *in vivo*. Eine ganze Reihe an essentiellen Komponenten wird für die Herstellung von Strukturproteinen, Enzymen, Antikörpern und Hormonen benötigt. Die in einzelligen und mehrzelligen Lebewesen ubiquitär vorkommenden Ribosomen bilden zusammen mit der transkribierten RNA, den tRNAs, den AS und weiteren Faktoren kleine „Proteinfabriken“. Aber nicht alle Proteine werden in solchen Fabriken erzeugt. So wurden kleine 50 AS umfassende Peptide entdeckt, die ähnlich wie beim Fettstoffwechsel mit Hilfe von Synthetasen produziert werden. Die kodierenden Gene der Peptid-Synthetase, die die nicht-ribosomalen Proteine aus einzelnen AS zusammensetzt, wurden in Cyanobakterien entdeckt, die konservierte Regionen mit anderen Peptid-Synthetasegenen in anderen Bakterien und Pilzen gemein haben (Dittmann *et al.*, 1996; Meißner *et al.*, 1996; Neilan *et al.*, 1999).

Für die Mehrheit der Proteine gilt aber eine ribosomale Synthese und damit der Umstand, dass eine ganze Reihe von modifizierten Zellysaten zur Proteinexpression kommerziell erhältlich ist. Über die bakterielle Expression mit viralen oder *E. coli*-Promotoren und eukaryotischer Expression mit Weizenkeimextrakten und Kaninchen Reticulocytenlysat kann heutzutage eine fast uneingeschränkte Anzahl an Proteinen *in vitro* synthetisiert werden. Die Technologie der *in vitro* Translation schafft somit ein Medium zur Expression von auf den Zellorganismus toxisch wirkenden Proteinen.

Der genetische Ursprung vieler Proteine sowie ihrer Funktion ist ein großes Aufgabengebiet in der Proteomforschung. Die DNA- und Proteinmikroarraytechnologie ist dafür ein äußerst wichtiges Analysemittel. So wurden Antikörperarrays entwickelt, bei denen 75 verschiedene Antikörper auf Glasoberflächen gebunden und für Cytokinsekretionsstudien eingesetzt wurden (Schweitzer *et al.*, 2002). Das umgekehrte Prinzip wurde mit glasebundenen Proteinantigenen erzielt (Mendoza *et al.*, 1999). Die Oberflächen-Synthese solcher Proteine mit gleichzeitiger Zuordnung wurde in einem Mikroarrayformat entwickelt (Ramachandran *et al.*, 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von EGFP mit immobilisiertem PCR-Produkt durchgeführt (4.4.2). Das *in-vitro*-PBS-Kit wurde in Vorversuchen als das effizientere System identifiziert, wobei eine Optimierung der verwendeten *E. coli*-Lysate mit keinem Zusatz an Komponenten erzielt werden konnte (4.2.2.2.1). Bei der mit Hilfe des Immunoblot-Verfahrens verifizierten EGFP-Expression wurden verschiedene Parameter wie aminosilanisierte Oberflächen, der Temperatureinfluss, die Kopplungseffizienz und Durchmischungseffekte untersucht. Der Vergleich zwischen der Oberflächen-Translation und Translation mit frei löslichen Matrizen im vergleichbaren Reaktionsraum zeigte hier einen signifikanten Unterschied in der EGFP-Ausbeute. Während ein Unterschied zwischen maschinell und handgetropften PCR-Produkten nicht festgestellt werden konnte, da die betroffene Oberfläche bei beiden annähernd gleich groß war. Die Ausbeuten an Protein waren mit mehr als 400 ng gekoppeltem PCR-Produkt sehr schwach (4.4.2.1). Daher stellt sich die Frage ob das detektierte Protein tatsächlich von gekoppelten PCR-Produkten stammt, oder ob sie Produkte von abgelösten oder nicht gewaschenen Matrizen sind. Dies sollte mit der Reproduktion der Translation mit einmalig getropften PCR-Produkten validiert werden. Tatsächlich wurde nach der zweiten Reaktion erneut Protein nachgewiesen, wenn auch mit einem sehr schwachen Signal (4.4.2.2). Selbst die Wiederholung des Experimentes auf der wiederverwendeten Oberfläche ließ diese Frage weiterhin offen. Sicherlich deutet der Vergleich mit der Festphasen-Transkription auf eine Reproduzierbarkeit der Translation hin. Eine effizientere Expression des EGFP ließ sich mit der Senkung der Reaktionstemperatur von 37° C auf 30° C erzielen (4.4.2.3), da das EGFP bei dieser Temperatur eine größere Löslichkeit aufweist und sich somit besser nachweisen lässt (wie auf Anfrage bei der RiNA

GmbH mitgeteilt wurde). Das muss aber nicht für andere Proteine gelten. So sollte der Einfluss der Reaktionstemperatur auf eine Multiplex-Translation berücksichtigt werden.

Zur Unterstützung der Diffusion der Komponenten in der Reaktionskammer wurde mit Ultraschall-Durchmischung gearbeitet. Schon bei der *in vitro* Translation im Reaktionsgefäß sollte durch gleichmäßiges Schütteln eine gute Durchmischung erzielt werden, die zur Steigerung an Proteinausbeuten führen (Qiagen EasyXpress Anleitung). Eine Durchmischung der Flüssigkeit auf der Oberfläche kann durch Pumpen, Mikrorotoren oder mit Hilfe von mechanischen Schallwellen erfolgen. Bei der Ultraschall-Durchmischung mit zwei sich gegenüberliegenden interdigitalen Wandlern, die wie Finger ineinander greifen, wurde durch einen wechselnden Impuls eine fast monochromatische Welle erzeugt, die über Reflexion durch den Objektträger in die Flüssigkeit geleitet wird. Mit dieser konnten durch Verkürzung der Inkubationszeit bereits gute Hybridisierungssignale detektiert werden (Toegl *et al.*, 2003). Selbst klassische immunohistochemische Anfärbungen von Geweben konnten mittels Ultraschall-Durchmischung verbessert werden (Nindl *et al.*, 2004). Der Einfluss der Ultraschall-Durchmischung für eine verbesserte Oberflächen-Translation konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden (4.4.2.3). Hierfür bedarf es weiterer Experimente und eine Optimierung der Parameter wie Stärke und Pulsfrequenz der Ultraschall-Durchmischung.

Der Einbau von biotinylierten oder radioaktivmarkierten AS in die Proteinstruktur kann während der ribosomalen Synthese erfolgen. Diese Markierungen ermöglichen es, das Protein entweder zu detektieren oder zu immobilisieren. So konnte das GFP-Protein über den Einbau die biotinylierten Start-Aminosäure Methionin markiert werden und über die Markierung an streptavidinbeschichteten Oberflächen gebunden werden (Shinya & Taira, 2001). Dies stellt eine Alternative zur teuren und umfangreichen Bindung von Proteinen über spezifische Antikörper dar, da hier keine Notwendigkeit von Antigenizität vorliegen muss.

Die Bindung des Proteins in der Nähe der genetischen Information kann auch ohne einen Abstand zwischen beiden realisiert werden. Dies kann z.B. durch die Verknüpfung von DNA-Sequenzen mit Antikörpern über einen 5'- oder 3'-DNA-Streptavidin-Linker erfolgen (Niemeyer *et al.*, 2003). Mit einer PCR, bei der ein DNA-Antikörper-Primer und ein kopplungsaktiver Primer zur Amplifikation eingesetzt werden, könnte ein DNA-Konstrukt generiert werden, das nach seiner Oberflächen-Kopplung den gebundenen Antikörper endständig und frei schwebend über der Oberfläche trägt. Das während der Oberflächen-Translation entstehende Protein könnte dann direkt über seiner Matrize gebunden werden, was den Vorteil einer besseren Oberflächennutzung mitbringen würde. Dies setzt aber eine teure Produktion von DNA-Protein-Konjugaten voraus.

Beim PROfusion-Prinzip wird das C-terminale Ende des Proteins an seine eigene RNA gekoppelt (Roberts & Szostak, 1997). Die so markierte RNA konnte an eine Oberflächen-immobilisierte Sonde binden und das vernetzte Protein über einen Antikörpernachweis der

DNA-Sequenz zugeordnet werden (Weng *et al.*, 2002). Dieses Prinzip lässt sich auch mit der Oberflächen-Translation verbinden. So könnte die komplette Generierung der Matrizen über eine Oberflächen-PCR mit anschließender Translation alle molekularbiologischen Schritte in einem einzelnen μm -großen Bereich auf der Oberfläche vereinigt werden. Hierfür muss aber gewährleistet werden, dass sich der Komplex aus RNA-Polymerase, Transkript und Protein nicht von der Matrize ablöst. Dieser eingefrorene Zustand wurde bei Enzym und RNA von über 50 nt durch den Einfluss von bestimmten Salzkonzentrationen erreicht (Rhodes & Chamberlin, 1974). Letztendlich ist die Anwendung solcher Arrayformate mit enzymatischen Synthesen von der Detektionsapparatur abhängig. Je genauer und spezifischer die Detektion und Zuordnung des Proteins zu seinem Gen ist, umso weniger Ausgangsmaterial und synthetisierte Produkte werden benötigt. Das gilt z.B. für die Detektion von Einzelmolekülen. Auf Proteinebene wurde ein Verfahren entwickelt, dass über die Bindung eines ReAsH-Farbstoffmoleküls (*resorufin-based arsenical hairpin binder*) an ein Oberflächen-gebundenes Protein dessen Detektion im nm-Maßstab erlaubte (Park *et al.*, 2004).

