

Synthese von supramolekularen Nucleinsäure-Protein-Nanostrukturen

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
an der Fakultät für Chemie und chemischer Biologie
der Technischen Universität Dortmund

Vorgelegt von
Holger Schmitte

Dortmund, 23. August 2013

Referent: Prof. Dr. Christof M. Niemeyer
Koreferentin: PD Dr. Susanne Brakmann

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Oktober 2013

Eidesstattliche Erklärung:

dipl.chem. Holger Schmitte

Matrikelnr.: 092053

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erbracht habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht.

Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keine Prüfungsbehörde vorgelegen.

Ort, Datum

Unterschrift

“Kites rise highest against the wind, not with it.”

Winston Churchill

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Christof M. Niemeyer für die Begleitung und Unterstützung meiner Doktorarbeit und für die interessante und breitgefächerte Themenstellung, die das Kennenlernen vieler Messmethoden und Themengebiete ermöglichte. Ergänzend möchte ich mich für die Möglichkeit zur selbstständigen wissenschaftlichen Arbeit, für das entgegengebrachte Vertrauen und die finanzielle Unterstützung bedanken.

Ich danke auch Frau PD Dr. Susanne Brakmann für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Besonders erwähnen möchte ich die Zusammenarbeit mit Thomas Kampe, da die Arbeit an der Seite eines Freundes jeden Tag aufs Neue motiviert.

Dr. Giuseppe Arrabito, Dr. Michael Erkelenz, Joachim Müller, Dr. Stephanie Reisewitz, Dr. Barbara Sacca, Dr. Kathrin Schröder und Dr. Katrin Vogel möchte ich für die stete Diskussionsbereitschaft und die herzliche und entspannte Arbeitsatmosphäre danken.

Mein intensiver Dank gilt den ehemaligen Mitglieder der Arbeitsgruppe Niemeyer, Dr. Sabine Borgmann, Dr. Ljiljana Fruk, Dr. Maximilian Glettenberg, Dr. Rebecca Meyer, Dr. Kersten Rabe und Dr. Mark Spengler, die mir im Laufe meiner Arbeit durch Rat und in umfangreichen wissenschaftlichen Diskussionen eine große Hilfe waren.

Weiterhin möchte ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Biologisch-Chemische Mikrostrukturtechnik für die kreative und herzliche Arbeitsatmosphäre danken.

Mein größter Dank gilt meiner Frau Lia, deren Liebe und Vertrauen mir auch in Zeiten erfolgloser Experimente die Kraft gegeben hat weiterzumachen und mit der ich auch fern des Labors die Möglichkeit für wissenschaftliche Diskussionen hatte.

Tiefste Dankbarkeit verbindet mich mit meiner Familie ohne deren Unterstützung und Zuwendung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1	-
1.1	DNA-Protein-Konjugate als Bausteine zu Herstellung biomolekularer Nanostrukturen	2	-
1.1.1	Methoden für die DNA-Protein-Konjugation.....	9	-
1.1.2	Streptavidin.....	13	-
1.2	Feld-Fluss-Fraktionierung	17	-
1.3	Zielsetzung	20	-
2	Ergebnisse und Diskussion	23	-
2.1	DNA-STV-Konjugatsynthesen	23	-
2.1.1	Konjugatsynthesen unter Verwendung unterschiedlicher STV-Mutanten	23	-
2.1.1.1	<i>DNA-nSTV</i>	24	-
2.1.1.2	<i>DNA-nSTV-SH</i>	33	-
2.1.1.3	<i>DNA-STV-TCH</i>	38	-
2.1.1.4	<i>DNA-mSTV</i>	45	-
2.1.2	DNA-mSTV Konjugatsynthesen unter Verwendung unterschiedlicher heterobispezifischer Crosslinker	49	-
2.1.2.1	<i>sSMPB</i>	52	-
2.1.2.2	<i>sSIAB</i>	52	-
2.1.2.3	<i>PEG₄-SPDP</i>	53	-
2.1.2.4	<i>SM(PEG)₄</i>	55	-
2.1.2.5	<i>Vergleich der verwendeten Linkersysteme</i>	59	-
2.1.3	Abtrennung von Konjugatdimeren nach der DNA-mSTV-Konjugatsynthese	63	-
2.1.3.1	<i>Aufreinigung durch Flüssigchromatographie</i>	63	-
2.1.3.2	<i>Aufreinigung durch präparative Asymmetrischer-Fluss-Feldflussfraktionierung</i>	68	-
2.1.4	Charakterisierung der Bildung von Konjugatdimeren und -oligomeren bei der DNA-STV Konjugatsynthese	73	-

2.1.4.1	<i>Charakterisierung der kovalenten DNA-nSTV-Konjugate</i>	- 73 -
2.1.4.2	<i>Vergleich der Dimerisierung bei den verwendeten STV-Mutanten</i>	- 79 -
2.1.4.3	<i>Einfluss der Oligonucleotidsequenz auf die Bildung von Konjugatdimeren</i>	- 81 -
2.1.4.4	<i>Einfluss der DNA-STV-Konjugat Lagerung auf die Bildung von Konjugatdimeren</i>	- 81 -
2.1.4.5	<i>Einfluss freier Maleinsäureimide auf die Bildung von Konjugatdimeren</i>	- 83 -
2.1.4.6	<i>Einfluss des heterobispezifischen Crosslinkers auf die Bildung von Konjugatdimeren</i>	- 84 -
2.1.4.7	<i>Fazit zur Bildung von Konjugatdimeren und -oligomeren bei der DNA-STV-Konjugatsynthese</i>	- 89 -
2.2	Assemblierung von supramolekularen DNA-STV-Nanostrukturen	- 90 -
2.2.1	Assemblierung der DNA- STV-Hantel 39 und -Doppelhantel 40.....	- 92 -
2.2.2	Assemblierung der DNA-mSTV-Hantel 38.....	- 94 -
2.2.3	Assemblierung der DNA-mSTV-Doppelhantel 1	- 101 -
2.2.4	Assemblierung der DNA-mSTV-Doppelhantel 2	- 104 -
2.2.5	Assemblierung der DNA-mSTV-Y-Tripelhantel 3	- 106 -
2.2.6	Einfluss von Furchen-Bindern auf die Nanostruktur Assemblierung.....	- 109 -
2.2.7	Assemblierung der Y-DNA-Motiv-DNA-mSTV-Nanostruktur 49.....	- 112 -
2.2.8	Assemblierung der Nanostruktur 4 auf Basis von trivalentem STV	- 117 -
2.3	DNA-mSTV-Hanteln 75 und 77 mit längeren DNA-Abstandshaltern	- 129 -
2.4	DNA-Fluoreszenzprotein Konjugate	- 134 -
2.4.1	DNA-FP-Konjugatsynthese	- 134 -
2.4.2	Charakterisierung der DNA-FP-Konjugate und daraus assemblierter, fluoreszenter Nanohanteln.....	- 136 -
2.5	Nanopartikel-Protein Hybride als Plattform für SERRS	- 138 -
2.5.1	Funktionalisierung von Au-NP.....	- 140 -
2.5.1.1	<i>Citrat-stabilisierte Funktionalisierung</i>	- 141 -
2.5.1.2	<i>BSPP-stabilisierte Funktionalisierung</i>	- 142 -

2.5.2	Aggregationsverhalten der funktionalisierten NP.....	- 144 -
2.5.2.1	<i>Rotverschiebung der Oberflächenplasmonen Bande.....</i>	- 144 -
2.5.2.2	<i>Schmelzkurven</i>	- 146 -
2.5.2.3	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	- 148 -
2.5.2.4	<i>Dynamische Lichtstreuung</i>	- 149 -
2.5.2.5	<i>Transmissionselektronenmikroskopie.....</i>	- 151 -
2.5.3	Assemblierung des Gesamtsystems	- 152 -
3	Zusammenfassung und Ausblick	- 157 -
4	Materialien und Methoden.....	- 160 -
4.1	Chemikalien und Puffer.....	- 160 -
4.1.1	Pufferrezepte	- 161 -
4.1.2	Proteine	- 164 -
4.1.3	Oligonucleotide.....	- 164 -
4.2	Verbrauchsmaterialien	- 165 -
4.3	Instrumentierung.....	- 166 -
4.3.1	Chromatographie.....	- 167 -
4.3.2	Asymmetrischen-Feld-Flussfeldfraktionierung.....	- 167 -
4.3.3	Elektrophorese	- 168 -
4.3.4	Spektroskopie.....	- 168 -
4.3.5	DLS	- 168 -
4.3.6	AFM.....	- 168 -
4.3.7	TEM	- 169 -
4.4	Sonstige Geräte und Hilfsmittel	- 169 -
4.5	Software.....	- 169 -
4.6	Gelelektrophoretische Techniken.....	- 169 -
4.6.1	Polyacrylamidgele	- 170 -
4.6.1.1	<i>Nicht denaturierende Polyacrylamidgele (ndPAGE).....</i>	- 170 -
4.6.1.2	<i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....</i>	- 171 -
4.6.1.3	<i>Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (dPAGE).....</i>	- 172 -
4.6.2	Agarose Gele.....	- 172 -
4.6.3	Anfärben von Gelen	- 173 -

4.6.3.1	<i>SybrGold-Färbung</i>	- 173 -
4.6.3.2	<i>Silber-Färbung</i>	- 173 -
4.6.3.3	<i>Coomassie-Färbung</i>	- 174 -
4.6.3.4	<i>Ethidiumbromid-Färbung</i>	- 174 -
4.7	Versuchsvorschriften	- 174 -
4.7.1	Allgemeinen Methoden und Techniken	- 174 -
4.7.1.1	<i>Gelfiltration über NAP-Säulen</i>	- 174 -
4.7.1.2	<i>Umpuffern und Aufkonzentrieren</i>	- 175 -
4.7.1.3	<i>Spektroskopische Quantifizierung</i>	- 176 -
4.7.1.4	<i>Allgemeine Arbeitsschritte bei der Asymmetrischen-Feld- Flussfeldfraktionierung</i>	- 178 -
4.7.1.5	<i>Entwicklung eines Flussprofils für die Asymmetrischen- Feld-Flussfeldfraktionierung</i>	- 179 -
4.7.1.6	<i>Analytische Asymmetrische-Fluss-Feldflussfraktionierung</i>	- 181 -
4.7.1.7	<i>Präparative Asymmetrische-Fluss-Feldflussfraktionierung</i>	- 181 -
4.8	DNA-STV-Konjugatsynthese	- 182 -
4.8.1	DNA-nSTV-Konjugatsynthese	- 183 -
4.8.2	DNA-nSTV-SH-Konjugatsynthese	- 184 -
4.8.3	DNA-STV-TCH-Konjugatsynthese	- 185 -
4.8.4	DNA-mSTV-Konjugatsynthese	- 185 -
4.8.4.1	<i>Konjugatsynthese mit sSMPB</i>	- 187 -
4.8.4.2	<i>Konjugatsynthese mit sSIAB</i>	- 187 -
4.8.4.3	<i>Konjugatsynthese mit PEG₄-SPDP</i>	- 187 -
4.8.4.4	<i>Konjugatsynthese mit SM(PEG)₄</i>	- 188 -
4.9	Assemblierung von DNA-STV-Nanostrukturen	- 188 -
4.9.1	DNA-mSTV-Doppelhantel 1	- 189 -
4.9.2	DNA-mSTV-Doppelhantel: 2	- 189 -
4.9.3	DNA-mSTV-Y-Tripelhantel 3	- 190 -
4.9.4	Steigerung der Assemblierungseffizienz durch Furchen- Binder	- 190 -
4.10	Synthese von trivalentem STV 56	- 191 -
4.11	Synthese der DNA-mSTV-Hanteln 75 und 77 mit längeren DNA-Abstandshaltern	- 193 -
4.12	Synthese von fluoreszenten Nanohanteln	- 194 -
4.12.1	DNA-Fluoreszenzprotein-Konjugatsynthese	- 195 -

4.12.2	Assemblierung der DNA-FP-Nanohanteln	- 196 -
4.13	Herstellung von Nanopartikel-Protein Hybriden als Plattform für SERRS	- 196 -
4.13.1	DNA-Funktionalisierung von Au-NP	- 196 -
4.13.1.1	<i>Protokoll mit Citrat-stabilisierten NP</i>	<i>- 196 -</i>
4.13.1.2	<i>Protokoll mit BSPP stabilisierten NP</i>	<i>- 197 -</i>
4.13.2	Charakterisierung der DNA-modifizierten NP und darauf aufbauender Nanostrukturen	- 198 -
5	Literaturverzeichnis	- 202 -
6	Abkürzungsverzeichnis	- 212 -
7	Anhang	- 214 -
8	DNA-STV-Konjugate und -Nanostruktur Nomenklaturen	- 222 -

1 Einleitung

Die Natur ist Vorbild und Inspiration für den Aufbau von hochkomplexen Strukturen auf molekularer Ebene, in welchen Informationen gespeichert und spezifische Funktionen gelenkt werden.^[1-4] Die Verwendung von sich selbstorganisierenden Bausteinen für die Assemblierung von supramolekularen Strukturen ist ein wesentliches Bauprinzip biologischer Materialien, welche in verschiedenen Systemen von Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure (dsDNA) bis zu komplizierten Strukturen wie dem Tabakmosaikvirus zum Einsatz kommen.^[5-7] Bei der Betrachtung der selbstorganisierten Strukturen in einer Zelle (z.B. Lipidanordnungen, Faltung der Proteine, Proteinkomplexe, Proteinkaskaden und strukturierte Nucleinsäuren) oder des Aufbaus von Membranionenkanälen wird die Schlüsselrolle dieses Prozesses für biologische Systeme deutlich.^[8-9]

Bei der „Bottom-up-Konstruktion“ von nanoskaligen Objekten werden einzelne selbstorganisierende Bausteine zu supramolekularen Strukturen zusammengelagert, wodurch biologische Selbstassemblierungsprozesse nachgeahmt werden können.^[10] Die supramolekulare Chemie beschreibt hierbei das Gebiet der nichtkovalenten Wechselwirkungen zwischen molekularen Bausteinen.^[11] Unter Einsatz supramolekularer Prozesse werden mit biomimetischen „Bottom-up-Strategien“ aus biomolekularen Bausteinen (z.B. Proteine und Nucleinsäuren) künstliche Systeme in einer Größenordnung von 5-100 nm erzeugt.^[12] Das hieraus hervorgehende interdisziplinäre Forschungsgebiet wird häufig als Nanobiotechnologie bezeichnet.^[13-14] Dabei werden artifizielle Systeme mit neuartigen Funktionen unter Verwendung von natürlichen oder funktionalisierten Biomolekülen und biologisch inspirierten Materialien generiert. Das ideale selbstorganisierende Material für solche Anwendungen sollte durch eine einfache Synthese zugänglich sein, die gleichzeitig vielfältige Variationen erlaubt.^[15] Synthetische Oligonucleotide sind in der Nanobiotechnologie ein außerordentlich wichtiges Konstruktionsmaterial zum Aufbau von Nanostrukturen.^[16-18] DNA bietet den Vorteil der hochspezifischen Watson-Crick Basenpaarungen,^[19] welche das Design von künstlichen Rezeptoren mit vorhersagbaren Bindeeigenschaften zu komplementären Oligonucleotiden erlauben. Weiterhin bietet DNA die Vorteile der breitgefächerten und leichten Verfügbarkeit mittels der Phosphoramidit Festphasensynthese,^[20-21] hohe physikochemische Stabilität, hohe Rigidität von kurzen Doppelhelices und die natürliche Verfügbarkeit von DNA-modifizierenden Enzymen (z.B. Ligasen und Nucleasen).^[22] Die Konjugatsynthese von halbsynthetischen DNA-Protein-Konjugaten erlaubt die Kombination der einzigartigen Eigenschaften von DNA mit der annähernd unbegrenzten Auswahl von Proteinen, deren hochspezialisierte Funktionen während der gesamten Evolution optimiert wurden.^[23]

1.1 DNA-Protein-Konjugate als Bausteine zu Herstellung biomolekularer Nanostrukturen

Natürlich vorkommende, selbstorganisierende Strukturen leiteten das Design von biomimetischen Systemen aus biomolekularen Bausteinen ab.^[24-25] In der strukturellen Nanobiotechnologie werden DNA-modifizierte Biomolekül-Bausteine hochspezifisch zu nanometergroßen selbstorganisierenden Strukturen assembliert, deren Aufbau mittels der Kenntnisse über die Hybridisierung der Nucleinsäureketten sehr gut vorhergesagt und beeinflusst werden kann.^[26-27] Als erstes wurde die Verwendung von DNA als Konstruktionsmaterial zum Aufbau von Nanostrukturen von Seeman^[25] beschrieben und in der folgenden Zeit ständig weiterentwickelt.^[26,28-29] In weiteren Schritten wurden die strukturegebenden Eigenschaften von DNA mit den vielfältigen Funktionen von Proteinen durch die Konjugatsynthese von halbsynthetischen DNA-Protein-Konjugaten vereint.^[30-31]

Im Folgenden soll ihre Anwendung in der Bioanalytik betrachtet und anschließend ein Überblick von DNA-Protein-Konjugaten zur Herstellung von biomolekularen Nanostrukturen gegeben werden.