5.4 Zusammenfassung

Die Etablierung der Transkription von kompletten Genen auf planaren Oberflächen soll eine Verbindung zwischen der Mikroarraytechnologie und der Transkriptomforschung herstellen. Darüber hinaus kann mit diesem Verfahren ein Brückenschlag zwischen der Synthese der Gene und ihrer kodierenden Proteine auf einer Oberfläche erfolgen.

Für die Immobilisation der Gene wurden zwei verschiedene Strategien ausgewählt:

- Mit der einen wurden lineare Transkriptionsmatrizen in einer PCR amplifiziert, bei der ein Primer mit einer 5'-Phosphatmodifikation eingesetzt wurde. Die PCR-Produkte wurden über eine kovalenten Kopplung an aminosilanisierten Oberflächen immobilisiert.
- Im zweiten Ansatz wurde eine zirkuläre Transkriptionsmatrize konstruiert. Hierfür wurden in das Expressionsplasmid pET-EGFP Stammschleifen-Sequenzen kloniert. Zur Ausprägung dieser Strukturen sollte ein Plasmidhybrid aus einem Stammschleifen-tragenden und einem ursprünglichen DNA-Strang generiert werden. Hierfür wurde über eine rekombinante Nickaseschnittstelle das Plasmid relaxiert und der geöffnete Strang mit einer Exonuklease verdaut. Der Zusammenschluss zweier einzelsträngiger DNA-Ringe zu einem Plasmid sollte mit Hilfe des Enzyms Topoisomerase I bewerkstelligt werden. Dieses Verfahren blieb aber ergebnislos. Einzig die Hybridisierung eines einzelsträngigen Plasmidringes über seine Stammschleifen-Struktur an eine Oberflächen-immobilisierte Sonde konnte nachgewiesen werden.

Deshalb wurde die Oberflächen-Transkription mit einer linearen Matrize weitergeführt.

Alle transkribierten RNAs wurden mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben und in einer genspezifischen PCR amplifiziert. Dabei zeigte sich, dass die Kopplungsdauer der PCR-Produkte ein entscheidender Faktor für den Erfolg der Festphasen-Transkription darstellte. Die PCR-Produkte wurden hierfür entweder per Hand oder maschinell auf die Oberfläche transferiert. Über eine Oberflächen-PCR war es möglich, die Gensequenz des Reportergens EGFP direkt auf der Oberfläche zu synthetisieren und anschließend zu transkribieren. Somit war eine Transkription mit weniger als 1 ng an Matrize möglich.

Der Vorteil einer Oberflächen-Transkription gegenüber der in Lösung liegt in der mehrfachen Verwendung der immobilisierten Matrize, wie sie in dieser Arbeit dreimal erfolgreich absolviert wurde. Weiterhin konnten alle drei Gensequenzen, darunter das EGFP-Gen, das humane FY-Gen und das murine Myogenin-Gen, gemeinsam in einer Reaktion transkribiert werden.

Die Oberflächen-Translation des EGFP-Gens konnte ebenfalls zweimal an einer immobilisierten Matrize gezeigt werden, wobei Zweifel über eine echte Festphasen-Translation nicht ausgeräumt werden konnten.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Transkription und Translation von immobilisierten Gensequenzen auf planaren Oberflächen möglich ist, wofür die linearen Matrizen direkt auf der Oberfläche synthetisiert werden können.

5.5 Ausblick

Die Oberflächen-Transkription kann in weiterführenden Arbeiten weiter optimiert werden. Hierfür wäre es interessant, einen Vergleich zwischen linearen und zirkulären Matrizen anzustreben. Die Generierung des Plasmidhybrids kann mit Hilfe der Topoisomerase abgeschlossen werden, wofür aber genügend DNA-Ausgangsmaterial bereitgestellt werden muss. Erste Experimente könnten auch mit der Hybridisierung einer Promotor-komplementären Sonde erfolgen, da für die Transkription nur der Promotorbereich doppelsträngig vorliegen muss. Damit könnte auch ein Einzelstrangring mit hybridisierter Promotorsonde in Vorversuchen auf Oberflächen gebunden und in die Vergleichsstudien mit linearer Matrize transkribiert werden.

Auch die Transkription selbst kann unter anderen Aspekten genauer untersucht werden. So wäre auch eine Kombination verschiedener viraler Promotoren auf einer Oberfläche denkbar. Dafür wären allerdings verschiedene RNA-Polymerasen nötig, deren Aktivität aber abhängig von den Reaktionsbedingungen und -komponenten ist. Aussichtsreich wäre auch die Oberflächen-Transkription von Genen unter der Kontrolle eukaryotischer Promotoren. Der Einfluss der Transkriptionsfaktoren auf die Reaktion selbst könnte zur Charakterisierung der

Promotoren und der RNA-Polymerasen beitragen. Sicherlich wäre auch die Quantifizierung der RNA-Synthese ein weiterer wichtiger Punkt zur Analyse der Oberflächen-Transkription.

Die Oberflächen-Translation, bei der komplette Lysate als Reaktionsmedien eingesetzt werden, könnte auch für eukaryotische Systeme angewendet werden.

Sinnvoll ist es, die komplette Synthese der Matrizen über Oberflächen-PCR bis hin zur Oberflächen-Translation auf einer Oberfläche ablaufen zu lassen. Dies wäre dann ein erster Schritt zur Unabhängigkeit von Synthesen in Reaktionsgefäßen und wäre in einem mikrofluidischen System am besten realisierbar.

Viele Parameter der enzymatischen Oberflächen-Synthesen müssen dafür optimiert werden. So z.B. könnte auch der Einsatz kopplungseffizienterer Oberflächen wie Epoxysilane getestet werden. Es bestehen viele Möglichkeiten einer guten Oberflächenkopplung, die aber für die Reproduzierbarkeit von gleichbleibender und hochwertiger Qualität der Oberflächen-Beschichtung abhängig ist.

6. Literaturverzeichnis

Adamson TE, Shutt DC, Price DH

Functional coupling of cleavage and polyadenylation with transcription of mRNA.
J. Biol. Chem. **2005**; 280: 32262-71

Addison CL, Belperio JA, Burdick MD, Strieter RM

Overexpression of the duffy antigen receptor for chemokines (DARC) by NSCLC tumor cells results in increased tumor necrosis.
BMC Cancer **2004**; 4:28

Adessi C, Matton G, Ayala G, Turcatti G, Mermod J-J, Mayer P, Kawashima E

Solid phase DNA amplification: characterisation of primer attachment and amplification mechanisms.
Nucleic Acids Res. **2000**; 20: e87

Andreadis JD, Chrisey LA

Use of immobilized PCR primers to generate covalently immobilized DNAs for in vitro transcription/translation reactions.
Nucleic Acids Res. **2000**; 28: e5

Arenkov P, Kukhtin A, Gemmell A, Voloshchuk S, Chupeeva V, Mirzabekov A

Protein microchips: use for immunoassay and enzymatic reactions.
Anal. Biochem. **2000**; 278: 123-31

Arias JA, Dynan WS

Promoter-dependent transcription by RNA polymerase II using immobilized enzyme complexes.
J. Biol. Chem. **1989**; 264: 3223-9

Bae K-H, Kwon YD, Shin H-C, Hwang M-S, R, E-H, Park K-S, Yang H-Y, Lee D-K, Lee Y, Park J, Kwon HS, Kim H-W, Yeh B-I, Lee H-W, Sohn SH, Yoon J, Seol W, Kim J-S

Human zinc fingers as building blocks in the construction of artificial transcription fingers.
Nat. Biotechnology **2003**; 21: 275-80

Beier M, Hoheisel JD

Versatile derivatisation of solid support media for covalent bonding on DNA-microchips.
Nucleic Acids Res. **1999**; 27: 1970-7

Bentin T, Nielsen PE

In vitro transcription of a torsionally constrained template.
Nucleic Acids Res. **2002**; 30: 803-9

Bertucci F, Bernard K, Loriol B, Chang Y-C, Granjeaud S, Birnbaum D, Nguyen C, Peck K, Jordan BR

Sensitivity issues in DNA array-based expression measurements and performances of nylon microarrays for small samples.
Hum. Mol. Genet. **1999**; 8: 1715-22

Bezhad O, Lee CL, Gavin J, Marsh WL

A new anti-erythrocyte antibody in the Duffy system: Anti-Fy4
Vox Sang **1973**; 24: 337

Bier FF, Kleinjung F, Scheller FW

Real-time measurement of nucleic acid hybridization using evanescent-wave sensors: steps towards the genosensor.