Im Anwendungsgebiet der Bioanalytik werden DNA-Protein-Konjugate als Sonden für die Nucleinsäure- und Proteindetektion eingesetzt. Basierend auf dem Aufbau aus zwei Makromolekülen eignen sich DNA-Protein-Konjugate für die Analyse von Proteinen als auch von Nucleinsäuren. In der Bioanalytik wurden die DNA-Protein-Konjugate in nicht radioaktiven Hybridisierungsassays eingesetzt, wobei die Nucleinsäure nachgewiesen und das Signal enzymatisch amplifiziert wurde (z. B. durch alkalische Phosphatase,^[32] Meerrettichperoxidase (HRP),^[33] β -Galactosidase,^[34] Lipase^[35] oder Esterase.^[36] Alternativ wurden Proteine hochempfindlich mittels eines DNA-Protein-Konjugats nachgewiesen. Die zuerst von Sano *et al.*^[37] beschriebene Technik wird als Immuno-PCR (IPCR)^[38-39] bezeichnet. Es handelt sich hierbei um eine Abwandlung des Standard-ELISA-Nachweisverfahrens (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), wobei abweichend zu ELISA bei der IPCR das Signal durch die Amplifikation der Nucleinsäure des DNA-Protein-Konjugats nahezu exponentiell verstärkt wurde.^[40] In einem verwandten Immunoassay von Landegren wurden zwei Oligonucleotide, welche an zwei unterschiedlichen Antikörpern befestigt waren, miteinander ligiert falls ein definiertes Zielprotein vorlag, das die beiden DNA-Antikörper-Konjugate in räumliche Nähe brachte. Ähnlich der IPCR konnte anschließend das Signal über PCR-Amplifikation des ligierten DNA-Moleküls verstärkt werden.^[41]

Ein weiteres Anwendungsfeld für DNA-Protein-Konjugate in der Bioanalytik sind Biochips. Ein wichtiger Vertreter in diesem Gebiet sind DNA-Microarrays. DNA-Microarrays bezeichnen die systematische Anordnung von biomolekularen Sonden, z.B. DNA-Protein-Konjugaten auf festen Oberflächen aus Glas, Metallen oder Kunststoffen. Basierend auf der hohen physikochemischen Stabilität und guten Verfügbarkeit von Nucleinsäuremolekülen werden DNA-Microarrays industriell hergestellt und finden vielfältige Anwendung in der Biomedizin- und Genomforschung.^[42] Als herausfordernd erwies sich die Herstellung von geeigneten Proteinen (wie Rezeptoren und regulatorischen Proteinen) für die Microarrays, da bei der direkten Immobilisierung auf chemisch-aktivierten Oberflächen die Proteine leicht denaturierten.^[43] Eine milde Alternative zur parallelen Positionierung von mehreren empfindlichen Proteinen erlaubte die DNA-vermittelte Immobilisierung (DDI).^[44] Wie in *Abbildung 1.1* gezeigt, ist die DDI eine effiziente Technik zur Immobilisierung von DNA-funktionalisierten Proteinen, Nanopartikeln (NP), artifiziellen Vesikeln und ganzen Zellen durch Hybridisierung an oberflächengebundene, komplementäre Oligonucleotide.

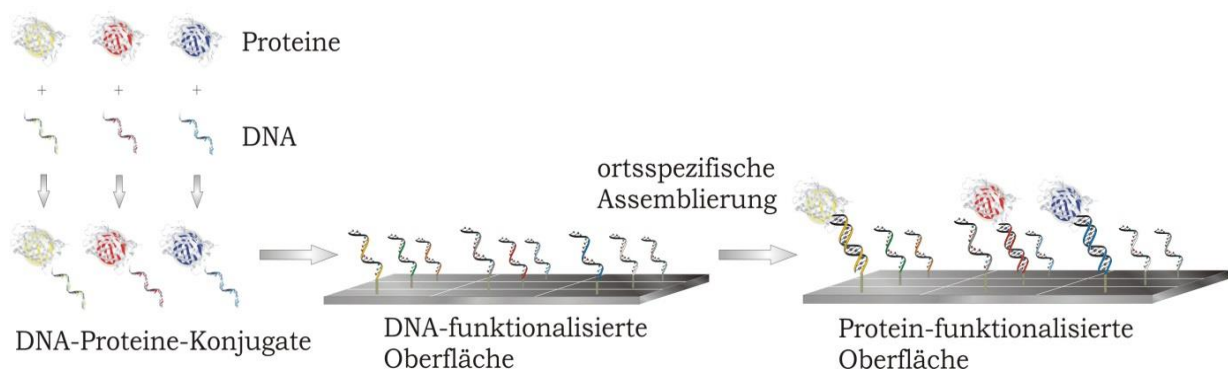


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der DNA-vermittelten Immobilisierung (DDI) von drei zuvor konjugierten DNA-Protein-Konjugaten auf einer DNA-funktionalisierten Oberfläche. ^[23]

Hierfür wurden die DNA-funktionalisierten Microarrays unmittelbar vor der Verwendung mit DNA-Protein-Konjugaten inkubiert, um diese anschließend als Biochip oder in einem Immunoassay einzusetzen.^[45-47] Ein weiterer Vorteil der DDI-basierten Microarrays gegenüber der heterogenen Immunsorption an Festphasen zeigte sich bei der Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen. Bei den DDI-basierenden Microarrays konnte die intermolekulare Bindung zwischen Antikörper und Zielantigen in Lösung erfolgen, wodurch diese wesentlich effizienter verlief. Die dabei gebildeten Immunokomplexe wurden dann mittels der DDI-Methode ortsspezifisch auf dem Microarray immobilisiert.^[48]

Das zweite wichtige Anwendungsgebiet von DNA-Protein-Konjugaten ist die Herstellung von biomolekularen Nanostrukturen. Im Kontext der vorgelegten Arbeit soll dieses Gebiet detaillierter betrachtet werden.

Direkten Einsatz finden DNA-Protein-Konjugate bei der statistischen Assemblierung von DNA-Streptavidin (STV)-Netzwerken. Hierfür wurde STV (für weitere Details siehe Kapitel 1.1.2) mit bis-biotinylierten dsDNA-Fragmenten assembliert.^[49] Dabei bildete sich ein Netzwerk aus statistisch über zwei dsDNA-Molekülen verbundenen STV-Molekülen (siehe *Abbildung 1.2* links). Das DNA-STV-Netzwerk ließ sich durch Erhitzen und rasches Abkühlen in definierte supramolekulare DNA-STV-Nanoringe umwandeln (siehe *Abbildung 1.2* Mitte bis rechts).^[50] Zudem ließen sich die DNA-Fragmente in diesem Netzwerk durch Ionen beeinflussen, was zur Entwicklung von schaltbaren Aggregaten aus Nanopartikeln führte (siehe *Abbildung 1.2* rechts).^[51]

Da mit drei oder vier dsDNA verknüpfte STV im Netzwerk selten zu finden waren, besaß die Nanostruktur eine verbliebene Biotin-Bindfähigkeit. Diese konnte für weitere Funktionalisierungen mit biotinylierten Komponenten verwendet werden. So wurden beispielsweise biotinylierte Antikörper im DNA-STV-Netzwerk immobilisiert und erlaubten dadurch eine sehr gute Plattform für die IPCR.^[40,52]

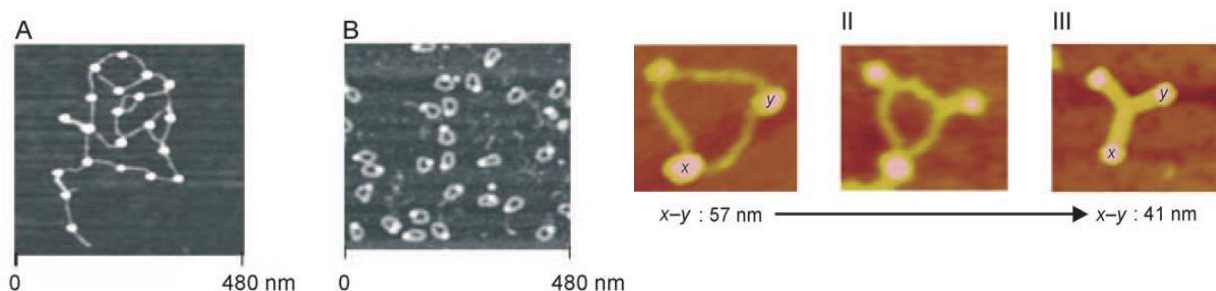


Abbildung 1.2: AFM-Bilder von statistisch assemblierten DNA-STV-Netzwerken, wobei eine dominierende zweifach DNA-Verbrückung von STV gut zu erkennen war (links); von supramolekulare DNA-STV-Nanoringen nach thermischer Behandlung des Netzwerkes (Mitte) und einem DNA₃-STV₃-Element unter steigender Ionenstärke, wobei der Abstand zwischen STV durch superhelicale Verdrillung der DNA sinkt (rechts).^[50-51]

Basierend auf den wegweisenden Arbeiten von Seeman^[25] wurden DNA-Überstrukturen mit definierten Strukturbereichen im nm-Größenordnungen etabliert.^[26,31] Diese rational entworfenen DNA-Nanostrukturen wurden mittels Einbindung von Proteinen um vielfältige Funktionen erweitert.

In den 90er Jahren wurden von der Arbeitsgruppe Niemeyer die ersten Konjugatsynthesen von linearen, eindimensionalen DNA-Protein-Konjugaten beschrieben.^[44,53] Diese Konjugate erfuhren anschließend breite Anwendung bei der Herstellung von Microarrays und Biochips mittels DDI.^[54] Zudem wurde die Konjugatsynthese auf PNA-Protein^[55] und Phosphorothioat-DNA-Protein-Konjugate^[56] ausgeweitet.

Das Design der Nanostrukturen wurde in die zweite Dimension erweitert und die DNA-Protein-Konjugate wurden beispielsweise in hantel- oder kreuzförmige Nanostrukturen mit einem ordnenden DNA-Gerüst angeordnet.^[57] Mit DNA-vermittelten Strukturen wurden ebenfalls dreidimensionale Nanostrukturen aufgebaut, welche ortsspezifisch mit Proteinen funktionalisiert wurden. Ein Beispiel dafür sind die von Zhang *et al.*^[58] beschriebenen STV-funktionalisierten DNA-Tetraeder, Oktaeder und Ikosaeder.

In 2003 beschrieben Yan *et al.*^[59] erstmalig die Modifikation eines zweidimensionalen DNA-Arrays mit Proteinen. Dabei wurde ein aus 4x4-DNA-Kacheln aufgebautes, zweidimensionales, Biotin-modifiziertes DNA-Gitter assembliert, welches anschließend mit STV modifiziert wurde. Nachdem das Konzept mit STV gezeigt wurde, erweiterten Yan *et al.* den Nanoarray auf den Bereich der Biosensorik. Dafür wurden auf ähnlichen DNA-Arrays Aptamermotive immobilisiert, wodurch selektiv Zielproteine gebunden werden konnten.^[60-62] In folgenden Ansätzen konnte die Gruppe von Yan ortsspezifisch DNA-Peptid-Konjugate auf DNA-Arrays immobilisieren und damit Wechselwirkungen zwischen Proteinen untersuchen.^[63]

Eine weitere Möglichkeit zum Aufbau eines Protein funktionalisierten DNA-Gerüsts bietet die von Rothemund^[64] beschriebene DNA-Origami-Methode. Mit der DNA-Origamitechnik wurden beispielsweise von Kuzuya *et al.*^[65] DNA-Nanofolien hergestellt, in deren definiert großen Vertiefungen an zwei Biotineinheiten STV immobilisiert wurde. In einem weiteren Beispiel wurden Oligohistidin-markierte Fluoreszenzproteine (FP) über eine in die Origamistruktur integrierte Nitrilotriessigsäure (NTA)-Gruppe immobilisiert.^[66] Ebenso wurde die ortsgerechte Immobilisierung von STV an ein Origamielement mit 24 biotinylierten Helfersträngen beschrieben.^[66] In 2010 wurde von Saccà *et al.*^[67] die orthogonale Funktionalisierung einer DNA-Origamistruktur mit drei Proteinen beschrieben. Dabei wurden das rote FP (mKate) mittels „Snap-Tag“, Cytochrom C Peroxidase (CCP) mittels „Halo-Tag“ und monovalentes Streptavidin (mSTV) mittels Biotin auf dem Origami immobilisiert.

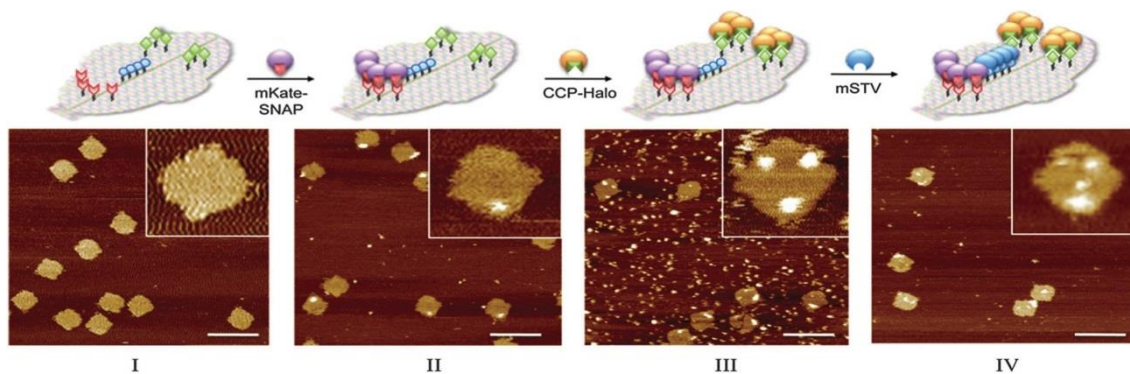


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung und AFM-Bilder des DNA-Origamis nach Saccà *et al.*^[67]; Die Origamistruktur (I) modifiziert mit Benzylguanin (rot), Chlorohexan (grün) und Biotin (blau) wurde schrittweise, orthogonal mit Proteinen funktionalisiert. Im ersten Schritt wurden mKate-Snap-Fusionsproteine (II), im zweiten Schritt CCP-Halo-Fusionsproteine (III) und im dritten Schritt mSTV (IV) immobilisiert.

Das Design von DNA-Protein-Nanostrukturen ermöglicht die ortsspezifische Immobilisierung von Proteinen an Strukturen in einer nm-Größenordnung. Dadurch ließen sich die Nanostrukturen auch zur Modellierung von Proteinfunktionen und -zugänglichkeit verwenden.

Turberfield *et al.* [68] beschrieben die Immobilisierung eines einzelnen CCP in einem tetraedrischen DNA-Käfig. Es wurde gezeigt, dass der Erfolg der Einkapselung des Proteins von seinem Verknüpfungspunkt entlang einer der Tetraederkanten abhängt.

Bei der Konjugatsynthese von DNA-Protein-Konjugaten mittels Kofaktor-Rekonstitution (siehe 1.1.1) zeigte sich die Veränderung der Enzymfunktion infolge der DNA-Kupplung. Die veränderten katalytischen Aktivitäten der Hybridmoleküle DNA-Myoglobin (Mb)^[69] oder DNA-HRP^[70] gegenüber nativen Enzymen zeigten den Einfluss der Konjugation mit Oligonucleotiden deutlich. Bei Mb wurde eine Steigerung der katalytischen Eigenschaften in Folge der direkten Nachbarschaft des sterisch anspruchsvollen und negativ geladenen Oligonucleotids beobachtet. Dabei zeigte sich ein Zusammenhang dieses Effekts mit der Oligonucleotidsequenz, was eine Einstellung der Eigenschaften des Hybridmoleküls ermöglichte.^[71] Zudem wurde Mb mit einem synthetischen Hämderivat rekonstituiert, welches ein Oligonucleotid und ein photoaktivierbares Ru³⁺ enthielt.^[72] Auf diese Weise konnte ein Hybridenzym mit lichtabhängiger Peroxidaseaktivität und spezifischer Nucleinsäurehybridisierung rekonstituiert werden.

Erkelenz *et al.*^[73] beschrieben die Herstellung einer hybriden DNA-Protein-Nanostruktur basierend auf den zwei Subdomänen von Cytochrom P450 BM3. Die Reduktase-Domäne BMR und die Porphyrin-Domäne BMP wurden mittels des „Halo-Tag“ mit Chloralkan-modifizierten Oligonucleotiden gekuppelt und anschließend wurde durch Hybridisieren von DNA-BMR und DNA-BMP an ein komplementäres Oligonucleotid das BM3 rekonstituiert. Wie in *Abbildung 1.4* gezeigt, konnte mittels des komplementären Träger-DNA-Oligonucleotids der Abstand zwischen den BM3-Subdomänen kontrolliert werden. Darüber hinaus konnte mittels DNA-Strangverdrängung die Enzymaktivität deaktiviert werden.