Sensors and Actuators **1997**; 78-82

Bier FF, Kleinjung F, Schmidt PM, Scheller FW

Determination of the turnover number of the restriction endonuclease EcoRI using evanescent-wave technology.

Anal. Bioanal. Chem. **2002**; 372: 308-13

Bijl JJ, Rieger E, van Oostveen JW, Meijer CJ, Oudejans CB, Walboomers JM

Quantification of biotinylated RNA probes for in situ hybridization using chemiluminescence.

Histochemistry **1994**;102: 77-82.

Bilitewski U, Bier FF, Brandenburg A

Immunobiosensors based on grating couplers.

in Rogers, K.R. and Mulchandani, A, eds:

Affinity Biosensors-Techniques and Protocols, Human Press, Totowa, p.121-134, **1998**

Blackwell TK, Weintraub H

Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection.

Science **1990**; 250: 1104-10

Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW.

Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system.

Gene **1977**;2: 95-113

Bordoni R, Consolandi C, Castiglioni B, Busti E, Bernardi LG, Battaglia C, De Bellis G

Investigation of the multiple anchors approach in oligonucleotide microarray preparation using linear and stem-loop structured probes.

Nucleic Acids Res. **2002**; 30: e34

Braun T, Bober E, Buschhausen-Denker G, Kohtz S, Grzeschik KH, Arnold HH

Differential expression of myogenic determination genes in muscle cells: possible autoactivation by the Myf gene products.

EMBO J. **1989**; 8: 3617-25.

Brennan TJ, Chakraborty T, Olson EN

Mutagenesis of the myogenin basic region identifies an ancient protein motif critical for activation of myogenesis.

Proc. Natl. Acad. Sci. **1991**; 88: 5675-9

Broude N, Woodward K, Cavallo R, Cantor CR, Englert D

DNA microarrays with stem-loop DNA probes: preparation and application.

Nucleic Acids Res. **2001**; 29: e92

Buckle M, Williams RM, Negrini M, Buc H

Real time measurements of elongation by a reverse transcriptase using surface plasmon resonance.

Proc. Natl. Acad. Sci. **1996**; 93: 889-94

Casper S und Holt C

Expression of the green fluorescent protein-encoding gene from tobacco mosaic virus-based vector.

Gene **1996**; 173: 69-77

Chaudhuri A, Zbrzezna V, Johnson C, nichols M, Rubinstein P, Marsh WL, Pogo AO

Purification and characterization of an erythrocyte membrane protein complex carrying Duffy blood group antigenicity.

J. Biol. Chem. **1989**; 264: 13770

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ

Green fluorescent protein as a marker for gene expression.

Science **1994**; 263: 802-5

Chamberlin M, McGrath J, Waskell L

New RNA polymerase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T7.

Nature **1970**; 228: 227-31

Cheetham GM, Jeruzalmi D, Steitz TA

Structural basis for initiation of transcription from an RNA polymerase-promoter complex.

Nature **1999**; 399: 80-3

Chen JH, Seeman NC

Synthesis from DNA of a molecule with the connectivity of a cube.

Nature **1991**; 350: 631-3

Chen ZG, Stauffacher C, Li Y, Schmidt T, Bomu W, Kamer G, Shanks M, Lomonosoff G, Johnson JE

Protein-RNA interactions in an icosahedral virus at 3.0 Å resolution.

Science **1989**; 245: 154-9

Cheng J, Sheldon EL, Wu L, Gerrue LO, Carrino J, Heller MJ, O'Connell JP

Preparation and hybridization analysis of DNA/RNA from *E. coli* on microfabricated bioelectronic chips.

Nat. Biotechnology **1998a**; 16: 541-6

Cheng J, Sheldon EL, Wu L, Heller MJ, O'Connell JP

Isolation of cultured cervical carcinoma cells mixed with peripheral blood cells on a bioelectronic chip.

Anal. Chem. **1998b**; 70: 2321-6

Cheung VG, Morley M, Aguilar F, Massimi A, Kucherlapati R, Childs G

Making and reading microarrays.

Nat. Genet. **1999**; 21: 15-9

Chitnis CE, Chaudhuri A, Horuk R, Pogo O, Miller LH

The domain on the Duffy blood group antigen for binding *Plasmodium vivax* and *P. knowlesi* malarial parasites to erythrocytes.

J. Exp. Med. **1996**; 184: 1531

Chiu SK, Hsu M, Ku WC, Tu CY, Tseng YT, Lau WK, Yan RY, Ma JT, Tzeng CM

Synergistic effects of epoxy- and amine-silanes on microarray DNA immobilization and hybridization.

Biochem. J. **2003**; 374: 625-32

Colledge KI, Pezzulich M, Marsh WL

Anti-Fy5: An antibody disclosing a probable association between the Rhesus and Duffy blood group genes.

Vox Sang **1973**; 24: 193

Constantinides PG, Jones PA, Gevers W

Functional striated muscle cells from non-myoblast precursors following 5-azacytidine treatment.

Nature **1977**; 267: 364-6

Cook PR, Gove F

Transcription by an immobilized RNA polymerase from bacteriophage T7 and the topology of transcription.

Nucleic Acids Res. **1992**; 14: 3591-8

Cook PR

The organization of replication and transcription.

Science **1999**; 284: 1790-5

Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S

FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)

Gene **1996**; 173: 33-8

Cubitt AB, Heim R, Adams SR, Boyd AE, Gross LA, Tsien RY

Understanding, improving and using green fluorescent proteins.

Trends Biochem Sci. **1995**; 20: 448-55

Cull MG, Miller JF, Schatz PJ

Screening for receptor ligands using large libraries of peptides linked to the C terminus on the lac repressor.

Proc. Natl. Acad. Sci. **1992**; 89: 1865-69

Culler SR, Ishida H, Koenig JL

FT-IR characterization of the reaction at the silane/matrix resin interphase of composite materials.

J. of Colloid and Interface Science **1986**; 109: 1-10

Cwirla SE, Peters EA, Barrett RW, Dower WJ

Peptides on phage: A vast library of peptides for identifying ligands.

Proc. Natl. Acad. Sci. **1990**; 87: 6378-82

Darbonne WC, Rice GC, Mohler MA, Apple T, Hegert CA, Valente AJ, Baker JB

Red blood cells are a sink for interleukin 8, aleukocyte chemotaxin.

J. Clin. Invest. **1991**; 88: 1362

Davanloo P, Rosenberg AH, Dunn JJ, Studier FF

Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase.

Proc. Natl. Acad. Sci. **1984**; 81: 2035-39

Davis RL, Weintraub H, Lassar AB

Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts.

Cell **1987**; 51: 987-1000

Devlin JJ, Panganiban LC, Devlin PE

Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules.

Science **1990**; 249: 404-6

Diehl F, Grahlmann S, Beier M, Hoheisel JD

Manufacturing DNA microarrays of high spot homogeneity and reduced background signal.

Nucleic Acids Res. **2001**; 29: e78

Diehl F, Beckmann B, Kellner N, Hauser NC, Diehl S, Hoheisel JD

Manufacturing DNA microarrays from unpurified PCR products.

Nucleic Acids Res. **2002**; 30: e79

Dittmann E, Neilan BA, Erhard M, von Dohren H, Borner T

Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806.

Mol. Microbiol. **1997**; 26: 779-87

Egholm M, Buchardt O, Christensen L, Behrens C, Freier SM, Driver DA, Berg RH, Kim SK, Norden B, Nielsen PE.

PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules.

Nature **1993**; 365: 566-8

Erdogan F, Kirchner R, Mann W, Ropers HH, Nuber UA

Detection of mitochondrial single nucleotide polymorphisms using a primer elongation reaction on oligonucleotide microarrays.

Nucleic Acids Res. **2001**; 29: e36

Eron L, Block R

Mechanism of initiation and repression of in vitro transcription of the lac operon of *Escherichia coli*.

Proc. Natl. Acad. Sci. **1971**; 68: 1828-32

Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D

Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis.

Science **1991**; 251: 767-73

Fürst DO, Osborn M, Weber K

Myogenesis in the mouse embryo: differential onset of expression of myogenic proteins and the involvement of titin in myofibril assembly.

J. Cell Biol. **1989**;109: 517-27

Fujisawa-Sehara A, Nabeshima Y, Hosoda Y, Obinata T, Nabeshima Y

Myogenin contains two domains conserved among myogenic factors.

J. Biol. Chem. **1990**; 265: 15219-23

Fujita K, Silver J

Surprising lability of biotin-streptavidin bond during transcription of biotinylated DNA bound to paramagnetic streptavidin beads.

Biotechniques **1993**; 14: 608-17

Ge H

UPA, a universal protein array system for quantitative detection of protein-protein, protein-DNA, protein-RNA and protein-ligand interactions.