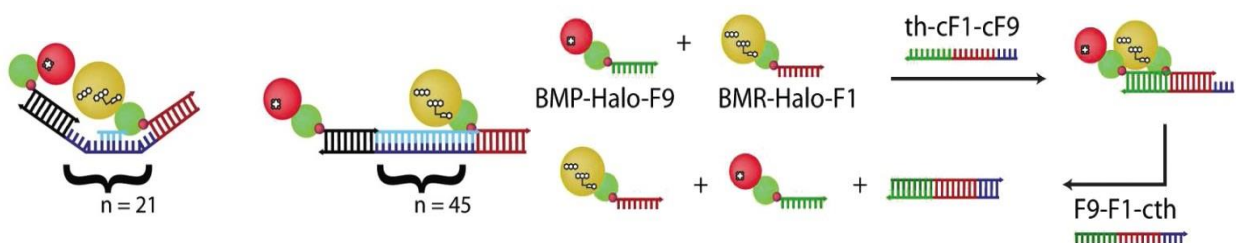


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung von Konfigurationen mit unterschiedlichem Abstand zwischen den Subdomänen BMP-Halo (rot-grün) und BMR-Halo (gelb-grün) im hybriden DNA-BM3 (links) und Deaktivierung des hybriden DNA-BM3 mittels DNA-Strangverdrängung.^[73]

Die DNA-vermittelte Organisation von Enzymen fand zudem Einsatz, um artifizielle Multienzymkonstrukte mit einem hohen Maß an Kontrolle über die räumliche Anordnung der Einzelkomponenten herzustellen. Das Design dieser Nanostrukturen ist von biologischen Systemen inspiriert, in denen katalytische Transformationen in direkt benachbarten Enzymen beschleunigt ablaufen. Ursache für die gesteigerte Enzymaktivität ist die Minimierung der Substratdiffusion im Multienzymkomplex, in welchem die Diffusion der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Ergänzend wird durch das so genannte „Substrat-Channeling von Intermediaten“ das Auftreten von unerwünschten Nebenreaktionen vermieden.

In anfänglichen Arbeiten wurden Multienzymkomplexe aus den Oligonucleotid-modifizierten Proteinen Luciferase und Oxidoreduktase aufgebaut.^[74] Dafür wurden die beiden Konjugate auf einem immobilisierten, komplementären Oligonucleotid zu einem Dienzymsystem vereint. Dabei konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Aktivität des Multienzymkomplexes sowohl von der absoluten als auch der relativen räumlichen Anordnung der beiden Enzyme abhängt. Unter Verwendung eines ähnlichen Nanostrukturaufbaus wurden DNA-HRP und DNA-Glucose-Oxidase (GOx) zu einem Dienzymsystem mit unterschiedlichen räumlichen Anordnungen der Proteine hybridisiert.^[75] Dabei zeigte sich in kinetischen Analysen der gekoppelten Reaktion von Glucoseoxidation und Peroxidation ein signifikanter Anstieg der Reaktivität des Enzymkomplexes in Folge der Minimierung des Abstandes zwischen den Träger-DNA immobilisierten Enzymen. Eine weitere Kaskadierung von HRP und GOx auf einem DNA-Origami wurde von Fu *et al.*^[76] beschrieben. Dabei wurden DNA-HRP und DNA-GOx auf einem DNA-Origami in einem Abstand von 10 nm, 20 nm, 45 nm oder 65 nm hybridisiert. Es konnte gezeigt werden, dass ein Anstieg der Enzymreaktivität im Dienzymsystem durch den lokalen Anstieg der H₂O₂-Konzentration und die reduzierte Diffusion des Intermediates aus dem Zwischenraum der Enzyme verursacht wurde.

Ein weiteres Anwendungsgebiet von DNA-Protein-Konjugaten ist die Funktionalisierung von Nanopartikeln. Hierfür werden die DNA-Protein-Konjugate zunehmend für die Modifizierung und Einführung von funktionellen Gruppen auf Partikeloberflächen verwendet. DNA-STV-Konjugate wurden zum Beispiel an biotinylierte Au-Cluster gebunden, wodurch diese hierarchisch in supramolekulare, bio-metallische Nanostrukturen organisiert wurden.^[53] Mittels DDI wurden DNA-Antikörper-Konjugate auf DNA-funktionalisierte Goldnanopartikel (Au-NP) immobilisiert, wodurch diese als Reagenzien für Immunoassays Verwendung fanden.^[77] Der Einsatz von DNA-funktionalisierten Au-NP erlaubte zudem die reversible Immobilisierung von DNA-Protein-Konjugaten mittels DDI in Kombination mit dem Konzept der Strangverdrängung.^[78] Wie in Abbildung 1.5 dargestellt, konnte das Konzept mittels der erfolgreichen Verdrängung von Konjugaten aus DNA und einem gelben Fluoreszenzprotein (FP) von den DNA-funktionalisierten Au-NP bestätigt werden. Dieser Nachweis konnte anhand der Fluoreszenzemission von EYFP verfolgt werden, da diese in Folge der Bindung an die Au-NP gelöscht wurde. Dieses Phänomen wurde für eine Vielzahl von DNA-FP von Lapiene *et al.* gezeigt.^[79]

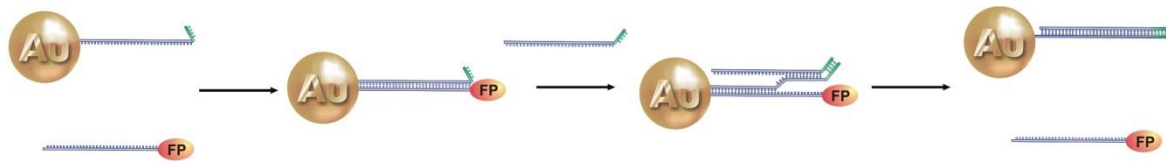


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Hybridisierung von DNA-FP-Konjugaten an DNA-funktionalisierten Au-NP. Die DNA-FP-Konjugaten werden im nächsten Schritt durch ein weiteres Oligonucleotid verdrängt. Infolge der Verdrängung wird die Fluoreszenzlöschung der Au-NP auf das DNA-FP-Konjugaten aufgehoben. Dadurch kann die Verdrängung anhand des Fluoreszenzanstiegs gemessen werden.^[78]

Hadorn *et al.*^[80-81] beschreiben die DNA-vermittelte Selbstassemblierung von künstlichen Vesikeln. Dabei wurden Vesikel mit biotinylierten Phosphorlipiden hergestellt, an welche DNA-STV-Konjugate gebunden wurden. Die DNA-STV-modifizierten Vesikel konnten erfolgreich mit komplementär modifizierten Vesikeln assembliert werden.

Ein weiteres Anwendungsgebiet für DNA-Protein-Konjugate wurde 2006 von Pei *et al.*^[82] beschrieben. Dabei wurde eine neue Strategie für die Molekülbewegung auf einer festen Oberfläche vorgeschlagen. Es wurden so genannte „polykatalytische Spinnenmoleküle“ aus STV und biotinylierten, katalytisch aktiven Nucleinsäureoligomeren aufgebaut. Die darin enthaltenen Desoxyribozyme zeigten eine Phosphodiesteraseaktivität, welche eine ungerichtete Wanderung der „polykatalytischen Spinnenmoleküle“ durch eine Oligonucleotidsubstrat-enthaltende Hydrogelmatrix erlaubte. Die Diffusion aus dem Gel heraus konnte vernachlässigt werden, wohingegen die in *Abbildung 1.6* gezeigte laterale Diffusion durch Variation der Erkennungseinheiten und der katalytischen „Beine“ gesteuert werden konnte. Die Autoren nehmen an, dass diese Strategie für die gezielte Wirkstofffreisetzung genutzt werden kann.

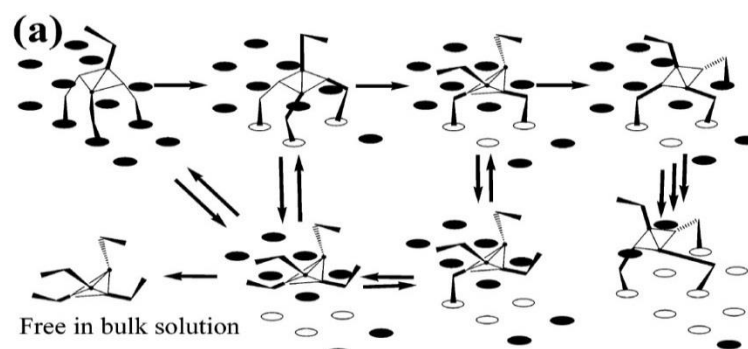


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Wanderung von „polykatalytischen Spinnenmolekülen“ durch eine Oligonucleotidsubstrat-enthaltende Hydrogelmatrix.^[82]

1.1.1 Methoden für die DNA-Protein-Konjugation

In der Literatur sind eine Vielzahl von chemischen Kupplungen für die Konjugatsynthese von synthetischen DNA-Oligomeren und -Proteinen beschrieben, welche auf kovalenten und nichtkovalenten Bindungen beruhen. Im Folgenden sind zunächst die wichtigsten Methoden zur nichtkovalenten Kupplung und anschließend zur kovalenten Kupplung beschrieben.

Das einfachste und gleichzeitig am häufigsten angewandte Verfahren zur Synthese von DNA-Protein-Konjugaten beruht auf der besonders effektiven Wechselwirkung von D-Biotin (Vitamin H; siehe *Abbildung 1.7*) mit Avidin und STV. Die Substratbindung ist in *Abbildung 1.7* gezeigt. Weitere Details sind in Kapitel 1.1.2 beschrieben.^[83]

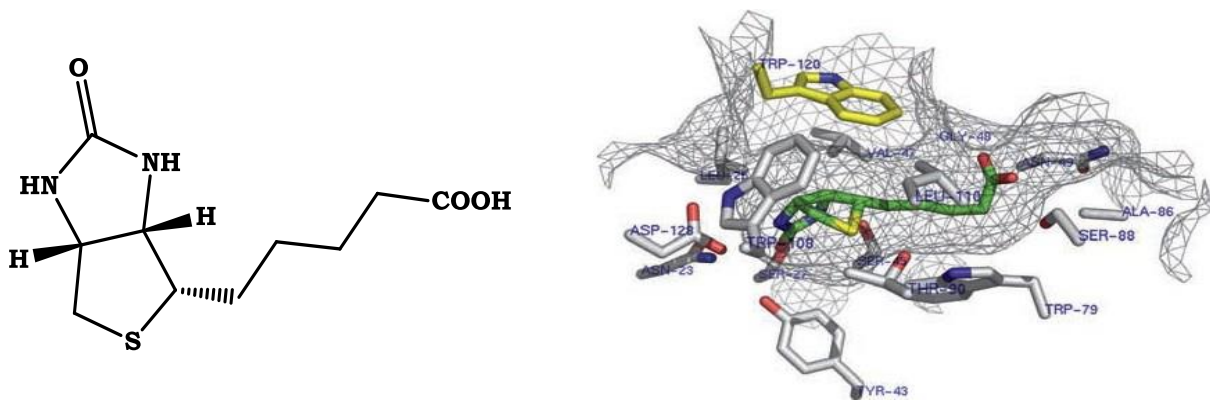


Abbildung 1.7: Chemische Struktur von D-Biotin (links); Das Profil der Biotinbindetasche in STV aus PDB 1mk5: als graues Gitter ist das Oberflächenprofil der Kavität, als graue und gelbe Stäbchenmodelle sind die wechselwirkenden STV-Aminosäuregruppen und als grünes Stäbchenmodell ist D-Biotin dargestellt.^[83]

Die außergewöhnlich hohe Affinitätskonstante dieser Wechselwirkung (ca. 10^{14} $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$) in Verbindung mit der hohen chemischen und thermischen Stabilität von STV erlaubt die breite Nutzung von DNA-STV-Konjugaten in der Nanobiotechnologie.^[84] Als Folge der breiten Anwendung sind eine Vielzahl von Biotinderivaten kommerziell erhältlich und eine große Auswahl an schonenden Biotinylierungsmethoden bereits beschrieben.^[85-86] Biotinylierte Oligonucleotide (bDNA) lassen sich mittels automatisierter Phosphoramidit-Festphasensynthese herstellen und sind kommerziell erhältlich. Wie in *Abbildung 1.8* gezeigt, führt die Mischung von bDNA mit einem chemisch oder gentechnisch mit (Strept-)Avidin gekuppelten Zielprotein (POI) unmittelbar zum DNA-POI Konjugat. Nachteil dieser Strategie ist die mangelnde Kontrolle der Stöchiometrie der mittels Biotin-Streptavidin-Kupplung hergestellten DNA-Protein-Konjugate, die den Aufbau von definierten Nanostrukturen erheblich erschwert.

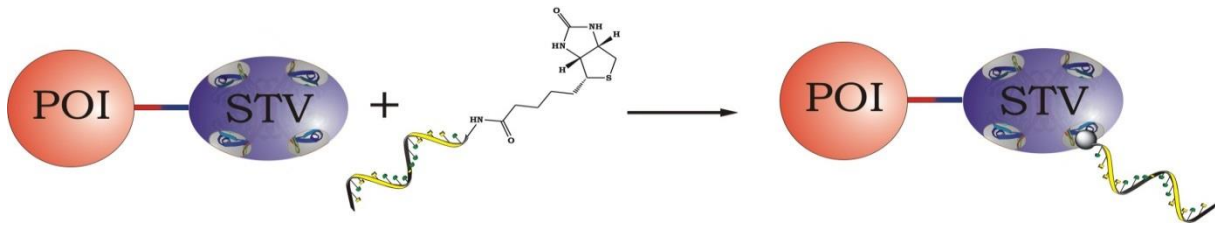


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung der DNA-Protein-Konjugatsynthese mittels der Biotin-Streptavidin-Kupplung.

Ein alternativer Ansatz zur nichtkovalenten Konjugation von DNA-Protein-Konjugaten basiert auf der spezifischen Wechselwirkung zwischen einem Oligohistidin-haltigen Peptid und einem Nickel(II)-Ion, welches durch Nitrilotriessigsäure (NTA) komplexiert ist.^[87] Dabei vermittelt das Nickel(II)-Ion zwischen NTA und einem POI mit einer Hexahistidinmarkierung (His₆-Tag). Goodman *et al.*^[88] zeigten mittels der Immobilisierung von His₆-markiertem grünem FP in verschiedenen Nanostrukturen die Anwendbarkeit dieser Methode in der Nanobiotechnologie.

Eine weitere Methode zur nichtkovalenten Konjugation von DNA-Protein-Konjugaten besteht in der Verwendung von Affinitätsmarkern, die durch die Nucleinsäure selbst gebildet werden. So genannte Aptamere sind Nucleinsäuresequenzen, welche dreidimensionale Strukturen aufbauen und dabei mit einer hohen Affinität an eine Zielstruktur binden können.^[89] Wie im Kapitel 1.1 beschrieben, wurden von Yan *et al.*^[60-61] bereits Aptamermotive für die selektive Proteinbindung auf rational entworfenen DNA-Nanoarrays verwendet.

Ein halbsynthetischer Ansatz wurde für die nichtkovalente Konjugation von DNA mit Enzymen, die einen nicht diffusionsfähigen Kofaktor enthalten, entwickelt. Typische Beispiel für solche prosthetischen Gruppen sind Porphyrin- und Flavinderivate. Diese Kofaktoren lassen sich häufig aus dem Protein entfernen, wodurch ein so genanntes Apoenzym entsteht. Das Apoenzym kann dann mit einem artifizialen Analogon des nativen Kofaktors rekonstituiert werden.^[90] Mittels dieser Methode kann ein Apoenzym mit einer chemisch an einen Kofaktor gekuppelten Nucleinsäure rekonstituiert werden und dadurch ein hybrides DNA-Enzym Konjugat hergestellt werden. Die erfolgreiche Herstellung solcher hybriden DNA-Enzym Konjugate wurde von Fruk *et al.* bei der Rekonstitution von Häm (Protoporphyrin IX) mit Apomyoglobin^[69] und Apomeerrettichperoxidase^[70] gezeigt.

Bei der kovalenten Konjugatsynthese werden DNA und Protein chemisch miteinander verknüpft.^[91] Damit lässt sich die Dissoziation nichtkovalenter, reversibler Wechselwirkungen vermeiden und die Charakterisierung der DNA-Protein-Konjugate wird vereinfacht. In ersten Ansätzen zur kovalenten Konjugatsynthese wurden DNA und Protein mittels homobifunktionellen Vernetzungsreagenzien wie Glutardialdehyd verknüpft.^[92] Hierfür wurden Sonden für Nucleinsäure-Hybridisierungsassays hergestellt, die jedoch nicht zu Konjugaten mit definierter Stöchiometrie führten.