Nucleic Acids Res. **2000**; 28: e3

Ghosh D, Ramakanth M, Bhaumik A, Faure N, Rondelez F, Chatterji D

Transcription of T7 DNA immobilised on latex beads and Langmuir-Blodgett film.

J. Biochem. Biophys. Methods. **2005**; 62: 51-62

Ghosh SS, Musso GF

Covalent attachment of oligonucleotides to solid supports.
Nucleic Acids Res. **1987**; 15: 5353-72.

Green NM

Avidin.
Adv. Protein Chem. **1975**; 29: 85-133

Gross L, Chen WL, McAllister WT

Characterization of bacteriophage T7 RNA polymerase by linker insertion mutagenesis.
J. Mol. Biol. **1992**; 228: 488-05

Gueroui Z, Place C, Freyssingeas E, Berge B

Observation by fluorescence microscopy of transcription on single combed DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. **2002**; 99: 6005-10

Guo Z, Guilfoyle RA, Thiel AJ, Wang R, Smith LM

Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports.
Nucleic Acids Res. **1994**; 22: 5456-65.

Gupta V, Cherkassky A, Chatis P, Joseph R, Johnson AL, Broadbent J, Erickson T, DiMeo J

Directly labeled mRNA produces highly precise and unbiased differential gene expression data.
Nucleic Acids Res. **2003**; 31: e13

Hadjantonakis A-K, Macmaster S, Nagy A

Embryonic stem cells and mice expressing different GFP variants for multiple non-invasive reporter usage within a single animal.
BMC Biotechnol. **2002**; 2: 11

Hadley TJ, Peiper SC

From Malaria to chemokine receptor: The emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen.
Blood **1997**; 89: 3077-91

Hanes J, Jermutus L, Weber-Bornhauser S, Bosshard HR, Plückthun A

Ribosome display efficiently selects and evolves high-affinity antibodies in vitro from immune libraries.
Proc. Natl. Acad. Sci. **1998**; 95: 14130-5

Hanes J, Plückthun A

In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display.
Proc. Natl. Acad. Sci. **1997**; 94: 4937-42

Hanes J, Schaffitzel C, Knappik A, Plückthun A

Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naive library selected and evolved by ribosome display.
Nat. Biotechnol. **2000**; 18: 1287-92

He M, Taussig MJ

Antibody-ribosome-mRNA (ARM) complexes as efficient selection particles for in vivo display and evolution of antibody combining sites.
Nucleic Acids Res. **1997**; 25: 5132-34

Hegde P, Qi R, Abernathy K, Gay C, Dharap S, Gaspard R, Hughes JE, Snesrud E, Lee N, Quackenbush J

A concise guide to cDNA microarrays analysis.
Biotechniques **2000**; 29: 548-56

Heim R, Prasher DC, Tsien RY

Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. **1994**; 91: 12501-4

Heise CI, Ehrentreich-Förster E, Reiß E, Bier FF

Covalent attachment of oligonucleotides onto aminated glass surface using chloroformic butyric ester.
Analytical and Bioanalytical Chemistry **2004** in submission

Heise CI

Strukturierte Immobilisierung auf Oberflächen für BioChip-Anwendungen.
Dissertation, Potsdam, 2004

Heiter DF, Lunnen KD, Wilson GG

Site-specific DNA-nicking mutants of the heterodimeric restriction endonuclease R.BbvCI.
J. Mol. Biol. **2005**; 348: 631-40

Hölzel R, Gajovic-Eichelmann N, Bier FF

Oriented and vectorial immobilization of linear M13 dsDNA between interdigital electrodes-towards single molecule DNA nanostructures.
Biosens. Bioelectron. **2003**; 18: 555-64

Holden MA, Jung SY, Cremer PS

Microfluidic tools for studying the specific binding, adsorption, and displacement of proteins at interfaces.
Annu. Rev. Phys. Chem. **2005**; 56: 369-87

Holden MA, Jung SY, Cremer PS

Patterning enzymes inside microfluidic channels via photoattached chemistry.
Anal. Chem. **2004**; 76: 1838-43

Holloway AJ, van Laar RK, Tothill RW, Bowtell DD

Options available - from start to finish – for obtaining data from DNA microarrays II.
Nat Genet. **2002**; 32 :481-9.

Horuk R, Martin A, Hesselgesser J, Hadley T, Lu Z, Wang Z, Peiper SC

The duffy antigen receptor for chemokines: structural analysis and expression in the brain.
J. Leuko Biol. **1996**; 59: 29-38

Huber M, Losert D, Hiller R, Harwanegg C, Mueller MW, Schmidt WM

Detection of single base alterations in genomic DNA by solid phase polymerase chain reaction on oligonucleotide microarrays.
Anal. Biochem. **2001**; 299: 24-30

Hwang SR, Garza CZ, Wegrzyn JL, Hook VY

Demonstration of GTG as an alternative initiation codon for the serpin endophin 2B-2.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **2005**; 327: 837-44

Inouye S, Tsuji FI

Evidence for redox forms of the Aequorea green fluorescent protein.
FEBS letter **1994**; 351: 211-4

Iwamoto S, Li J, Omi T, Ikemoto S, Kaji E

Identification of a novel exon and spliced form of Duffy mRNA that is the predominant transcript in both erythroid and postcapillary venule endothelium.

Blood **1996**; 87: 378-85

Jayarajah CN, Thompson M

Signaling of transcriptional chemistry in the on-line detection format.

Biosens. Bioelectron. **2002**; 17: 159-71

Kabata H, Kurosawa O, Arai I, Wasiizu M, Margaron SA, Glass RE, Shimamoto N

Visualization of single molecules of RNA polymerase sliding along DNA.

Science **1993**; 262: 1561-63

Kahana J, Schnapp B, Silver P

Kinetics of spindle pole body separation in budding yeast.

Proc. Natl. Acad. Sci. **1995**; 92: 9707-11

Karlsson M, Pavlov MY, Malmquist M, Persson B, Ehrenberg M

Initiation of Escherichia coli ribosomes on matrix coupled mRNAs studied by optical biosensor technique.

Biochimie **1999**; 81: 995-1002

Kashlev M, Martin E, Polyakov A, Severinov K, Nikiforov V, Goldfarb A

Histidine-tagged RNA-Polymerase: dissection of the transcription cycle using immobilized enzyme.

Gene **1993**; 130: 9-14

Kerr C, Sadowski PD:

Gene 6 exonuclease of bacteriophage T7. I. Purification and properties of the enzyme.

J. Biol. Chem. **1972**; 247: 305-10

Kerr C, Sadowski PD.:

Gene 6 exonuclease of bacteriophage T7. II. Mechanism of the reaction.

J. Biol. Chem. **1972**; 247: 311-8

Kirkegaard K, Wang JC

Escherichia coli DNA topoisomerase I catalyzed linking of single-stranded rings of complementary base sequences.

Nucleic Acids Res. **1978**; 5: 3811-20.

Kleinjung F, Bier FF, Warsinke A, Scheller FW

Fibre-optic genosensor for specific determination of femtomolar DNA oligomers.

Anal. Chimica Acta **1997**; 350: 51-8

Krieg PA, Melton DA

Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs.

Nucleic Acids Res. **1984**; 12: 7057-70

Kuhn H, Frank-Kamenetskii M, Demidov VV

High-Purity Preparation of a Large DNA Dumbbell.

Antisense Nucleic Acid Drug Dev. **2001**; 11:149-53.

Kumar A, Larsson O, Parodi D, Liang Z

Silanized nucleic acids: a general platform for DNA immobilization.

Nucleic Acid Res. **2000**, 28: e71

Lagally ET, Mednitz I, Mathies RA

Single-molecule DNA amplification and analysis in an integrated microfluidic device.
Anal. Chem. **2001**; 73: 565-70

Larson SB, Koszelak S, Day J, Greenwood A, Dodds JA, McPherson A

Double-helical RNA in satellite tobacco mosaic virus.
Nature **1993**; 361: 179-82

Lassar AB, Davis RL, Wright WE, Kadesch T, Murre C, Voronova A, Baltimore D, Weintraub H

Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo.
Cell **1991**; 66: 305-15

Lee JS, Frevert CW, Wurfel MM, Pieper SC, Wong VA, Ballman KK, Ruzinski JT, Rhim JS, Martin TR, Goodman RB

Duffy antigen facilitates movement of chemokine across the endothelium in vitro and promotes neutrophil transmigration in vitro and in vivo.
J. Immunology **2003**; 170: 5244-51

Leone G, van Schijndel H, van Gemen B, Kramer FR, Schoen CD

Molecular beacon probes combined with amplification by NASBA enable homogeneous, real-time detection of RNA.
Nucleic Acids Res. **1998**; 26: 2150-5

Li X, Yang XP, Qi J, Seeman NC

Antiparallel DNA double crossover molecules as components for nanoconstruction.
J. Am. Chem. Soc. **1996**; 118: 6131-40

Li X, Zhang G, Ngo N, Zhao X, Kain SR, Huang C-C

Deletions of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein define the minimal domain required for fluorescence.
J. Biol. Chem. **1997**; 272: 28545-9

Lundin KE, Rongbin G, Svahn MG, Törnquist E, Leijon M, Brandien LJ, Smith CIE

Cooperative strand invasion of supercoiled plasmid DNA by mixed linear RNA and PNA-peptide chimeras.
Biomol Eng. **2004**; 21: 51-9

MacBeath G, Schreiber SL

Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination.
Science **2000**; 289: 1760-3

Macdonald LE, Durbin RK, Dunn JJ, McAllister WT

Characterization of two types of termination signal for bacteriophage T7 RNA polymerase.
J. Mol. Biol. **1994**; 238: 145-58

Majors J

Initiation of in vitro mRNA synthesis from the wild-type lac promoter.
Proc. Natl. Acad. Sci. **1975**; 72: 4394-8

Maleki SJ, Hurlburt BK

High-level expression and purification of MyoD, myogenin, and E12.
Protein Expr. Purif. **1997**; 9: 91-9

Marble HA, Davies RA

RNA transcription from immobilised DNA templates.

Biotechnol. Prog. **1995**; 11: 393-396

Marschan X

Mikroarray-basierte Detektion von mRNA aus Zellen mittels On-Chip-PCR.

Dissertation, Potsdam, 2005

Martens JA, Lapgrade L, Winston F

Intergenic transcription is required to repress *Saccharomyces cerevisiae* SER3 gene.

Nature **2004**; 429: 571-74

Martin GA, Kawaguchi R, Lam Y, DeGiovanni A, Fukushima M, Mutter W

High-yield, in vitro protein expression using continuous-exchange, coupled transcription/translation system.

Biotechniques **2001**; 31: 952-3

Mattheakis LC, Ramesh RB, Dower WJ

An *in vitro* polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries.

Proc. Natl. Acad. Sci. **1994**; 91: 9022-9026

McAllister WT

Structure and function of bacteriophage T7 RNA polymerase (or, the virtues of simplicity).

Cell. Mol. Biol. Res. **1993**; 39: 385-91

McAllister WT, Carter AD

Regulation of promoter selection by the bacteriophage T7 RNA polymerase in vitro.

Nucleic Acids Res. **1980**; 8: 4821-37

McDonell MW

Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels.

J. Mol. Biol. **1977**; 110: 119-46

Megeney LA, Rudnicki MA

Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors.

Biochem Cell Biol. **1995**; 73: 723-32

Meissner K, Dittmann E, Borner T

Toxic and non-toxic strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* contain sequences homologous to peptide synthetase genes.

FEMS Microbiol. Lett. **1996**; 135: 295-303

Melton DA, Krieg PA, Rebagliati MR, Maniatis T, Zinn K, Green MR

Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter.

Nucleic Acids Res. **1984**; 12: 7035-56.

Mendoza LG, McQuary P, Mongan A, Gangadharan R, Brignac S, Eggers M.

High-throughput microarray-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Biotechniques **1999**; 27: 778-88

Meynell E, Datta N.

Mutant drug resistant factors of high transmissibility.

Nature **1967**; 214: 885-7

Mikhailov VS, Okano K, Rohrmann GF

Specificity of the endonuclease activity of the Baculovirus alkaline nuclease for single-stranded DNA.

J. Biol. Chem. **2004**; 279: 14734-45

Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH

The resistance factor to Plasmodium vivax in blacks: The Duffy blood group genotype FyFy.

N. Engl. J. Med. **1976**; 295: 302

Mitra RD, Church GM

In situ localized amplification and contact replication of many individual DNA molecules.

Nucleic Acids Res. **1999**; 27: e34

Mitterer G, Huber M, Leidinger E, Kirisits C, Lubitz W, Mueller MW, Schmidt WM

Microarray-based identification of bacteria in clinical samples by solid-phase PCR amplification of 23S ribosomal DNA sequences.

J. Clin. Microbiol. **2004**; 42: 1048-57

Moll WD, Guo P

Translocation of nicked but not gapped DNA by packaging motor of bacteriophage phi29.

J. Mol. Biol. **2005**; 351: 100-7

Molkentin JD, Olson EN

Combinatorial control of muscle development by basic helix-loop-helix and MADS-box transcription factors.

Proc. Natl. Acad. Sci. **1996**; 93: 9366-73.

Morise H, Shimomura O, Johnson FH, Winant J

Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of Aequorea.

Biochemistry **1974**; 13: 2656-62

Mujumdar RB, Ernst LA, Mujumdar SR, Waggoner AS

Cyanine dye labeling reagents containing isothiocyanate groups.

Cytometry **1989**;10: 11-9

Murre C, McCaw PS, Baltimore D

A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins.

Cell **1989**; 56: 777-83

Neilan BA, Dittmann E, Rouhiainen L, Bass RA, Schaub V, Sivonen K, Börner T

Nonribosomal peptide synthesis and toxigenicity of cyanobacteria.

J. Bacteriol. **1999**; 181: 4089-97.

Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O

Sequence selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide.

Science **1991**; 254: 1497-1500

Niemeyer CM, Wacker R, Adler M

Combination of DNA-directed immobilization and immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of self-assembled DNA-protein conjugates.

Nucleic Acids Res. **2003**; 16: e90

Nilsson P, Persson B, Uhlen M, Nygren PA

Real-time monitoring of DNA manipulations using biosensor technology.

Anal. Biochem. **1995**; 224: 400-8

Nindl I, Toegl A, Sterry W, Stockfleth E

High sensitivity and reproducibility of immunohistochemistry with microagitation.

Arch. Dermatol. Res. **2004**; 296: 278-81

Oakley JL und Coleman JE

Structure of a promotor for T7 RNA polymerase.

Proc. Natl. Acad. Sci. **1977**; 31: 4266-72

Ørum H, Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O, Stanley C

Single base pair mutation analysis by PNA directed PCR clamping.

Nucleic Acids Res. **1993**; 21: 5332-6

Panayotates N, Wells RD

Recognition and initiation site for four late promoters of phage T7 is a 22-base pair DNA sequence.

Nature **1979**; 280: 35-9

Park H, Hanson GT, Selvin PR

Nanometre localization of single ReAsH molecules.

J. Microsc. **2004**; 216: 199-205

Pavlov MY, Freistoffer DV, Ehrenberg M

Synthesis of region-labelled proteins for NMR studies by in vitro translation of column-coupled mRNAs.

Biochimie **1997**; 79: 415-22

Pease AC, Solas D, Sullivan E, Cronin MT, Holmes CP, Fodor SPA

Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis.

Proc. Natl. Acad. Sci. **1994**; 91: 5022-6

Pemberton IK, Buckle M

Real time in vitro analysis of transcription by RNA polymerase on immobilized DNA fibres.

J. Mol. Recognit. **1999**; 12: 322-27

Perez-Martin J, Rojo F, de Lorenzo V

Promoters responsive to DNA bending: a common theme in prokaryotic gene expression.

Microbiol. Rev. **1994**; 58:268-90

Ramachandran N, Hainsworth E, Bhullar B, Eisenstein S, Rosen B, Lau AY, Walter JC, LaBear J

Self-Assembling protein microarrays.

Science **2004**; 305:86-90

Rasmussen SR, Rasmussen HB, Larsen MR, Hoff-Jorgensen R, Cano RJ

Combined polymerase chain reaction-hybridization microplate assay used to detect bovine leukemia virus and Salmonella.

Clin. Chem. **1994**; 40: 200-5

Reuben RC, Skalka A

Identification of the site of interruption in relaxed circles produced during bacteriophage lambda DNA circle replication.