Unter Verwendung von heterobispezifischen Crosslinkern wie Sulfosuccinimidyl-4-(N-Maleinsäure-imidomethyl) Cyclohexan-1-carboxylat (sSMCC), welche häufig eine Maleinsäureimidgruppe enthalten, lassen sich DNA und Protein irreversibel miteinander verknüpfen. Eine Auswahl von Strukturen und Reaktionsmechanismen von heterobispezifischen Crosslinkern wird in den Kapiteln 2.1.1.1 und 2.1.2.1 bis 2.1.2.3 vorgestellt. Wie für den beispielhaften heterobispezifischen Crosslinker sSMCC in *Abbildung 1.9* gezeigt, wird der Crosslinker üblicherweise in einem ersten Schritt mit dem Protein derivatisiert, so dass auf der Proteinoberfläche Thiol-reaktive Maleinsäureimidgruppen entstehen. Anschließend wird das aktivierte Protein aufgereinigt und mit Thiol-modifizierten Oligonucleotiden gekuppelt.^[44,93-94] Alternativ kann mit heterobispezifischen Crosslinkern eine ortsspezifische Kupplung an einem Zielprotein mit einem zugänglichen Cysteinrest realisiert werden. Dafür wird die Reaktionsreihenfolge unter Verwendung eines Amino-modifizierten Oligonucleotids invertiert.^[95]

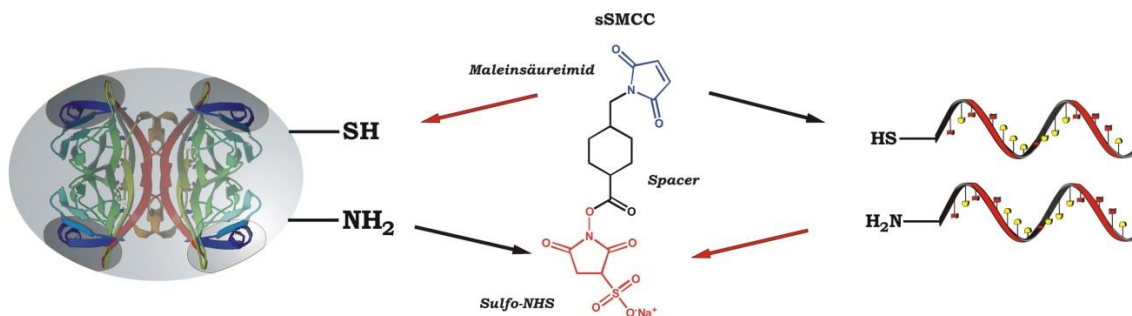


Abbildung 1.9: Schematische Darstellung zur kovalenten Konjugatsynthese mit dem heterobispezifischen Crosslinker sSMCC. Im mit schwarzen Pfeilen markierten Syntheseweg werden alle Oberflächenamine des Proteins mit der N-Hydroxysuccinimid-Gruppe (NHS) von sSMCC derivatisiert und im zweiten Schritt reagiert die eingeführte Maleinsäureimidgruppe ortsunspezifisch mit Thiol-modifizierten Oligonucleotiden. Der invertierte Syntheseweg entlang der roten Pfeile führt zu einer ortsspezifischen Kupplung von einem Amino-modifizierten Oligonucleotid mit einem Cysteinrest am Zielprotein.

Heterobispezifische Crosslinker mit einer Maleinsäureimidgruppe können vielseitig eingesetzt werden, da die Zielproteine nicht unbedingt gentechnisch modifiziert werden müssen und lange DNA-Fragmente gekuppelt werden können. Ein Nachteil dieser Methode ist die notwendige Aufreinigung nach jedem Kupplungsschritt.

Eine weitere Methode für eine ortsspezifische Konjugatsynthese von DNA-Protein-Konjugaten ist die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen einem Alkylthiol-modifizierten DNA-Oligonucleotid mit einem rekombinant in einem Zielprotein eingeführten Cysteinrest. In einem richtungsweisenden Beispiel für diese Konjugationsmethode wurde von Corey *et al.*^[96] Cystein im Protein Staphylococcus-Nuclease über eine Disulfidbrücke mit einem Alkylthiol-modifizierten DNA-Oligonucleotid gekuppelt.

Eine ortsspezifische Konjugation von Oligonucleotid und Protein mittels eines einzelnen, adressierbaren Cysteinrests auf der Proteinoberfläche ist nicht bei allen Zielproteinen möglich. Es wurden alternative Methoden entwickelt, die eine orthogonale Kupplung mit den vielfältigen chemischen Gruppen in nativen Proteinen ermöglichen.

Ein bedeutendes Beispiel für derartige Methoden ist die Ligation exprimierter Proteine (EPL).^[97-98] Dabei werden rekombinante Proteine mit einem C-terminalen Thioester selektiv, spontan und unter milden Reaktionsbedingungen mit N-terminalen Cysteinkonjugaten von Nucleinsäuren gekuppelt.^[55] Die EPL-Methode vereint die Vorteile von ortsspezifischer Verknüpfung und definierter, stöchiometrischer Zusammensetzung von PNA- und DNA-Protein-Konjugaten.^[99-100]

Weitere bioorthogonale Ansätze zur selektiven chemischen Kupplung von Proteinen und Nucleinsäuren wurden der organischen Synthese entliehen. Die bedeutendsten Methoden dieser Kupplungsreaktionen sind die Staudinger-Ligation von Azid- und Phosphin-modifizierten Komponenten^[101] und die 1,3-dipolare Huisgen-Cycloaddition von Aziden und Alkinen.^[102] Mit beiden Kupplungsreaktionen wurden erfolgreich DNA-Protein-Konjugate synthetisiert. Hierfür wurden Glycoproteine auf der Oberfläche von HEK-Zellen mittels des Zuckermetabolismus mit Azidogruppen ausgestattet, welche anschließend selektiv mit Phosphin-derivatisierten Oligonucleotiden gekuppelt wurden. Die auf diese Weise DNA-funktionalisierten Zellen wurden dann mittels DDI im μm -Maßstab angeordnet^[103-104] und mittels AFM untersucht.^[105] Die Verwendung der Huisgen-Cycloaddition wurde zunächst zur Modifizierung von synthetischen DNA-Oligonucleotiden und zur Konjugatsynthese von DNA-Protein-Konjugaten beschrieben,^[106-107] jedoch zeigte sich die Kupfer(I) katalysiert Huisgen-Cycloaddition in biologischen Systemen als nachteilhaft. Für die Konjugation *in vitro* und in lebenden Zellen wird darum in neueren Arbeiten alternativ die durch Molekülspannung induzierte Azid-Alkin-Cycloaddition, die photoinduzierbare 1,3-dipolare Cycloaddition, die Kreuzmetathese von Allylsulfiden und die Diels-Alder Reaktion von Tetrazin und trans-Cycloocten verwendet.^[108]

Für viele dieser bioorthogonalen Ansätze erwies sich der ortsspezifische Einbau von nichtnatürlichen Aminosäuren mit chemisch adressierbaren Alkin- oder Azidfunktionen in rekombinante Proteine als sehr hilfreich.^[109-111] Beispielsweise wurden von Kazane *et al.*^[112] nichtnatürliche Aminosäuren in Fab-Fragmente eingebaut, mit Biotin oder mit Oligonucleotiden^[57] gekuppelt und danach zu DNA-Protein-Nanostrukturen assembliert.

Eine weitere effiziente Methode für eine ortsspezifische Konjugatsynthese ist die Verwendung einer spezifischen Enzymaktivität, die zu einer autokatalytischen Kupplung des Zielproteins mit einem „Suizid-Substrat“-funktionalisierten DNA-Oligonucleotid führt. Ein repräsentatives Protein für die autokatalytisch kovalente Verbindung mit einem Substrat ist die humane O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase, die unter der Bezeichnung „SNAP-Tag“ von Johnson *et al.*^[113-114] entwickelt wurden. Ein weiterer bedeutender Vertreter dieser Gruppe ist die

Haloalkan Dehalogenase, welche unter dem Namen „HALO-Tag“ von Wood *et al.*^[115] entwickelt wurden. Der SNAP-Tag wurde mit einem Benzylguanin-modifizierten Oligonucleotid und der HALO-Tag mit einem Chlorohexan-modifizierten Oligonucleotid als „Suizid-Substrate“ gekoppelt. Beide Proteine müssen zunächst gentechnisch mit dem Zielprotein fusioniert werden, können dann jedoch ohne weitere Aufreinigung mit DNA gekoppelt werden.^[67]

1.1.2 Streptavidin

Die funktions- und strukturanalogen Proteine Avidin (Glykoprotein aus dem Hühnerei) und Streptavidin (STV isoliert aus *Streptomyces avidinii*) finden eine weit verbreitete Anwendung in den Biowissenschaften.^[116-118] Ursache für die häufige Verwendung der beiden Proteine ist die einzigartig hohe Bindeaffinität von ca. $K_a = 10^{14} - 10^{16} \text{ M}^{-1}$ ^[119] zu dem kleinen Molekül Biotin (siehe *Abbildung 1.7*). Dabei wird STV in den Biowissenschaften weit verbreiteter eingesetzt, weil es zusätzlich eine hohe thermische Stabilität,^[120] eine hohe Stabilität gegen sowohl Detergentien^[121-122] als auch niedrige und hohe pH-Werte^[123] sowie eine hohe Resistenz gegen viele Typen von Proteasen^[124] aufweist. Das häufigste in der Nanobiotechnologie eingesetzte STV ist so genanntes „core Streptavidin“ bestehend aus 128 Aminosäuren pro STV-Monomer.^[123]

Wie in *Abbildung 1.10* gezeigt bildet sich die Tertiärstruktur aus vier strukturell identischen Untereinheiten.^[125] Die vier Untereinheiten von STV werden aus acht antiparallelen β -Strängen und den verbindenden Schlaufen aufgebaut. Dabei falten sich die STV-Untereinheiten als klassische antiparallele Fassetstruktur.

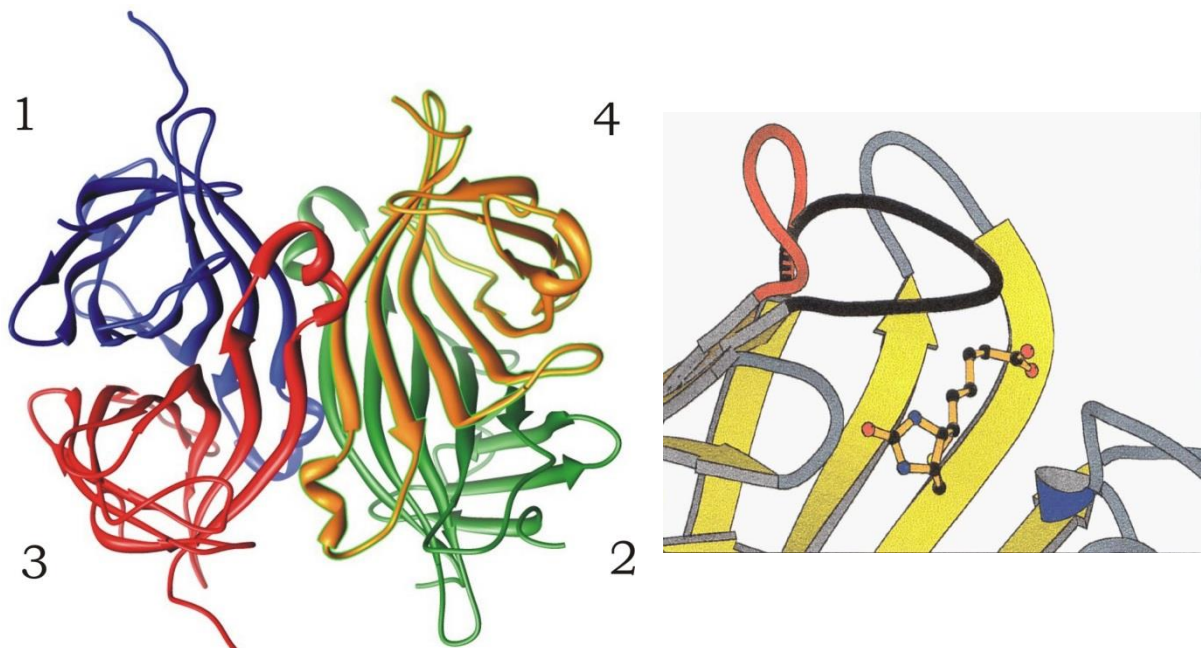


Abbildung 1.10: Ribbon-Struktur von homotetramerem STV aus PDB 3RY1; die vier STV-Untereinheiten sind nummeriert und in unterschiedlichen Farben dargestellt.^[126] (links). Ribbon-Struktur der Biotinbindetasche mit gebundenem Biotin und geöffneter (**rot**) sowie geschlossener (**schwarz**) Schlaufe zwischen den β -Strängen drei und vier.^[127]

Die Biotinbindetasche befindet sich am unteren Rand jeder der vier β -Fasstrukturen. Folglich kann das homotetramere STV vier Biotin-Moleküle binden.^[123] Bei der Biotinbindung kommt es zu einer funktionellen Wechselwirkung zwischen zwei STV-Untereinheiten (1 und 3; 2 und 4 in *Abbildung 1.10*, links), wobei jeweils eine der Seiten der Bindetasche von der strukturell gegenüberliegenden Untereinheit beigetragen wird (besonders Trp120).^[128] somit können jeweils zwei STV-Untereinheiten als funktionelles Dimer betrachtet werden.

Die außerordentliche hohe Bindeaffinität von STV und Biotin wird durch vier unterschiedliche Effekte verursacht. Als erstes werden eine große Zahl von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen hydrophilen Aminosäuren von STV und Biotin ausgebildet, was besonders in der Region des Ureidorings beobachtet werden kann. Zweitens bildet STV mittels aromatischer Aminosäuregruppen eine energetisch günstige, hydrophobe Umgebung für Biotin.^[125] Drittens kommt es in der Folge der Biotinbindung zu Konformationsänderungen in der tertiären und quartären Struktur von STV. Dabei verändert sich die Konformation der Schlaufe zwischen den β -Strängen drei und vier (L3/L4-Schlaufe), so dass die Schlaufe die Biotinbindetasche, vergleichbar mit einem Deckel, verschließt (siehe *Abbildung 1.10* rechts).^[127,129] Viertens lässt sich eine strukturelle Verdichtung des Gesamtproteins in Folge der Konformationsänderungen bei der Biotinbindung beobachten.^[130] Es zeigte sich, dass die strukturellen Veränderungen während der Bindung von Biotin mit einer Stabilitätssteigerung des STV einhergehen.^[120]

Wie im Kapitel 1.1 beschrieben, wird STV häufig in DNA-Protein-Konjugaten verwendet und erlaubt eine schnelle und einfache Methode zur Bereitstellung von DNA-STV-Konjugaten. Der Nachteil der DNA-STV-Konjugate besteht in der mangelnden Kontrolle der Stöchiometrie als Folge der homotetrameren Struktur von STV.^[23] Darum wurden in vielen Ansätzen STV-Monomer-Mutanten rational designt, welche eine hohe Biotinbindeaffinität ohne die tetramere Struktur von STV bieten.^[131] Hierdurch wurden Dissoziationskonstanten von bis zu $K_a \approx 10^{-9}$ M von Biotin im mutierten Streptavidin-Monomer erreicht.^[132-133] Jedoch erwies sich die funktionelle Wechselwirkung zwischen zwei STV-Untereinheiten als essentieller Bestandteil, um die Bindeaffinität von nativem STV zu erreichen.

In einem anderen Ansatz wurde 2011 von Sardo *et al.* ein alternatives, biotinbindendes Protein rekombinant exprimiert. Burkavidin sollte eine direkte Kontrolle der Stöchiometrie bei der STV-Bindung erlauben. Jedoch zeigte Burkavidin im Vergleich zu Biotin eine deutlich geringere Bindeaffinität zu STV ($K_a \approx 10^7$ M⁻¹), so dass die Anwendungsmöglichkeiten limitiert bleiben.^[134]

In 2006 beschrieben Howarth *et al.* die erfolgreiche Konstruktion von monovalentem STV (mSTV).^[135] In diesem Ansatz wurde eine heterotetramere STV-Mutante hergestellt, die sich aus einer STV-Untereinheit mit nativer Biotinbindeaffinität und drei mutierten STV-Untereinheiten mit stark reduzierter Biotinbindeaffinität zusammensetzte (siehe *Abbildung 1.11*).

Dafür wurde natives STV (nSTV) mit einem rekombinant eingefügtem C-terminalen His₆-Tag und eine STV-Mutante (dSTV) mit einer Dissoziationskonstante zu Biotin von $K_a \approx 10^{-3}$ M (N23A, S27D und S45A) in Guanidiniumhydrochlorid vereint. Die entfaltenen Proteine wurden durch rasches Verdünnen in PBS renaturiert, wobei sich eine statistische Verteilung von nSTV-Untereinheiten und dSTV-Untereinheiten entsprechend der eingesetzten stöchiometrischen Proteinmengen in den renaturierten STV-Tetrameren ergab. Die Mischung von STV-Tetrameren wurde mittels Ni-NTA-Chromatographie aufgereinigt, wobei die unterschiedlichen Typen anhand des His₆-Tags in den nSTV-Untereinheiten voneinander getrennt werden konnten.

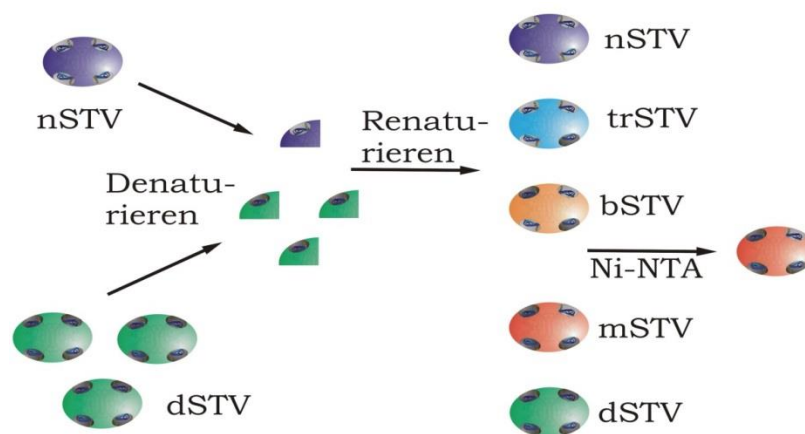


Abbildung 1.11: Schematische Darstellung der Herstellung von mSTV nach Howarth; nSTV und dSTV wurden vereint und mittels Guanidiniumhydrochlorid denaturiert. Die Mischung entfalteter STV-Untereinheiten wurde rasch verdünnt und es renaturierten nSTV, trivalentes STV (trSTV), bivalentes STV (bSTV), mSTV und dSTV. Das mSTV wurde mittels Ni-NTA-Chromatographie abgetrennt.

Diese elegante Methode zur Herstellung von mSTV erlaubte es, die funktionelle Wechselwirkung zwischen zwei STV-Untereinheiten zu erhalten und ermöglichte gleichzeitig die Kontrolle der Stöchiometrie bei der Biotinbindung. Wie in *Abbildung 1.11* gezeigt konnten mit dieser Methode auch trivalentes STV (trSTV) und bivalentes STV (bSTV) hergestellt werden.

Ting und Mitarbeiter zeigten anschließend den erfolgreichen Einsatz von Antikörper-mSTV-Konjugaten bei der Markierung von Proteinen an der Oberfläche von Zellen^[136] und zur Funktionalisierung von Halbleiter-Nanopartikeln.^[137]

Mit der von Howarth *et al.* beschriebenen Methode können unterschiedlich funktionalisierte STV-Untereinheiten miteinander kombiniert werden, wobei die Renaturierung der unterschiedlichen Untereinheiten immer zu einer statistischen Verteilung in Abhängigkeit der stöchiometrisch eingesetzten STV-Mutanten führt. Werden drei Äquivalente nSTV mit einem Äquivalent einer STV-Mutante mit rekombinant eingeführtem C-terminalem Cysteinrest nach der von Howarth beschriebenen Methode vereint und renaturiert, dann entsteht eine Mischung von STV-Mutanten mit einer statistischen Verteilung der Untereinheiten, die einen Cysteinrest enthalten. Eine derartige Mischung von STV-Mutanten mit durchschnittlich einem rekombinant eingeführten C-terminalen Cysteinrest (nSTV-SH) wurde zuerst von Dr. Kersten Rabe exprimiert.

Um eine nach der von Howarth beschriebenen Methode hergestellte STV-Mutante mit Funktionalitäten aufzureinigen, benötigt eine der STV-Untereinheiten zusätzlich eine rekombinant eingeführte Affinitätsmarkierung. So konnte Dr. Kathrin Schröder^[138] aus der vereinten und renaturierten Mischung aus nSTV und einer STV-Mutante mit einem His₆-Tag, einer TEV-Protease-Schnittstelle und einem endständigen Cysteinrest, so genanntes STV-TCH aufreinigen. Das STV-TCH konnte mittels Ni-NTA-Chromatographie aus der statistischen Mischung isoliert werden und erlaubte die ortsspezifische Konjugation über eine einzelne, an der Proteinoberfläche zugängliche Thiol-Gruppe.

Durch gezielte Mutation an der L3/L4-Schleife von STV konnten Chivers *et al.*^[139-140] 2010 die Biotinbindeaffinität weiter steigern. Die Mutation im so genannten Traptavidin (TTP) führte zu einer Konformationsänderung in TTV, wodurch die L3/L4-Schleife die Biotinbindetasche permanent geschlossen bleibt. Dadurch wurde die Diffusion von Biotin in die Bindetasche erschwert, was sich an der um den Faktor zehn reduzierten Geschwindigkeit der Biotinbindung zeigte. In gleicher Weise konnten die Autoren eine um den Faktor zehn gesteigerte Assoziationskonstante von TTV zu Biotin nachweisen. Da TTV in der Konformation mit geschlossener L3/L4-Schleife vorliegt und damit eine Verdichtung des Gesamtproteins angenommen werden kann, konnten Howarth und Mitarbeiter eine gesteigerte mechanische und thermische Stabilität sowie eine höhere Stabilität gegen Detergenzien von TTV zeigen. Vergleichbare Stabilitäten wurden bei STV mit gebundenem Biotin beobachtet.

1.2 Feld-Fluss-Fraktionierung

Die Rohprodukte von DNA-Protein-Konjugatsynthesen und assemblierte DNA-Protein-Nanostrukturen müssen häufig für ihre weitere Verwendung mittels Ionenaustausch- und Größenausschlusschromatographie aufgereinigt werden. Dabei sollen Edukte oder nicht assemblierte Konjugate abgetrennt werden. Die Ionenaustauschchromatographie ist durch einen hinreichenden Unterschied im Verhältnis der Masse zu Ladung (m/z -Verhältnis) der zu trennenden Analyten limitiert. Bei der Größenausschlusschromatographie können DNA-Protein-Konjugate infolge des hohen Scherstressses denaturieren oder an die feste Phase adsorbieren. Als alternative, proteinschonende Trennmethode wurde im Rahmen dieser Dissertation die Feld-Fluss-Fraktionierung (FFF) gewählt.

Die FFF ist eine zur Flüssigchromatographie ähnliche Methode zur Trennung von Teilchen in einer Größenordnung von 1 nm bis 100 μm .^[141] 1966 entwickelte Giddings^[142] das Konzept der FFF als chromatographie-ähnliche Analyseverfahren, bei der keine stationäre Phase verwendet werden muss.^[143] Die Methode der FFF basiert auf dem laminaren Fluss einer mobilen Phase in einem Trennkanal, welcher die bei der Chromatographie üblichen Säulen ersetzt. Wie in *Abbildung 1.12* gezeigt, erfolgt die Auftrennung der Analyten durch ein Kraftfeld, das vertikal zum parabolischen Fluss der mobilen Phase angelegt wird.^[141]

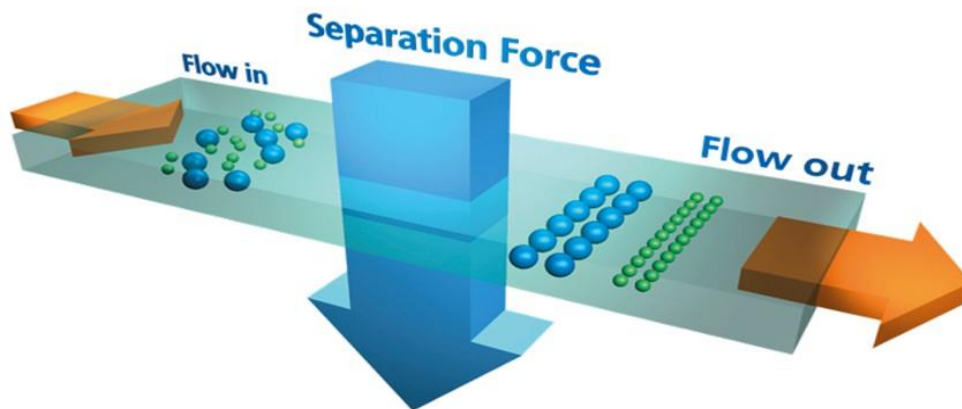


Abbildung 1.12: Schematische Darstellung des Trennprinzips der FFF; Durch ein vertikal zum parabolischen Fluss der mobilen Phase angelegtes Kraftfeld werden die Analyten nach ihrer Größe aufgetrennt.^[141]

Der Fluss der mobilen Phase und die Form des Trennkanals werden so gewählt, dass sich ein laminarer Fluss mit einem dafür typischen parabolischen Flussprofil ausbildet. Im Trennkanal werden die Teilchen durch das angelegte Kraftfeld in Richtung der Kanalunterseite gelenkt. Dabei können die Teilchen den Kanalboden nicht passieren und diffundieren zurück in Richtung des Kanalmittelpunkts.

Unter dem Einfluss des von oben nach unten wirkenden Kraftfeldes und der von unten nach oben entgegenwirkenden Diffusion der Teilchen, werden die Teilchen dann nach ihrer Diffusionsgeschwindigkeit aufgetrennt. Aus Formel 1.1 lässt sich erkennen, dass der Diffusionskoeffizient eine Stoffkonstante ist, welche nach der Stokes-Einstein-Beziehung^[144] proportional zur Temperatur T und umgekehrt proportional zur Viskosität η des Diffusionsmediums und dem Radius r des diffundierenden Moleküls ist.

$$D = \frac{RT}{6\pi r\eta N_A} \quad \text{Formel 1.1}$$

mit:

$R = \text{Universelle Gaskonstante}$

$N_A = \text{Avogadro-Konstante}$

Bei konstanter T und η des Diffusionsmediums kann eine direkt, umgekehrte Antiproportionalität des Diffusionskoeffizienten zum Radius der Teilchen erwartet werden. Infolge des teilchenabhängigen Diffusionskoeffizienten stellt sich nach Erreichen eines Gleichgewichtszustandes eine individuelle Schichtdicke der unterschiedlich großen Analyten ein.^[142] Dabei gelangen kleinere Teilchen aufgrund ihrer schnelleren Diffusion in höhergelegene Kanalbereiche mit schnelleren Strömungsgeschwindigkeiten. Größere Teilchen diffundieren dagegen in Kanalboden-nahe Bereiche mit niedrigen Strömungsgeschwindigkeiten. Als Folge dieser Teilchenverteilung in den unterschiedlich schnell fließenden lamellaren Strömen im Trennkanal eluieren kleine Teilchen vor großen Teilchen.^[145] Das vertikale Kraftfeld bei der FFF kann eine weitere Flüssigkeitsströmung (Fluss FFF), ein Temperaturgradient (Thermische FFF), ein Zentrifugalfeld (Sedimentations FFF), ein Gravitationsfeld (Gravitations FFF) oder eine andere physikalische Kraft sein.^[141]

Die Wechselwirkung zwischen dem Trennkanal und den Analyten ist bei der FFF deutlich geringer als die Wechselwirkung zwischen Säulenmatrix und Analyten bei der Flüssigchromatographie.^[146] Besonders durch die reduzierten Scherkräfte bei der FFF eignet sich diese Trennmethode sehr gut für empfindliche biologische Moleküle wie Proteine^[147] und Biopolymere.^[148-149] Je nach Masse, Größe, Aufbau und Dichte der Analyten kann eine FFF-Variante ausgewählt werden, die eine hohe Trennleistung und schonende Trennbedingungen für den entsprechenden Analyten ermöglicht.^[150]

Die Asymmetrische-Fluss-Feldflussfraktionierung (AF4) ist eine Variante der FFF, bei der die Trennkraft durch einen vertikalen Flüssigkeitsstrom erzielt wird, welcher den Trennkanal durch eine für den Analyten nicht permeable Membran im Kanalboden passiert. Die AF4 erlaubt die Auftrennung von Teilchen nach ihrer molekularen Masse in einer Teilchengrößenordnung von 5 nm bis 5 μm .^[151] In *Abbildung 1.13* ist das Konzept der AF4 in drei schematischen Schritten gezeigt.

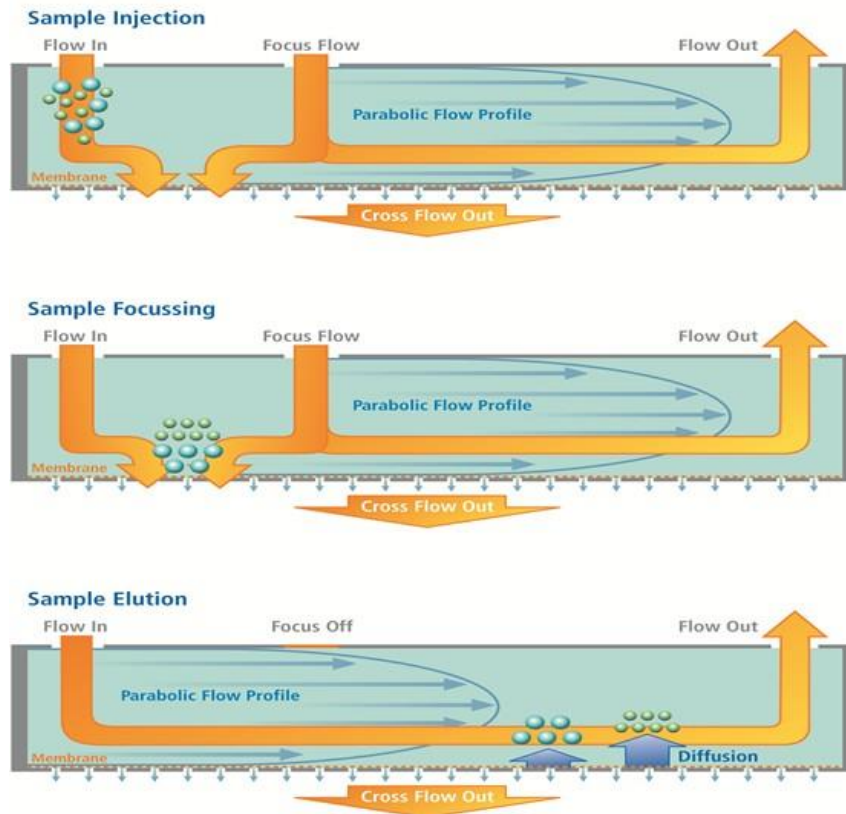


Abbildung 1.13: Schematische Darstellung der Asymmetrischen-Flussfeldflussfraktionierung (AF4); Im ersten Schritt werden die Analyten bei einem ständigen Gegenfluss (Fokusfluss) in den Trennkanal injiziert. Im zweiten Schritt werden die Analyten lokal aufkonzentriert. Das so genannte Fokussieren führt zu schärferen Elutionspeaks und erlaubt die Zugabe von Analyten niedriger Konzentration im großen Puffervolumen. Im dritten Schritt wandern die Analyten in einem laminaren Fluss durch den Trennkanal, wobei die Analyten anhand der Teilchengröße aufgetrennt werden. Kleinere Teilchen diffundieren entgegen des vertikalen Flüssigkeitsstroms in schneller fließende Strömungsschichten und eluieren schneller. Größere Teilchen eluieren langsamer, da sie vom vertikalen Flüssigkeitsstrom in langsamer fließende Strömungsschichten gehalten werden.^[141]

Im ersten Schritt wird die Probe unter ständigem Gegenfluss (Fokusfluss) in den Trennkanal injiziert. Dabei können große Probenvolumina über einen längeren Zeitraum in den Trennkanal injiziert werden, weil die Analyten bei vollem Fokusfluss nicht in den Trennkanal wandern können und am Kanaleingang gesammelt werden. Im zweiten Schritt wird die Konzentration des Analyten lokal gesteigert. Bei der so genannten Fokussierung sammeln sich die Analytteilchen in einer kleinen Phase zwischen Detektionsfluss und Fokusfluss. Im dritten Schritt werden die Analyten nach der Methode der FFF nach dem hydrodynamischen Radius aufgetrennt. Durch den vertikalen Flüssigkeitsstrom werden die Teilchen in die Richtung der permeablen Membran im Kanalboden bewegt. Kleinere Teilchen diffundieren dabei zurück in die schneller fließenden Flusschichten der mobilen Phase. Größere Teilchen verbleiben in den langsamer fließenden Flusschichten nahe der Membran im Kanalboden und eluieren dadurch nach den kleineren Teilchen.^[151]

Die AF4 eignet sich für viele Probentypen der Nanobiotechnologie.^[148-149] Beispielsweise zeigten Schachermeyer *et al.*^[149] die erfolgreiche Auftrennung von unterschiedlichen Polyethylenglycol (PEG)-modifizierten Proteinen mittels AF4 und daran gekoppeltem UV/Vis-Spektrometer, statischer Lichtstreuung (SLS) und einem Refraktometer. Luo *et al.*^[152] zeigten die Größenanalyse von Einschlusskörperchen von grünem FP mittels einer AF4 mit einem gekoppelten Detektor für die SLS. In einem anderen Ansatz zeigten Gigault *et al.*^[153] die erfolgreiche Auftrennung und Charakterisierung von positiv geladenen Au-NP mittels AF4 gekoppelt mit einem UV/Vis-Spektrometer. Calzolari *et al.*^[154] zeigten ebenfalls die erfolgreiche Auftrennung und Quantifizierung von Citrat-stabilisierten Au-NP.

1.3 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Dissertation sollten unterschiedliche DNA-Protein-Konjugate, unter anderen zu den in *Abbildung 1.14* gezeigten, supramolekularen DNA-STV-Nanostrukturen **1** bis **4** assembliert werden. Die Nomenklaturtabelle ist am Ende der Arbeit in Kapitel 8 abgebildet. Diese DNA-Protein-Konjugate und DNA-Protein-Nanostrukturen können als Baustein für molekulare Maschinen, zum Dekorieren von DNA-Origamis und als Modellsysteme bei der Weiter- und Neuentwicklung von analytischen Messmethoden im nm-Auflösungsbereich (zum Beispiel bei SERRS, TEFM und SNIM) Anwendung finden.

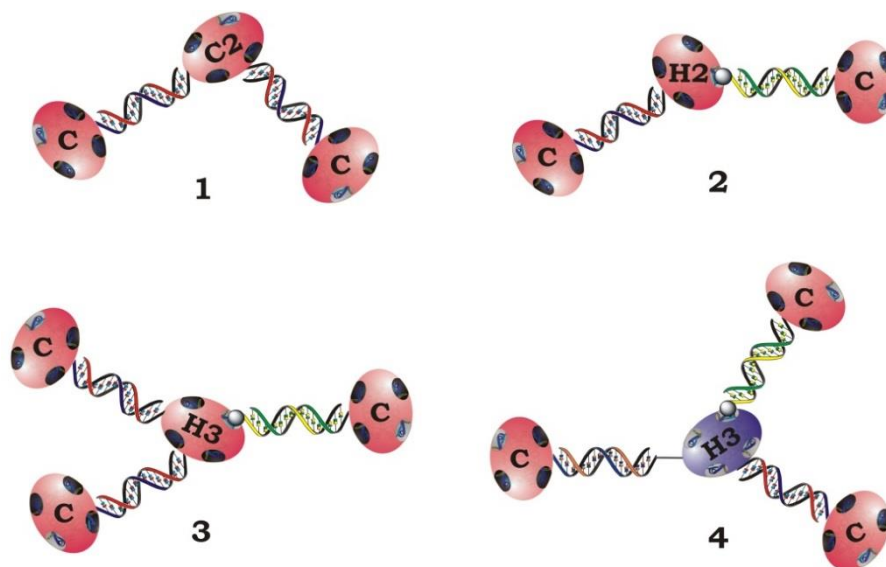


Abbildung 1.14: Schematische Darstellung der im Rahmen dieser Dissertation zu assemblierenden DNA-mSTV-Doppelhelixen **1** und **2**, einer DNA-mSTV-Y-Tripelhelix **3** und einer Nanostruktur auf Basis von trivalentem STV **4**. Rote Proteinschemata stellen mSTV und blaue Proteinschemata stellen vier Biotin-bindende STV-Mutante da. Die Buchstaben der Beschriftung auf den STV-Mutanten beziehen sich auf den Bindungstyp zu den gebundenen Oligonucleotiden (C = kovalente Bindung und H = kovalente und nicht kovalente Bindungen). Die Zahlen der Beschriftung auf den STV-Mutanten beschreiben die Anzahl der gebundenen Oligonucleotide (keine Zahl entspricht einer Bindung).