J. Virol. **1977**, 21: 673-82

Rhodes G, Chamberlin MJ

Ribonucleic acid chain elongation by *Escherichia coli* ribonucleic acid polymerase. I. Isolation of ternary complexes and the kinetics of elongation.
J. Biol. Chem. **1974**; 249: 6675-83

Rhodes CH, Honsinger C, Porter DM, Sorenson GD

Analysis of the allele-specific PCR method for the detection of neoplastic disease.
Diagn. Mol. Pathol. **1997**; 6: 49-57

Richardson RW, Gumport RI

Biotin and fluorescent labeling of RNA using T4 RNA ligase.
Nucleic Acids Res. **1983**; 11: 6167-84

Roberts RW, Szostak JW

RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. **1997**; 94: 12297-13202

Rosa MD

Four T7 RNA polymerase promoters contain an identical 23 bp sequence.
Cell **1979**; 16: 815-25

Rosenberg AH, Lade BN, Chui D-S, Lin S-W, Dunn JJ, Studier FW

Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase.
Gene **1987**; 56: 125-35

Rudnicki MA, Jaenisch R

The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis.
Bioessays. **1995**; 17: 203-9

Sahly I, Erez H, Khourorsky A, Shapira E, Spira ME

Effective expression of the green fluorescent fusion proteins in cultured *Aplysia* neurons.
J. Neurosci. Methods **2003**; 126: 111-7

Sawata SY, Taira K

Modified peptide selection in vitro introduction of a protein-RNA interaction.
Protein Eng. **2003**; 16: 1115-24

Schafer DA, Gelles J, Sheetz MP, Landick R

Transcription by single molecules of RNA polymerase observed by light microscopy.
Nature **1991**; 352: 444-8

Schena M, Shalon D, Brown PO, Davis RW

Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray.
Science **1995**; 270: 467-70

Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown PO, Davis RW

Parallel human genome analysis: Microarray-based expression monitoring of 1000 genes.
Proc. Natl. Acad. Sci. **1996**; 93: 10614-9

Schena M

Microarray analysis.
John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey **2003**

Schinkel AH, Groot Koerkamp JA, Teunissen WRH, Tabak HF

RNA polymerase induces DNA bending at yeast mitochondrial promoters.
Nucleic Acids Res. **1988**; 16: 9147-63

Schmidt PM, Lehmann C, Matthes E, Bier FF

Detection of activity of telomerase in tumor cells using fibre optical biosensors.
Biosens. Bioelectron. **2002**; 17: 1081-7

Schwarz JJ, Chakraborty T, Martin J, Zhou JM, Olson EN

The basic region of myogenin cooperates with two transcription activation domains to induce muscle-specific transcription.
Mol. Cell Biol. **1992**; 12: 266-75.

Schweitzer B, Roberts S, Grimwade B, Shao W, Wang M, Fu Q, Shu Q, Laroche I, Zhou Z, Tchernev VT, Christiansen J, Velleca M, Kingsmore SF.

Multiplexed protein profiling on microarrays by rolling-circle amplification.
Nat. Biotechnol. **2002**; 20: 359-65.

Schwonbeck S, Krause-Griep A, Gajovic-Eichelmann N, Ehrentreich-Förster, Meinel W, Glatt H, Bier FF

Cohort analysis of a single nucleotide polymorphism on DNA chips.
Biosens. Bioelectron. **2004**; 20: 956-66

Seeger C, Batz HG, Ørum H

PNA-mediated purification of PCR amplifiable human genomic DNA from whole blood.
Biotechniques **1997**; 23: 512-7

Seeman NC

DNA in material world.
Nature **2003**; 421: 427-31

Shadel GS, Clayton DA

Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates.
Annu. Rev. Biochem. **1997**; 66: 409-35

Shavitt O, Livneh Z

Rolling-circle replication of UV-irradiated duplex DNA in the Φ X174 replicative-form→single-strand replication system in vitro.
J. Bact. **1989**; 171: 3530-38

Shih WM, Quispe JD, Joyce GF

A 1.7-kilobase single-stranded DNA that folds into a nanoscale octahedron.
Nature **2004**; 427: 618-621

Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y

Extraction, purification and properties of Aequorin a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*.
J. Cell. Comp. Physiol. **1962**; 59: 223-39

Silzel JW, Cercek B, Dodson C, Tsay T, Obremski RJ

Mass-sensing, multianalyte microarray immunoassay with imaging detection.
Clin. Chem. **1998**; 44: 2036-43.

Sokol DL, Zhang X, Lu P, Gewirtz AM

Real time detection of DNA.RNA hybridization in living cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. **1998**; 95: 11538-43

Sosnowski RG, Tu E, Butler WF, O'Connell J, Heller MJ

Rapid determination of single base mismatch mutations in DNA hybrids by direct electric field control.

Proc. Natl. Acad. Sci. **1997**; 94: 1119-23

Sousa R, Chung YJ, Rose JP, Wang BC

Crystal structure of bacteriophage T7 RNA polymerase at 3.3 Å resolution.

Nature **1993**; 346: 572-3

Southern EM

Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.

J. Mol. Biol. **1975**; 98: 503-17

Southern EM

Measurement of DNA length by gel electrophoresis.

Anal. Biochem. **1979**; 100: 319-23

Southern E, Mir K, Shchepinov M

Molecular interactions on microarrays.

Nat. Genet. **1999**; 21: 5-9

Steffen J, von Nickisch-Rosenegk M, Bier FF

In vitro transcription of a whole gene on a surface-coupled template.

Lab Chip **2005**; 5: 665-8

Strizhkov BN, Drobyshev AL, Mikhailovich VM, Mirzabekov AD

PCR amplification on microarray of gel-immobilized oligonucleotides: Detection of bacterial toxin- and drugresistant genes and their mutations.

Biotechniques **2000**; 29: 844-57

Studier FW

Bacteriophage T7.

Science **1972**; 176: 367-76

Studier FW, Dunn JJ

Organization and expression of bacteriophage T7 DNA.

Cold Spring Harb Symp Quant Biol. **1983**; 47: 2:999-1007

Studier FW, Moffatt BA

Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes.

J. Mol. Biol. **1986**; 189: 113-30

Taylor SM, Jones PA

Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine.

Cell **1979**; 17: 771-9

Taylor S, Smith S, Windle B, Guiseppi-Elie A

Impact of surface chemistry and blocking strategies on DNA microarrays.

Nucleic Acids Res. **2003**; 31: e87.

Tillib SV, Strizhkov BN, Mirzabekov AD

Integration of multiple PCR amplifications and DNA mutation analyses by using oligonucleotide microchip.

Anal. Biochem. **2001**; 292: 155-60

Tindall KR, Kunkel TA

Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase.
Biochemistry **1988**; 27: 6008-13.

Toegl A, Kirchner R, Gauer C, Wixforth A

Enhancing results of microarray hybridizations through microagitation.
J. Biomol. Tech. **2003**; 14: 197-204.

Tournamille C, Colin Y, Cartron JP, Le Van Kim C

Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals.
Nat. Genet. **1995**; 10: 224

Tournamille C, Le Van Kim C, GaneP, Blanchard D, Proudfoot AE, Cartron JP, Colin Y

Close association of the first and fourth extracellular domains of the Duffy antigen/receptor for chemokines by a disulfide bond is required for ligand binding.
J. Biol. Chem. **1997**; 272: 16274-80

Tse Y, Wang JC

E. coli and *M. luteus* DNA topoisomerase I can catalyze catenation of decatenation of double-stranded DNA rings.
Cell **1980**; 22: 269-76

Tsien RY

The green fluorescent protein.
Annu. Rev. Biochem. **1998**; 67: 509-44

Tyagi S, Kramer FR

Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization.
Nat. Biotechnol. **1996**; 14: 303-8

Újvári A und Martin CT

Evidence for DNA bending at the T7 RNA polymerase promoter.
J. Mol. Biol. **2000**; 295:1173-85

Villemain J, Guajardo R, Sousa R

Role of open complex instability in kinetic promoter selection by bacteriophage T7 RNA polymerase.
J. Mol. Biol. **1997**; 273: 958-77

Van Gelder RN, von Zastrow ME, Yool A, Dement WC, Barchas JD, Eberwine JH

Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. **1990**; 87: 1663-67

Violeta GT, Swaisgood HE

Analysis and optimization of methods using watersoluble carbodiimide for immobilization of biochemicals to porous glass.
Bioengineering **1982**; 24: 1069-1080

von Nickisch-Rosenegk M, Marschan X, Andresen D, Abraham A, Heise C, Bier FF

On-Chip PCR amplification of very long templates using immobilized primers on glassy surfaces.
Biosens. Bioelectron. **2005a**; 20: 1491-98

- von Nickisch-Roseneck M, Ehrentreich-Förster E, Strehlow R, Christmann A, Bier FF**
Chemically synthesized zinc finger molecules as nano-addressable probes for double-stranded DNAs.
J. Nanobiotechnology. **2005b**; 3: 5.
- Washizu M, Kurosawa O**
Electrostatic manipulations of DNA in microfabricated structures.
IEEE Trans. Ind. Applic. **1990**; 26: 1165-72
- Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M**
Rekombinierte DNA.
2. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl. **1993**
- Williamson R, Morrison M, Lanyon G, Eason R, Paul J**
Properties of mouse globin messenger ribonucleic acid and its preparation in milligram quantities.
Biochemistry **1971**; 10: 3014-21
- Weng S, Gu K, Hammond PW, Lohse G, Rise C, Wagner RW, Wright MC, Kuimelis RG**
Generating addressable protein microarrays with PROfusion covalent mRNA-protein fusion technology.
Proteomics **2002**; 2: 48-57
- Woolley AT, Mathies RA**
Ultra-high-speed DNA fragment separations using microfabricated capillary array electrophoresis chips.
Proc. Natl. Acad. Sci. **1994**; 91: 11348-52
- Woolley AT, Hadley D, Landre P, deMello AJ, Mathies RA, Northrup MA**
Functional integration of PCR amplification and capillary electrophoresis in a microfabricated DNA analysis device.
Anal. Chem. **1996**; 68: 4081-86
- Wright WE, Sassoon DA, Lin VK**
Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD.
Cell **1989**; 56: 607-17
- Xin W, Zhang Y-M, Xiao J-H, Huang D-W**
Construction of linear functional expression elements with DNA fragments created by site-specific DNA nickase, N.Bpu10 I, and exonuclease III.
Biotechnol. Lett. **2003**; 25: 1913-6.
- Yang F, Moss LG, Phillips GN**
The molecular structure of green fluorescent protein.
Nat. Biotechnol. **1996**; 14: 1246-51
- Yeh E, Gustafson K, Boulianne GL**
Green fluorescent protein as a vital marker and reporter of gene expression in *Drosophila*.
Proc. Natl. Acad. Sci. **1995**; 92: 7036-40
- Yin H, Landick R, Gelles J**
Tethered particle motion method for studying transcript elongation by a single RNA polymerase molecule.
Biophys. J. **1994**; 67: 2468-78