Für den Aufbau der Zielkonstrukte **1 - 4** sollten zunächst die Nanostrukturbausteine dargestellt werden. Natives STV (nSTV), monovalentes STV (mSTV), eine STV-Mutante mit rekombinant eingeführten C-terminalen Cysteinrest (nSTV-SH) und eine STV-Mutante mit einem His₆-Tag, einer TEV-Protease Schnittstelle und einem endständigen Cysteinrest (STV-TCH) sollten mit unterschiedlichen 22-Basenpaar-langen Oligonucleotiden konjugiert und charakterisiert werden.

Der Aufbau der Konstrukte **1 - 4** bedurfte der Assemblierung aus klar definierten DNA-STV-Konjugaten, die eine ortsgerichtete Hybridisierung der Nanostrukturbausteine ermöglichen. Darum wurden, wie in *Abbildung 1.15 A dargestellt*, DNA-mSTV-Konjugate ausgewählt, welche genau ein biotinyliertes Molekül binden. Wie in *Abbildung 1.15 B* gezeigt, binden Konjugaten aus DNA und nSTV bis zu vier biotinylierte Moleküle, was den rationellen Aufbau der Zielkonstrukte **1 - 3** hindert. Die Anzahl der kovalent gebundenen Oligonucleotide konnten bei der Konjugataufreinigung mittels Ionenaustauschchromatographie kontrolliert werden. Bei der anschließenden PAGE-Charakterisierung der DNA-STV-Konjugate zeigte sich die Bildung von Konjugatdimeren und -oligomeren, deren Bildung bei der DNA-STV-Konjugatsynthese schon 1994 von Niemeyer *et al.*^[44] beschrieben wurde. Wie in *Abbildung 1.15 C* gezeigt, wurden dabei die weniger mobilen Banden in Spur 2 und 3 (roter Kasten) Konjugatdimeren zugeordnet. Eine verstärkte Bildung von Konjugat-dimeren und -oligomeren wurde bei DNA-mSTV-Konjugaten beobachtet, welche bei der Ionenaustauschchromatographie wegen ihres zu den Monomeren identischen Masse zu Landungsverhältnisse nicht abgetrennt werden konnten. Im Vergleich zu DNA-mSTV-Konjugatmonomeren ist das Biotin-Bindevverhalten von dimerisierten Konjugaten schwer zu kontrollieren. Darum hindern DNA-mSTV-Konjugatdimere den rationellen Aufbau der Zielkonstrukte **1 - 4** und müssen vor der Assemblierung abgetrennt werden.

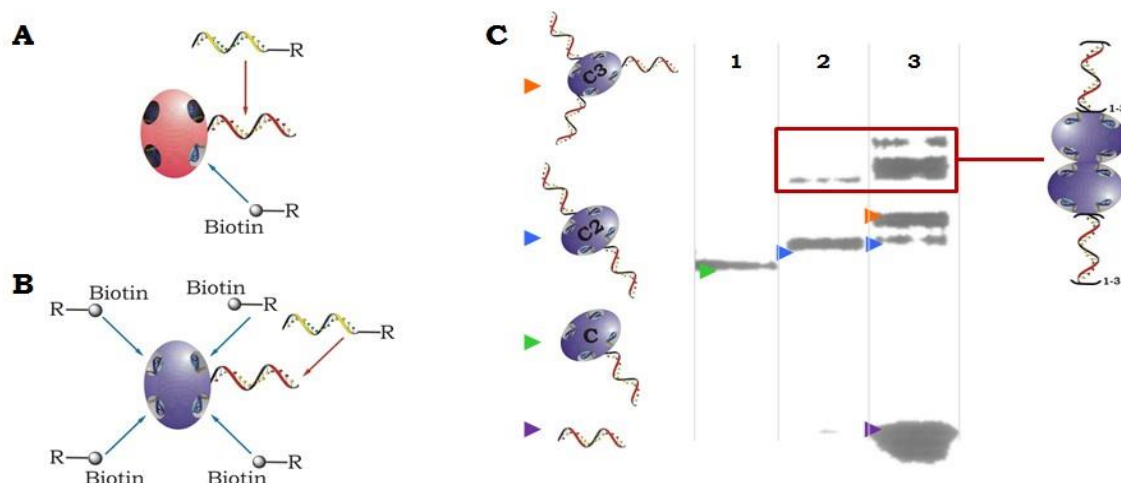


Abbildung 1.15: **A)** An einem DNA-mSTV-Monokonjugat kann ein komplementäres DNA-funktionalisiertes Molekül und ein biotinyliertes Molekül binden. **C)** An einem DNA-nSTV-Monokonjugat kann ein komplementäres DNA-funktionalisiertes Molekül und bis zu vier biotinylierte Moleküle binden, wodurch der definierte Aufbau der Zielkonstrukte **1 - 4** nicht möglich ist. **B)** nicht denaturierende PAGE von DNA-nSTV aus ^[44]; **Spur 1:** DNA-nSTV-Monokonjugat, **Spur 2:** DNA-nSTV-Bikonjugat, **Spur 3:** DNA-nSTV-Trikonjugat.

Durch eine Auswahl alternativer heterobispezifischer Crosslinker sollte der Anteil von DNA-mSTV-Konjugatdimeren und -oligomeren bei der Konjugatsynthese reduziert werden. Ergänzend sollte eine geeignete Methode identifiziert werden, um DNA-mSTV-Konjugatmonomere von Konjugatoligomeren zu trennen. Mittels der dabei ausgewählten Asymmetrischer-Fluss-Feldflussfraktionierung (AF4) sollten die Anteile an Konjugatoligomeren bestimmt und ihre Bildung untersucht werden.

Die mittels AF4 aufgereinigten DNA-mSTV-Konjugatmonomere sollten zunächst zu hantelförmigen Nanostrukturen assembliert und diese dann charakterisiert werden. Danach sollten die komplexeren Zielkonstrukte **1-3** assembliert und charakterisiert werden. Als nächstes sollte STV-TCH in zwei Schritten mit zwei unterschiedlichen Oligonucleotiden konjugiert und dann mit einem biotinylierten Oligonucleotid gebunden werden. Dieses trivalente STV sollte dann mit drei unterschiedlichen, komplementären DNA-mSTV-Konjugaten zum Zielkonstrukt **4** assembliert werden. Weiterhin sollte eine supramolekulare DNA-mSTV-Nanostruktur aus einem Y-förmigen DNA-Templat nach Li *et al.*^[155] assembliert werden.

Im Zuge des EU-Projektes „single or few molecules detection by combined enhanced spectroscopies“ (SMD) sollten DNA-Protein-Nanostrukturen als Modellsysteme für die Weiter- und Neuentwicklung von analytischen Messmethoden im nm-Auflösungsbereich hergestellt werden. Durch diese Arbeiten sollten erste Ergebnisse zur Anwendbarkeit der oben beschriebenen Synthesemethoden erprobt werden.

Dafür sollten Nanostrukturen aus langen, nicht rigiden, bis-biotinylierten dsDNA-Fragmenten und mSTV assembliert werden, um diese mittels „Scanning Near Field Infrared Microscopy“ (SNIM)^[156-157] bei einem Projektpartner weiter zu charakterisieren.

Weiterhin sollten DNA-FP-Konjugate dargestellt werden, welche zu hantelförmigen Nanostrukturen assembliert werden sollten. Diese fluoreszenten Nanohanteln sollten dann bei einem weiteren Projektpartner mittels „Tip Enhanced Fluorescence Mapping“ (TEFM)^[158] charakterisiert werden.

Auch sollten Au-NP mit zwei Thiol-modifizierten Oligonucleotiden funktionalisiert werden, um die DNA-bis-funktionalisierten Au-NP mit den DNA-FP-Konjugaten und DNA-funktionalisierten Ag-NP zu einem dispersen Nanopartikel-Protein Hybriden zu assemblieren. Diese hybride Nanostruktur sollte dann bei einem Projektpartner mittels oberflächenverstärkte Resonanz-Raman-Spektroskopie (SERRS)^[159-161] charakterisiert werden.

2 Ergebnisse und Diskussion

2.1 DNA-STV-Konjugatsynthesen

Als Basis für diese Arbeit sollten unter Verwendung des heterobispezifischen Crosslinkers sSMCC^[162] (siehe *Abbildung 1.9* und *Abbildung 2.2*) vier unterschiedliche STV-Mutanten mit Amino- bzw. Thiol-modifizierten F-Sequenz-Oligonucleotiden (siehe *Tabelle 4.4*) kovalent verknüpft werden.

Die Modifikation der kommerziell erworbene Oligonucleotide sollte orthogonal zu den Crosslinker-derivatisierten Amino- oder Thiolgruppen an der Proteinoberfläche der STV-Mutanten gewählt werden. Dabei sollte eine ortsspezifische Kupplung an einen Cysteinrest an der Oberfläche der jeweiligen STV-Mutante gegenüber des invertierten Synthesewegs (siehe *Abbildung 1.9*) immer favorisiert werden. Der Vorteil der ortsspezifische Kupplung an einen Cysteinrest besteht in der vollständig definierten DNA-STV-Konjugatsynthese und einer Minimierung der chemischen Veränderung der Proteinoberfläche.

Niemeyer *et al.* ^[44] beschrieb 1994 bei der Konjugatsynthese von DNA-nSTV mit dem heterobispezifischen Crosslinker Sulfosuccinimidyl 4-(p-Maleinsäure-Imidophenyl) Butyrat (sSMPB), die Bildung von Konjugatdimeren und -oligomeren als Nebenprodukte der Synthese (siehe *Abbildung 1.15 B*). Anteile dieser Dimere und -oligomere konnten im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls bei der DNA-nSTV Konjugatsynthese beobachtet werden. Wie im Kapitel 2.1.1.4 gezeigt, stieg der Anteil der Konjugatdimere und -oligomere bei der DNA-mSTV-Konjugatsynthese (mSTV nach Howarth *et al.*^[135]) signifikant an. DNA-mSTV-Konjugate sollten in den folgenden Assemblierungen supramolekularer Nanostrukturen als zentrale Bausteine Verwendung finden, darum mussten Konjugatdimere und -oligomere vollständig abgetrennt werden. Zunächst sollte, wie in Kapitel 2.1.2 gezeigt, der Anteil der Konjugatdimere und -oligomere durch die Verwendung alternativer Crosslinker bei der Konjugatsynthese reduziert werden. Danach wurde, wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben eine geeignete Methode zur Abtrennung der Konjugatdimere und -oligomere entwickelt, um die Dimeren und -oligomere erfolgreich abzutrennen. Als letztes wurde die Ursache für die Entstehung der Konjugatdimeren und -oligomere in Kapitel 2.1.4 untersucht und diskutiert.

2.1.1 Konjugatsynthesen unter Verwendung unterschiedlicher STV-Mutanten

Zuerst sollten DNA-nSTV-Konjugate zur Reproduktion der im Arbeitskreis Niemeyer etablierten kovalenten Konjugationsmethode^[163] und im weiteren Verlauf als Modell-Konjugat für verwendete Charakterisierungs- und Trennmethode dargestellt werden. Das nSTV wurde nach Schmidt *et al.*^[164] von Andreas Arndt exprimiert und aufgereinigt. In den schematische Darstellungen dieser Arbeit sind nSTV und alle weiteren vier Biotin-bindenden STV-Mutanten in blau abgebildet.

Danach sollte STV-SH mit Amino-modifizierten Oligonucleotiden konjugiert werden. nSTV-SH bezeichnet eine von Dr. Kersten Rabe zuerst hergestellte STV-Mutante mit einem rekombinant eingefügten C-terminalen Cysteinrest.

Anschließend sollte eine STV-Mutante mit einem His₆-Tag, einer TEV-Protease Schnittstelle und einem endständigen Cysteinrest nach Kathrin Schröder 2012^[138] ortsspezifisch mit DNA konjugiert werden.

Als wichtigster Baustein für die Assemblierung von supramolekularen DNA-STV-Nanostrukturen in dieser Arbeit sollte mSTV mit DNA konjugiert werden. In allen folgenden schematischen Darstellungen ist mSTV rot gefärbt und drei der vier Biotinbindetaschen sind abgedunkelt, um deren reduzierte Affinitätskonstante zu Biotin zu zeigen.

2.1.1.1 DNA-nSTV

Die DNA-nSTV-Konjugatsynthese folgte dem etablierten Protokoll nach Kukulka *et al.*^[163] In einem ersten Schritt wurde, 10 nmol nSTV mit 1.5 µmol sSMCC derivatisiert, wodurch die Proteinoberfläche mit Thiol-reaktiven Maleinsäureimidgruppen funktionalisiert wird (nSTV-sSMCC). Dabei reagieren die bis zu sechzehn an der Proteinoberfläche zugänglichen Amino-Gruppen (pro Homotetramer: 4x N-Terminus + 12x Lys – siehe *Abbildung 2.1*) von nSTV mit der NHS-Gruppe von sSMCC. Die Oberflächenstruktur von „core Streptavidin“ ist in *Abbildung 2.1* dargestellt.

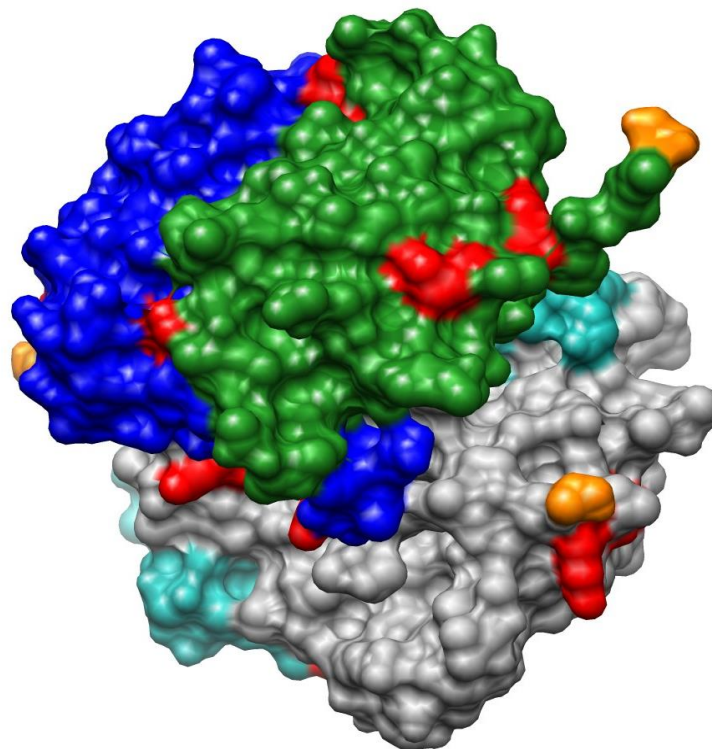


Abbildung 2.1: Oberflächenstruktur von „core Streptavidin“ erstellt mit UCSF Chimera V 1.62 nach 3RY1^[126]; Das „core Streptavidin“ ist aus vier unterschiedlich angefärbten STV-Untereinheiten aufgebaut. Zusätzlich wurden die **Oberflächenamine** rot angefärbt und die vier **C-Termini** orange angefärbt.

Gleichzeitig wurden Thiol-modifizierte Oligonucleotide (tDNA) mit Dithiothreitol (DTT) aktiviert, um etwaige Disulfidbrücken zwischen zwei Oligonucleotiden zu reduzieren. Es wurden vier je 22 Nucleobasen lange Oligonucleotide für die Konjugation mit nSTV verwendet. Die Sequenzen wurden mit F1, F5, F9 und F10 bezeichnet und wurden von Feldkamp *et al.*^[165] entwickelt (siehe *Tabelle 4.4*), um Kreuzhybridisierungen zwischen den Oligonucleotidsequenzen zu minimieren.