- Ying-Hao S, Qing Y, Lin-Hui W, Li G, Rong T, Kang Y, Chuan-Liang X, Song-Xi Q, Yao L, Yi X, Yu-Ming M**
Monitoring gene expression profile changes in bladder transitional cell carcinoma using DNA microarray.
Urol Oncol. **2002**; 7: 207-12.
- Zammatteo N, Jeanmart L, Hamels S, Courtois S, Louette P, Hevesi L, Remacle J**
Comparison between different strategies of covalent attachment of DNA to glass surfaces to build DNA microarrays.
Anal. Biochem. **2000**; 280: 143-50
- Zhang S, Seeman NC**
Symmetric Holliday junction crossover isomers.
J. Mol. Biol. **1994**; 238: 658-68
- Zheleznaya LA, Perevyazova TA, Zheleznyakova EN, Matvienko NI,**
Some properties of site-Specific nickase BspD6I and the possibility of its use in hybridization analysis of DNA.
Biochem. (Moscow) **2002**; 67: 498-502
- Zhou J, Olson EN**
Dimerization through the helix-loop-helix motif enhances phosphorylation of the transcription activation domains of myogenin.
Mol. Cell. Biol. **1994**; 14: 6232-43
- Ziauddin J, Sabatini DM**
Microarrays of cells expressing defined cDNAs.
Nature **2001**; 411: 107-10

Verwendete lineare Transkriptionsmatrizen

PCR-Produkt	Bezeichnung	Gesamtgröße	5'-Phosphat
P-T7PromRBSEGFPolyT	P-T7PromEGFP	794 bp	Vor dem Promotor
T7PromRBSEGFPolyT-P	EGFPolyT-P	794 bp	Nach dem Promotor
T7PromEGFPT7Term	T7TermEGFP	1.002 bp	Vor Promotor
T7PromDFYT7Term	T7TermDFY	1.299 bp	Vor Promotor
T7PromMyoT7Term	T7TermMyo	957 bp	Vor Promotor

pET-3a-d Vectors

TB026 12/98

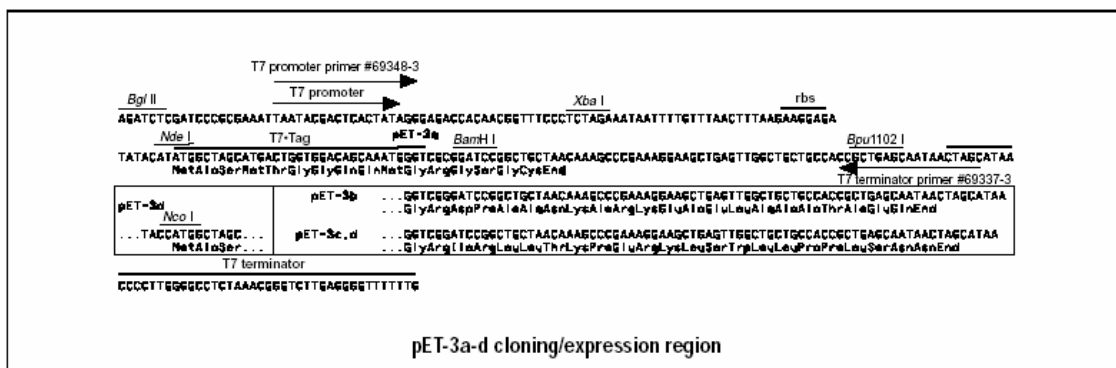
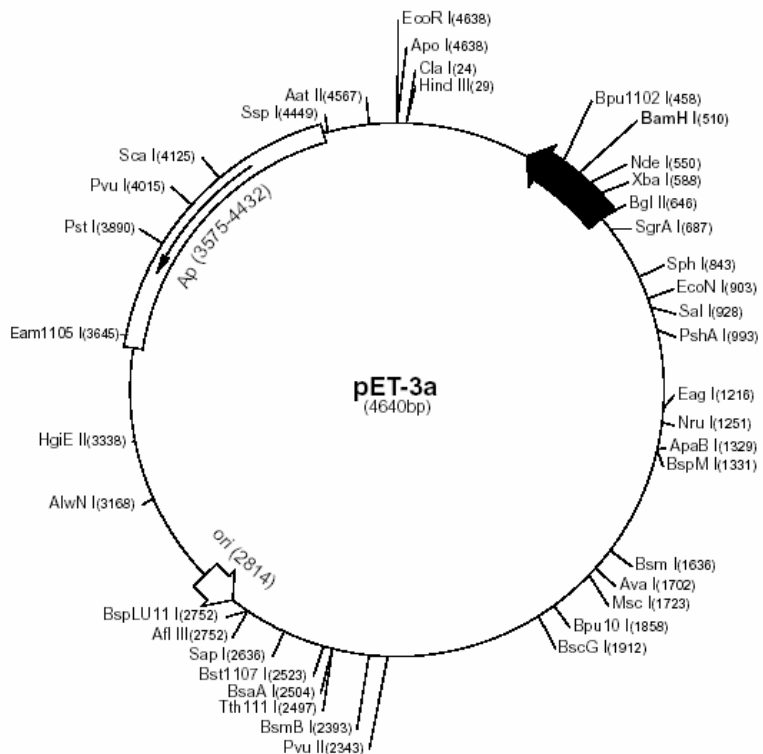
	Cat. No.
pET-3a DNA	69418-3
pET-3b DNA	69419-3
pET-3c DNA	69420-3
pET-3d DNA	69421-3

The pET-3a-d vectors carry an N-terminal T7*Tag[®] sequence and *Bam*H I cloning site. These vectors are the precursors to many pET family vectors; the pET-23a-d(+) series corresponds to pET-3a-d but incorporates several additional features. Unique sites are shown on the circle map. Note that the sequence is numbered by the pBR322 convention, so the T7 expression region is reversed on the circular map. The cloning/expression region of the coding strand region by T7 RNA polymerase is shown below.

pET-3a sequence landmarks

T7 promoter	615-631
T7 transcription start	614
T7*Tag coding sequence	519-551
T7 terminator	404-450
pBR322 origin	2814
<i>bla</i> coding sequence	3575-4432

The maps for pET-3b, pET-3c and pET-3d are the same as pET-3a (shown) with the following exceptions: pET-3b is a 4639bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 510. pET-3c is a 4638bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond *Bam*H I at 510. pET-3d is a 4637bp plasmid; the *Bam*H I site is in the same reading frame as in pET-3c. An *Nco*I site is substituted for the *Nde*I site with a net 1bp deletion at position 550 of pET-3c. As a result, *Nco*I cuts pET-3d at 546. For the rest of the sites, subtract 3bp from each site beyond position 551 in pET-3a. *Nde*I does not cut pET-3d.



7.1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APTES	3-Aminopropyl-trietoxysilan
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP/NBT-Lösung	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/Nitroblue-Tetrazolium
BSA	<i>bovines serum albumine</i> (Kälberserum)
Bp	Basenpaare
c	Konzentration
C2C12	Maus-Myoblasten (Muskelzellen)
cDNA	complementary DNA
Cy3	Indocarbocyanin
Cy5	Indodicarbocyanin
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DEPC	Diethylcarbonat
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDC	1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)-propyl]-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetra-Acetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EST	expressed sequencing tag
em	Emission
ex	<i>extinction</i> (Anregung)
FAM	Fluoreszenzfarbstoff: Fluorescein-Addition-Monomer
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	Hydroxyethylpiperazinoethansulfonsäure
His	Histidin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton

LB	Luria Bertani
LSM	Laser Scanning Mikroskop
MCS	<i>multiple cloning site</i>
M-MLV	<i>moloney murine leukemia virus</i>
min	Minute
mRNA	messenger RNA
NC	Nitrocellulosemembran
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
ori	<i>origin of replication</i>
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: Polymerase Chain Reaction)
mRNA	Messenger-RNA
rRNA	Ribosomale RNA
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
p	Plasmid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SSC	Saline-Sodium-Citrate-Puffer
s	Sekunde
SDS	sodium-dodecyl-sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-Page	sodium-dodecyl-sulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
ssDNA	einzelsträngige DNA
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris/EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TE	Tris-EDTA-Puffer
U	unit (Enzymeinheit)
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
W	Watt

7.2 **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Flussdiagramm der vernetzten Arbeitsabläufe mit Schwerpunkt Oberflächen-Transkription.	3
Abb. 2: Dreidimensionale Struktur des GFPs.	5
Abb. 3A: Schema der beiden bekannten Exonstrukturen E1 und E2 des menschlichen FY-Gens.	7
Abb. 3B: Das DARC-Protein als Translationsprodukt des FY-Gens.	7
Abb. 4: Hypothetische Modelle der Transkriptionsaktivierung vermittelt durch das Myogenin.	9
Abb. 5: Zweistufige Amplifikationsreaktion einer linearen Transkriptions- und Translationsmatrize.	12
Abb. 6: Schema des Plasmid-Repressor-Peptid-Komplexes.	16
Abb. 7: Aufbau einer Stammschleifen-Sonde (<i>molecular beacon</i>).	20
Abb. 8: Schemata der in dieser Arbeit verwendeten Gene.	46
Abb. 9: Konstruktionsschema zur Ligation und Klonierung einer Stamm-Struktur.	48
Abb. 10: Überblick über die Klonierungsprodukte ausgehend von dem Plasmid pX.	50
Abb. 11: Schematischer Aufbau der EGFP-Transkriptionsmatrize basierend auf der Amplifikation aus dem pEGFP-Plasmid.	51
Abb. 12: Amplifikation der EGFP-Gensequenz mit einem 5'-Phosphat-, 5'-NH ₂ C ₆ -, 5'-Biotin-markierten Rückwärtsprimer.	52
Abb. 13: Schema der möglichen Kopplungsrichtungen des EGFP-Transkriptionskonstrukts.	52
Abb. 14: Immunoblot der Bl21-Expression von Myogenin, DARC und EGFP.	53
Abb. 15: Immunoblot der <i>in vitro</i> Translationsreaktion der T7Term-PCR-Produkte Myogenin, FY und EGFP mit dem Qiagen EasyXpress Protein Synthesis Kit.	54
Abb. 16: Immunoblot zum Vergleich der <i>in vitro</i> Translation von EGFP mit dem Qiagen EasyXpress und dem <i>in-vitro</i> -PBS-Kit.	56
Abb. 17: Hybridisierung von <i>in vitro</i> transkribierter EGFP-RNA an eine Oberflächen-immobilisierte Sonde (EGFP _{rev}).	57
Abb. 18: Hybridisierung eines Haarnadelschleifen-Fragmentes an eine immobilisierte Sonde.	58
Abb. 19: Relaxion des Plasmids pX-n mittels Nickase-Verdau.	59
Abb. 20: Zeitlicher Verlauf des T7-Exonukleaseverdau von pX-n genickt.	60
Abb. 21: Hybridisierung eines Cy5-markierten Einzelstrangringes an eine immobilisierte Sonde.	62
Abb. 22: Konstruktionsschema zur Generierung eines Plasmidhybrids mit ausgeprägten Stammschleifen.	64
Abb. 23: Vergleich zweier silanisierter Oberflächen mit DEPC-Behandlung und Temperaturbehandlung (3h, 180° C) nach Betropfung mit phosphorylierten Oligonukleotiden.	66
Abb. 24: RT-PCR der OnChip-Transkription mit dem P-T7PromEGFP-PCR-Produkt.	67

Abb. 25: RT-PCR der OnChip-Transkription mit dem T7TermEGFP-PCR-Produkt.	68
Abb. 26: RT-PCR der Transkription von T7TermEPFP-PCR-Produkt gekoppelt auf N ₂ -sterilisierten, im Haus silanisierten Objektträgern.	69
Abb. 27: RT-PCR der OnChip-Transkription des T7TermEGFP-PCR-Produktes nach der Kopplung mit und ohne EDC.	70
Abb. 28: RT-PCR der OnChip-Transkription mit verschiedenen Syntheserichtungen.	71
Abb. 29: OnChip-PCR zur Amplifikation einer immobilisierten Transkriptionsmatrize für die EGFP-RNA-Synthese.	73
Abb. 30: Balkendiagramm zur Auswertung der OnChip-PCR-Experimente mit Hilfe der berechneten Kontrastwerte.	74
Abb. 31: Übersicht über die OnChip-PCR-Reaktionen bzw. die daraus generierten Reaktionsbereiche, die später für eine Oberflächen-Transkription dienen.	75
Abb. 32: RT-PCR der OnChip-Transkription von EGFP an Oberflächen-synthetisierten Transkriptionsmatrizen.	75
Abb. 33: RT-PCR der Oberflächen-Transkription mit geblockter und ungeblockter Oberfläche.	77
Abb. 34: RT-PCR der Oberflächen-Transkription von maschinell getropften PCR-Produkten.	78
Abb. 35: RT-PCR der Oberflächen-Transkription verschiedener getropfter PCR-Produkt-Konzentrationen.	79
Abb. 36: RT-PCR der Oberflächen-Transkription getropfter T7TermPCR-Produkt-Konzentrationen.	80
Abb. 37: Balkendiagramm zur Analyse der gekoppelten, Cy5-markierten T7TermEGFP-PCR-Produkt-Menge.	81
Abb. 38: RT-PCR der Oberflächen-Transkription mit T7TermEGFP-PCR-Produkt.	82
Abb. 39: Balkendiagramm zur Auswertung der OnChip-PCR-Produkt-Menge mit Hilfe einer Cy3-Kalibrierkurve.	82
Abb. 40: RT-PCR der OnChip-Transkription mit zwei Wiederholungen und unterschiedlichen Matrizenmengen.	84
Abb. 41: Balkendiagramm zur Wiederverwendbarkeit von Oberflächen gebundenem PCR-Produkt.	85
Abb. 42: RT-PCR der OnChip-Transkription mit zwei Wiederholungen.	85
Abb. 43: Duplex-PCR der RNA sowie der umgeschriebenen cDNA einer Duplex-Transkription.	86
Abb. 44: RT-PCR der Triplex-OnChip-Transkription.	87
Abb. 45: Immunoblot zum Nachweis von Oberflächen-translatierten EGFP.	89
Abb. 46: Immunoblot zum Nachweis der zweiten Oberflächen-Translation von EGFP mit einem Array.	90
Abb. 47: RT-PCR der OnChip-Transkription mit einer Wiederholung.	91
Abb. 48: Immunoblot der OnChip-Translation unter verschiedenen Versuchsbedingungen.	92

Danksagung

Prof. Dr. Frank F. Bier möchte ich danken für die Möglichkeit, in seiner interdisziplinären Abteilung eine Doktorarbeit absolvieren zu können sowie für die stets freundliche Unterstützung und die guten fachlichen Ratschläge.

Dr. Markus von Nickisch-Rosenegk danke ich, dass er mir die technologische Seite der Wissenschaft schmackhaft gemacht hat und mich in seine Arbeitsgruppe geholt hat.

Ich bedanke mich auch bei Dr. Eva Ehrentreich-Förster, die mir in vielen schwierigen Zeiten mit ihrer ruhigen und sachlichen Art geholfen hat, nicht das Ziel aus den Augen zu verlieren und für die Unterstützung bei allen organisatorischen und rhetorischen Problemen.

Bei allen Mitarbeitern der FhG-Abteilung Molekulare Bioanalytik & Bioelektronik bedanke ich mich, dass ich trotz meiner schwierigen Erkrankung die volle Unterstützung erhalten hab und für das tolle Zusammengehörigkeitsgefühl in unserer „Rotte“. Mein besonderer Dank gilt dabei den Damen vom Spotter Edda, Michaela und Dirk.

Ich bedanke mich bei Peter M. Schmidt für die abwechslungsreichen und sehr produktiven Stunden an seinem geliebten Gitterkoppler und auch bei Christian Heise, der vor allem bei den ungeliebten chemischen Fragen immer eine Antwort wußte.

Nie vergessen werde ich das Projekt Buchner, mit dem meine treue Promotionsleidensgenossin Xenia Marschan und ich zur geistigen Hochform aufgelaufen sind. Ich hoffe, dass du gesund und munter wiederkommst Xenia.

Besonders danke ich an dieser Stelle Mandy, die mit mir schon seit meines Biologiestudiums bis einschließlich heute den Labor- und Freundschaftsalltag teilt und deren Zuhause und auch immer mein Zuhause sein durfte (hoffentlich auch weiterhin).

An dieser Stelle möchte ich auch Sascha danken, der mich in meiner Leidenszeit von Doktorarbeit und Krankheit immer unterstützt und dabei mitgelitten hat.

Zum Schluss gilt mein größter Dank meiner Familie, dafür, dass sie immer an mich geglaubt und mich unterstützt hat. „Tante“ Gitti danke ich herzlichst für das erlaubte Ausleben meiner Passion für ihre Hasen, die meinen Werdegang als Biologin bereits in den Kinderschuhen geebnet hat und meinem Schatz Ingo für die schönsten Stunden und die nicht nur im Vogtland.