Das über Gelfiltrationssäulen aufgereinigten nSTV-sSMCC und die aktivierten Oligonucleotide wurden in einem zweiten Reaktionsschritt zusammen inkubiert (Verhältnis DNA/STV 1:2). Die Maleinsäureimid-Funktionalität von sSMCC reagiert in einer Michael-Addition mit der Thiol-Modifikation des Oligonucleotids. Ein Schema der Konjugatsynthese von DNA-STV ist in *Abbildung 2.2* dargestellt. Bei dieser Synthese stellte sich eine statistische Verteilung über die Mono- (**5**), Bi- (**6**), Tri- (**7**) und Tetrakonjugate (**8**) ein. Eine Übersicht über die Nomenklatur mit zugehörigen Strukturschemata sind am Ende der Arbeit im Kapitel 8 zusammengefasst. Die Bildung von Konjugaten mit einer variierenden Anzahl gebundener Oligonucleotide konnte über das stöchiometrische Stoffmengenverhältnis der eingesetzten Menge an Protein und Oligonucleotiden gesteuert werden. Für die hier beschriebenen DNA-nSTV-Konjugatsynthese wurden zwei Äquivalente nSTV zu einem Äquivalenten tDNA gegeben, um als Produkt der Konjugation das Monokonjugat (**5**) zu favorisieren. Der Überschuss nSTV bei der Konjugation führte zu einem großen Anteil nicht konjugiertem nSTV und DNA-nSTV-Konjugaten, welche sich überwiegend aus einem nSTV konjugiert mit einem Oligonucleotid zusammensetzten.

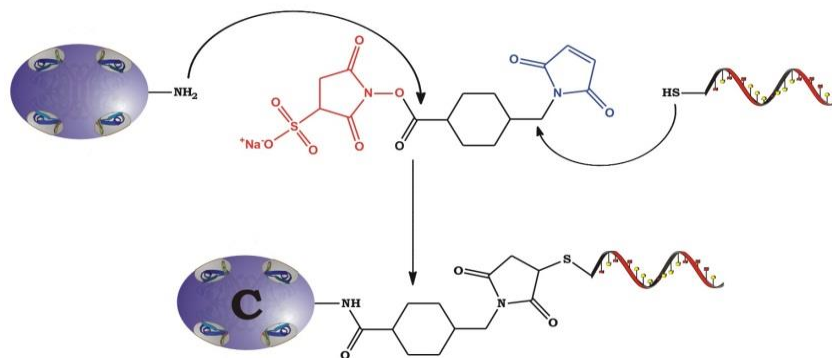


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der DNA-nSTV Konjugatsynthese mit sSMCC. Die an der Proteinoberfläche zugänglichen Amino-Gruppen von nSTV reagieren zuerst mit der *N-Hydroxysuccinimid*-Gruppe (NHS) von sSMCC. Im zweiten Schritt reagiert dann die *Maleinsäureimid*-Gruppe von sSMCC mit der tDNA in einer Michael-addition. Das „C“ auf dem Konjugat verweist auf die kovalente Bindung zwischen Protein und Oligonucleotid (Spacerarmlänge ca. 8 Å).

Nicht reagierte Maleinsäureimide auf der Proteinoberfläche wurden während des Aufkonzentrierens mit 1.0 mol/L Mercaptoethanol geblockt, bevor die Probe für die FPLC umgepuffert wurde.

Anschließend erfolgte eine Aufreinigung über eine Anionenaustauschsäule an der FPLC (siehe 4.3.1). Ein repräsentatives FPLC-Chromatogramm für die Anionenaustauschchromatographie eines DNA-nSTV-Konjugats mit dem Oligonucleotid F9 (F9-nSTV) ist in *Abbildung 2.3* dargestellt. Die vollständige Nomenklaturtabelle ist in *Kapitel 8* abgebildet. Dabei wurde die Konzentration von NaCl (siehe blaue Linie) von 0% (0 mol/L) auf 100% (1.0 mol/L) gesteigert.

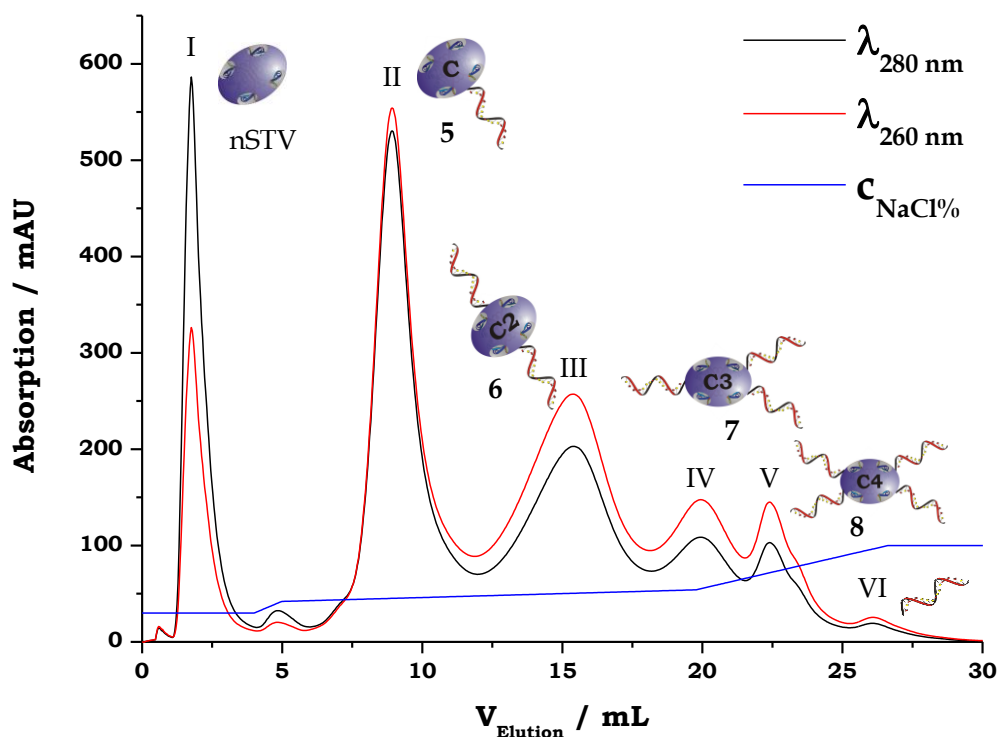


Abbildung 2.3: Repräsentatives Anionenaustauschchromatogramm von einer F9-nSTV Konjugataufreinigung; I) nicht konjugiertes nSTV, II) **5a**, III) **6**, IV) **7**, V) **8** und VI) nicht konjugiertes Oligonucleotid.

Das in *Abbildung 2.3* gezeigte FPLC-Chromatogramm der Aufreinigung der Rohprodukte der F9-nSTV-Konjugatsynthese entsprach einem literaturbeschriebenen Kurvenverlauf.^[44] Bei der Anionenaustauschchromatographie eluieren als erstes die Pobenspezies mit dem größtem Masse zu Ladungsverhältnis (m/z -Verhältnis). Bei der Anionenaustauschchromatographie von F9-nSTV-Konjugat eluiert zunächst nicht konjugiertes nSTV und dann F9-STV-Konjugate mit einer steigenden Anzahl kovalent gebundener Oligonucleotide. Ursache für diese Elutionsreihenfolge ist die negative Ladung des Phosphatrückrat der Oligonucleotide, da durch eine steigende Anzahl an nSTV gebundenen Oligonucleotide das m/z -Verhältnis sinkt.

Peak I wurde nicht konjugiertem nSTV, Peak II dem Monokonjugat (**5a**), Peak III dem Bikonjugat (**6**), Peak IV dem Trikonjugat (**7**) und Peak V dem Tetrakonjugat (**8**) zugeordnet. Dem verbliebenen Peak VI wurde als Probebestandteil mit kleinstem m/z -Verhältnis als nicht konjugiertes F9 identifiziert.

Die Peakzuordnung erfolgte anhand der Elutionsreihenfolge und aufgrund des Verhältnisses der Absorption bei $\lambda = 260$ nm (—) zu $\lambda = 280$ nm (—) (A_{260}/A_{280} -Verhältnis). Bei $\lambda = 280$ nm absorbieren vorwiegend Proteine (die aromatischen Aminosäuren: Phe, Tyr und Trp) und bei $\lambda = 260$ nm absorbieren vorwiegend Oligonucleotide (Nucleobasen). Daraus ergeben sich für Probestandteile mit großem Proteinanteil kleine Werte für A_{260}/A_{280} -Verhältnis und für DNA-reiche Probestandteile höhere Werte für A_{260}/A_{280} -Verhältnis.

Diese Absorptionsverhältnisse lassen sich auch im FPLC-Chromatogramm erkennen. Bei dem nicht konjugierten nSTV zugeordneten Peak I wurde ein A_{260}/A_{280} -Wert < 1 gemessen. Dieser Wert stieg mit den folgenden Peaks und unterstützt damit die Peakzuordnung, die Peak II bis V als **5a** bis **8** identifiziert. Dabei ist ein A_{260}/A_{280} -Wert ≈ 1 laut Lit.^[138] charakteristisch für **5a**. Ein entsprechender A_{260}/A_{280} -Wert ≈ 1 kann im Chromatogramm in *Abbildung 2.3* aus dem Peak von **5a** bestimmt werden.

Die aus dem Chromatogramm in *Abbildung 2.3* bestimmten A_{260}/A_{280} -Verhältnisse (■) wurden in *Abbildung 2.4* mit A_{260}/A_{280} -Verhältnisse aus Referenzproben (▲) nach *Tabelle 2.1* verglichen. Das A_{260}/A_{280} -Verhältnis von Peak VI wurde nach dem Aufkonzentrieren der Fraktionen unter Peak VI am Photometer bestimmt, da die Absorptionsintensität für den FPLC-UV/Vis-Detektor nicht ausreichte. Die Referenzproben setzten sich aus nSTV und biotinylierten F9 (bF9) zusammen. Dabei wurden Verhältnisse von nSTV zu bF9 gewählt, wie sie bei freien nSTV, **5a**, **6**, **7**, **8** und freiem Oligonucleotid erwartet wurden.

Tabelle 2.1: Ansatz für Referenzproben zur Bestimmung des A_{260}/A_{280} der Eluenten bei der Anionenaustauschchromatographie von F9-nSTV-Konjugat.

	A	B	C	D	E	F
bF9	-	1 eq	2 eq	3 eq	4 eq	1 eq
nSTV	1 eq	1 eq	1 eq	1 eq	1 eq	-

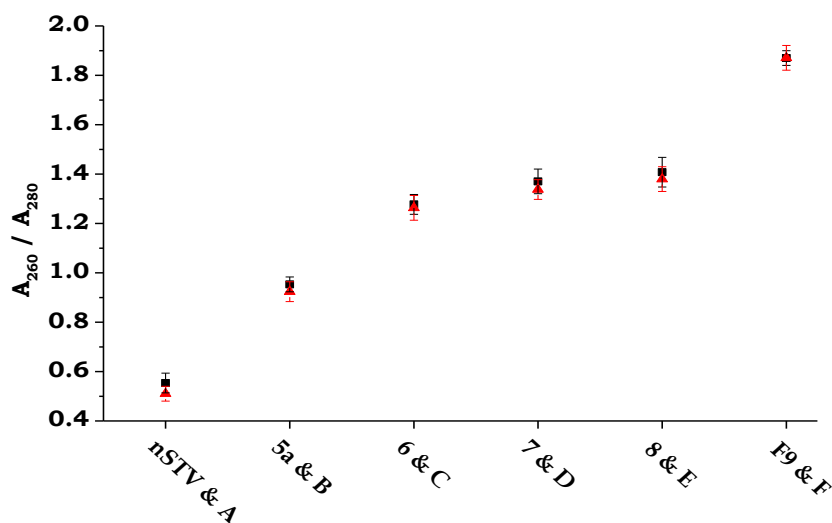


Abbildung 2.4: A_{260}/A_{280} -Verhältnisse von Peak I bis VI der Anionenaustauschchromatographie von F9-nSTV-Konjugat aus *Abbildung 2.3* (■) und Referenzproben **1** bis **6** nach *Tabelle 2.1* (▲).

Die A_{260}/A_{280} -Werte in Abbildung 2.4 bestätigten die Peakzuordnungen für das FPLC-Chromatogramm von F9-nSTV in *Abbildung 2.3*. Alle aus dem Anionenaustauschchromatogramm bestimmten A_{260}/A_{280} -Verhältnisse entsprachen den A_{260}/A_{280} -Verhältnissen der Referenzproben aus *Tabelle 2.1*.

Das Standardprotokoll wurde hinsichtlich der Handhabung des heterobispezifischen Crosslinkers sSMCC (siehe *Abbildung 2.16*) optimiert. Dabei wurde für die Konjugatsynthese nach der Vorschrift aus *4.8.1* isolierte Ausbeuten von $22.1\% \pm 0.9\%$ für das Monokonjugat **5** und $5.9\% \pm 0.6\%$ für das Bikonjugat **6** erreicht.

Die wichtigste Ursache für die Ausbeutensteigerung war die verbesserte Handhabung des sSMCC. Zu Beginn der Arbeit wurde das sSMCC an der Feinwaage in 2 mg Aliquoten abgewogen und in Eppendorf Reaktionsgefäßen bei -20 °C gelagert. Die NHS-Gruppe von sSMCC ist gegenüber Luftfeuchtigkeit empfindlich und hydrolysierte bereits beim Aliquotieren. Zusätzlich ließ sich bei jedem Aliquoten ein Einwaagefehler, bedingt durch elektrostatische Ladungen und die Genauigkeit der Waage, erwarten. Bei den als Pulver gelagerten sSMCC-Aliquoten schwankte die Ausbeute der Konjugatsynthese erheblich und es wurden keine Ausbeuten über 10% erreicht.

Durch unmittelbares Lösen in trockenem DMSO in einer Glovebox unter Argon-Atmosphäre und anschließendem Aliquotieren und Lagern bei -80 °C des gelösten Crosslinkers, konnte die Ausbeute der Konjugatsynthese deutlich gesteigert werden.

Die F9-nSTV-Monokonjugate (**5**) und -Bikonjugate (**6**) wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) charakterisiert. Dabei wurden nur Mono- und Bikonjugat verwendet, weil die höhervalenten Konjugate (**7** und **8**) bei der Konjugatsynthese nicht in ausreichenden Stoffmengen für diese Art der Charakterisierung erhalten wurden. Bei gelelektrophoretischen Analysemethoden wird die unterschiedliche elektrophoretische Mobilität, der auf das Gel aufgetragenen Proben verglichen. Die elektrophoretische Mobilität setzt sich aus dem hydrodynamischen Volumen und dem m/z -Verhältnis einer Probe zusammen. Je ungehinderter eine Probe die Gelmatrix passieren kann und je stärker ihre spezifische Ladung im Feld der Elektrophorese die Probe beschleunigt, desto größer ist die elektrophoretische Mobilität.

Für die SDS-PAGE wurden jeweils 20 pmol **5**, **6** und nSTV mit 4x SDS-Probenpuffer gemischt und in die Geltaschen geladen. Dabei wurde je eine Geltasche mit unmittelbar angesetzter Probenlösung ohne zuvor durchgeführte Denaturierung und eine weitere nach thermischer Denaturierung der Probenlösung (5 min auf 95 °C erhitzt) beladen. Als Gelmarker wurde Protein-Größenstandard (Broad Range Molecular Weight Standard, Bio-Rad) verwendet.

Das SDS-Gel wurde anschließend mit Coomassie-Brillant-Blau angefärbt und mit einem Flachbettscanner dokumentiert. Ein dabei aufgenommenes, repräsentatives Gel ist in *Abbildung 2.5* gezeigt.

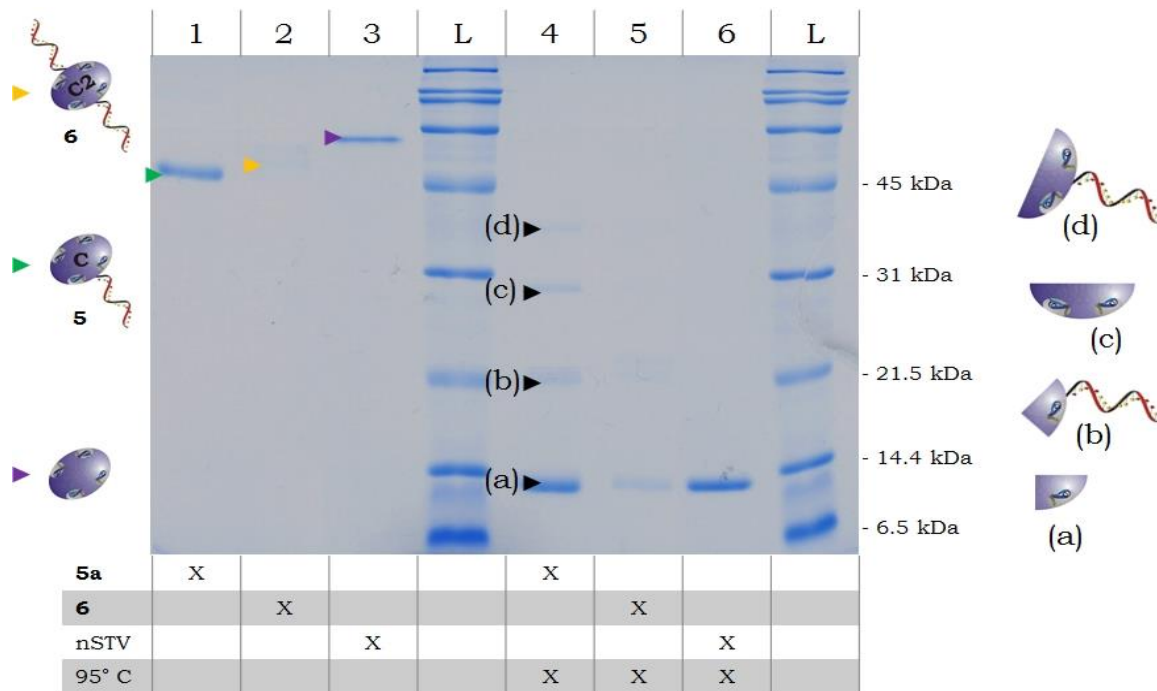


Abbildung 2.5: SDS-PAGE von F9-nSTV-Konjugaten nach Anfärbung mit Coomassie Brillant Blau; **Spur 1: 5a**, **Spur 2: 6**, **Spur 3: nSTV**, **L: Protein-Größenstandard**, **Spur 4: 5a@95 °C**, **Spur 5: 6@95 °C**, **Spur 6: nSTV@95 °C**.

In *Abbildung 2.5* lassen sich in den Spuren 1 bis 3 die elektrophoretische Mobilität von nicht denaturierten nSTV, **5a** und **6** erkennen. Dabei muss beachtet werden, dass bei den nicht denaturierten Proben der Protein-Größenstandard nicht zum Abschätzen der Molmasse geeignet ist.

In Spur 1 ist eine scharfe Bande (▶) zu erkennen, der **5a** zugeordnet wurde. Der wenig intensive Bande in Spur 2 (▶) wurde **6** zugeordnet. Die reduzierte Mobilität der Bande in Spur 2, verglichen mit der Bande von **5a**, war eine Folge des gesteigerten hydrodynamischen Volumens von **6**. Dabei sinkt die elektrophoretische Mobilität einer Probe in Folge einer reduzierten Passierfähigkeit durch die Gelmatrix. Der Bande in Spur 3 (▶) konnte nSTV zugeordnet werden. nSTV zeigte bei der SDS-PAGE eine geringere elektrophoretische Mobilität als **5a** und **6**. Ursache für die geringe Mobilität von nSTV gegenüber der DNA-nSTV-Konjugate war das niedrige m/z-Verhältnis von nSTV.

Die Proben in den Spuren 4 bis 6 wurden fünf Minuten bei 95 °C denaturiert, wodurch nSTV in vier Monomere identischer Masse (ca. 13.5 kDa) zerfällt.^[129] Die Masse der denaturierten Proben im SDS-Gel kann anhand des Protein-Größenstandards abgeschätzt werden. Zu Vereinfachung der Diskussion sind die Banden der denaturierten Konjugate mit sinkender gelelektrophoretischer Mobilität von (a) bis (d) benannt.

In Spur 4 lässt sich erkennen, dass **5a** beim Denaturieren in mehrere Banden aufspaltet. Eine Hauptbande (**a**) ist unterhalb von 14.4 kDa zu erkennen und wurde nSTV-Monomer (ca. 13.5 kDa) zugeordnet. Die nächste Bande (**b**) lässt sich auf Höhe von 21.5 kDa erkennen. Sie wurde einem nSTV-Monomer, gekuppelt mit einem Oligonucleotid (ca. 21 kDa) zugeordnet. Die folgende Bande (**c**) ist unterhalb von 31 kDa zu erkennen und wurde nSTV-Dimeren (ca. 27 kDa) zugeordnet. Eine letzte Bande (**d**) ist zwischen einer Masse von 31 kDa und 45 kDa des Protein-Größenstandards zu erkennen und wurde einem STV-Dimer, gekuppelt mit einem Oligonucleotid (ca. 35 kDa) zugeordnet.

Bei dem in Spur 5 aufgetragenem denaturierten **6** lässt sich nur eine Bande (**a**) unterhalb von 14.4 kDa erkennen, welcher das nSTV-Monomer zugeordnet wurde. Wie schon in Spur 2 beobachtet, ließ sich das Bikonjugat bei der SDS-PAGE schlecht nachweisen.

In der mit nSTV beladenen Spur 6 lässt sich eine Bande (**a**) erkennen, der nSTV-Monomeren zugeordnet wurde. Die Mobilität der nSTV-Monomer Bande unterhalb von 14.4 kDa des Protein-Größenstandards entsprach der erwarteten Monomer-Masse von ca. 13.5 kDa.

Bei der Denaturierung von F9-nSTV-Monokonjugat wurden Banden von nSTV-Monomer und nSTV-Monomer, das mit dem Oligonucleotid F9 gekuppelt war, erwartet. Zusätzlich wurden Banden von nSTV-Dimeren und nSTV-Dimeren, welche mit F9 gekuppelt waren, beobachtet. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass bei der Konjugatsynthese von **5a** nSTV-Untereinheiten kovalent miteinander verknüpft wurden. Auf diese Beobachtung wird in Kapitel 2.1.4 intensiver eingegangen.

Eine genauere Charakterisierung von **5a** und **6** erfolgte durch nicht denaturierende PAGE (ndPAGE). Bei der ndPAGE konnten Biotin-Bindeeigenschaften und die Hybridisierung von DNA-nSTV-Konjugaten mit komplementären Oligonucleotiden charakterisiert werden, da bei dieser Elektrophoresemethode kein Detergenz die Proteine denaturiert und die Hybridisierung von Oligonucleotiden verhindert. Ähnlich der SDS-PAGE von nicht thermisch denaturierten Proben werden bei der ndPAGE die Probemoleküle nach m/z-Verhältnis und hydrodynamischen Volumen (häufig übereinstimmend mit der Molmasse) aufgetrennt, dabei wandern nur Probenmoleküle im Feld der Elektrolyse, die im pH-Bereich des Sammel- und Trenngels hinreichend ionisiert sind. Der pH-Wert von Sammel- (pH 6.8) und Trenngel (pH 8.8) wurde so gewählt, dass DNA-STV-Konjugate im elektrischen Feld wanderten, während nicht konjugiertes STV (pI 6.4) nicht ausreichend ionisiert war.

Für die ndPAGE wurden jeweils 2 pmol **5a** und **6** auf das Gel geladen. Zusätzlich wurden jeweils 2 pmol **5a** und **6** mit biotinylierten F5 (bF5) inkubiert und auf das Gel geladen. Als nicht kovalente Referenzkonjugate wurde nSTV in den Verhältnissen 1/4, 1/1 und 2/1 mit bF5 inkubiert und auf das Gel geladen. Als weitere Kontrollen wurden nSTV, Rohprodukt der F9-nSTV-Konjugatsynthese und

5a, das mit komplementären Konjugat **5b** inkubiert wurde auf das Gel geladen. Alle Proben für die Gelelektrophorese wurden vorher mit 6x Orange DNA Loading Dye von Thermo (Waltham, USA) gemischt. Das ndGel wurde mit dem fluoreszenten Interkalator Sybr Gold von Invitrogen (Carlsbad, USA) angefärbt und mit Hilfe des Alphaimager mit einem Sybr Gold Filter dokumentiert. Das dabei aufgenommene Gel ist in *Abbildung 2.6* dargestellt.

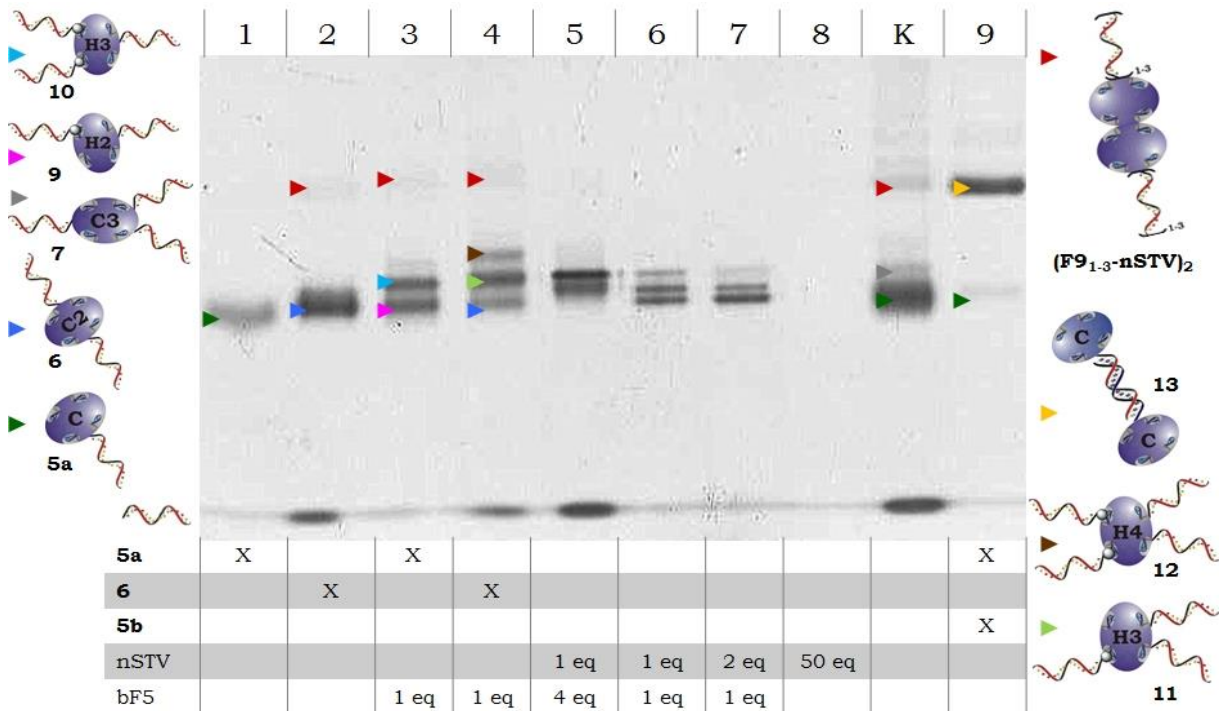


Abbildung 2.6: 8.5% ndPAGE von F9-nSTV-Konjugat nach Anfärben mit Sybr Gold; **Spur 1: 5a, Spur 2: 6, Spur 3: 5a + 1 eq bf5, Spur 4: 6 + 1 eq bf5, Spur 5: nSTV + 4 eq bf5, Spur 6: nSTV + 1 eq bf5, Spur 7: 2 eq nSTV + 1 eq bf5, Spur 8: 50 eq nSTV, Spur K: Rohprodukt der F9-nSTV-Konjugatsynthese, Spur 9: 5a + 5b.**

Der Fluoreszenzfarbstoff Sybr Gold interkaliert in einzelsträngige (ssDNA) und doppelsträngige Oligonucleotide (dsDNA), wobei durch eine deutlich höheren Bindeaffinität zu dsDNA diese intensiver angefärbt wird. Bei der Verwendung von Sybr Gold nach der ndPAGE wurde somit die DNA-STV-Konjugate anhand der enthaltenen Oligonucleotide angefärbt. Dabei können mit Sybr Gold Nachweisgrenzen von 25 pg dsDNA und 1 ng von ssDNA erreicht werden.^[166]

Zuerst erfolgte die Analyse der nicht kovalenten Referenzkonjugate in den Spuren 5 bis 7. Ähnlich der Konjugatsynthese von DNA-nSTV mit einem heterobispezifischen Crosslinker assemblieren die Referenzkonjugate anhand einer statistischen Verteilung zu nSTV, bf5₁-nSTV, bf5₂-nSTV und bf5₃-nSTV. Analog zu den kovalenten F9-nSTV-Konjugaten **5a**, **6** und **7** wurde bei den Referenzkonjugaten die höchste elektrophoretische Mobilität für bf5₁-nSTV und dann eine abnehmende Mobilität über bf5₂-nSTV zu bf5₃-nSTV erwartet.

Spur 5 wurde mit einem stöchiometrischen Überschuss von bf5 gegenüber nSTV beladen. Es lassen sich zwei Banden im Gel erkennen. Der elektrophoretisch

weniger mobilen Bande wurde bF5₃-nSTV und der mobileren Bande wurde bF5₂-nSTV zugeordnet. In der mit gleichen stöchiometrischen Anteilen von nSTV und bF5 beladenen Spur 6 sind drei Banden zu erkennen. Der mobilsten Bande wurde bF5₁-nSTV, der nächsten Bande bF5₂-nSTV und der langsamsten Bande wurde bF5₃-nSTV zugeordnet. Spur 7 wurde mit einem stöchiometrischen Überschuss von nSTV gegenüber bF5 beladen. Es lassen sich drei Banden im Gel erkennen. Der mobilsten Bande wurde bF5₁-nSTV, der nächste Bande bF5₂-nSTV und der langsamsten Bande wurde bF5₃-nSTV zugeordnet.

Aus den drei, mit nicht kovalenten Referenzkonjugaten beladenen Spuren konnte dann die elektrophoretische Mobilität der kovalenten F9-nSTV-Konjugate abgeleitet werden.

In Spur 1 ist eine Bande (▶) erkennbar, der **5a** zugeordnet wurde. Die Bandenzuordnung erfolgte anhand der vergleichbaren elektrophoretischen Mobilität der Bande von bF5₁-nSTV (siehe Spur 6 und 7). In Spur 2 mit im Vergleich zur Bande von **5a** reduzierter elektrophoretischer Mobilität ist eine breite Bande (▶) zu erkennen, der **6** zugeordnet wurden. Die elektrophoretische Mobilität von **6** ist vergleichbar mit der Referenzprobe bF5₂-nSTV in den Spuren 5 bis 7.

In Spur 3 sind zwei Banden zu erkennen. Der Bande (▶) mit identischer elektrophoretischer Mobilität zur Bande von **6** wurde **5a** mit einem daran gebundenen bF5 (**9**) zugeordnet. Der weniger mobilen Bande (▶) wurde einem Konjugat aus **5a** mit zwei daran gebundenen bF5 (**10**) zugeordnet.

In Spur 4 sind drei Banden zu erkennen. Der elektrophoretisch mobilsten Bande (▶) wurde **6** zugeordnet. Der nächsten Bande (▶) wurde **6** mit einem daran gebundenen bF5 (**11**) zugeordnet. Der langsamsten Bande (▶) wurde ein Konjugat aus **6** mit zwei daran gebundenen bF5 (**12**) zugeordnet.

In Spur 8 sind keine Banden zu erkennen, da nSTV nicht mit Sybr Gold angefärbt werden kann. Auch bei der anschließenden Silberfärbung (Daten nicht gezeigt) waren in Spur 8 keine Banden zu erkennen. Ursache dafür war das Sammelgel mit pH 6,8, in welchem nSTV mit einem pI von 6,4 keine hinreichende Ladung für eine Wanderung im elektrischen Feld der PAGE zeigte.

In Spur K wurde als Kontrolle Rohprodukt der F9-STV-Konjugatsynthese aufgetragen. Hierbei war wegen des geringen Restvolumens der Konjugatlösung eine vorherige Quantifizierung nicht möglich, wodurch die Konzentration abgeschätzt werden musste. Dabei wurde die Kontrollbande überladen. Es lässt sich jedoch eine breite Bande (▶) erkennen, die **5a** und **6** zugeordnet wurde. Die weniger mobile Bande (▶) wurde **7** zugeordnet.

In Spur 9 sind zuvor zusammen inkubierten Spezies **5a** und **5b** aufgetragen. Im Gel ist eine Bande (▶) mit deutlich reduzierter elektrophoretischer Mobilität im Vergleich zu den Spuren 1 bis 7 zu erkennen. Diese Bande wurde der hybridisierten Nanohantel **13** zugeordnet. Zudem lässt sich eine schwache Bande (▶) mit vergleichbarer elektrophoretischer Mobilität zur Bande eines Monokonjugats erkennen, welche nicht hybridisierten **5a** und **5b** zugeordnet wurde.

In Spuren 2 bis 4 und Spur K sind jeweils eine weitere schwache Bande (▶) mit gelelektrophoretischer Mobilität, vergleichbar mit der hybridisierten Nanohanteln, erkennbar. Diesen Banden wurden F9-nSTV-Konjugatdimere $(F9_{1-3-nSTV})_2$ zugeordnet. Die Molmasse, das m/z und der hydrodynamische Radius der Dimere war annähernd identisch zur Nanohantel **13**, wodurch auch die elektrophoretische Mobilität der Nanohanteln annähernd identisch zu $(F9_{1-3-nSTV})_2$ war.

In Spur 2, 4, 5 und K können weiterhin Banden mit zur Gelfront identischer Mobilität erkannt werden. Diesen Banden wurden freien Oligonucleotiden zugeordnet.

Die PAGE der DNA-STV-Konjugate zeigte, dass die Konjugatsynthese von **5a** und **6** erfolgreich war. Die Konjugate hybridisierten an komplementäre DNA-nSTV-Konjugate (**5b**) und banden biotinylierte Oligonucleotide (bF5).

2.1.1.2 DNA-nSTV-SH

nSTV-SH unterscheidet sich von nSTV durch einen rekombinant eingefügten C-Terminalen Cysteinrest. Dabei wurde zur Rekonstitution von nSTV-SH drei Äquivalente nSTV-Monomere mit einem Äquivalent Monomer einer STV-Mutante mit C-Terminalen Cys vereint (zum Prinzip siehe *Abbildung 1.11* ohne anschließende Ni-NTA-Chromatographie). Dabei ergab sich eine statistische Verteilung der Untereinheiten mit C-terminalen Cys über das nSTV-SH. nSTV-SH setzte sich folglich aus einer Proteinmischung zusammen, die sich aus STV-Mutanten mit null bis vier rekombinant eingefügten Cysteinresten zusammensetzte.

Die in *Abbildung 2.7* gezeigte Konjugatsynthese von DNA-STV-SH folgte einer grundsätzlich anderen Vorgehensweise verglichen mit DNA-nSTV. Zunächst wurde ein Amino-modifiziertes Oligonucleotid mittels sSMCC mit einer Maleinsäureimidgruppe derivatisiert. Das modifizierte Oligonucleotid wurde dann an die freie Thiolgruppe des rekombinant eingefügten Cysteinrestes gekuppelt.

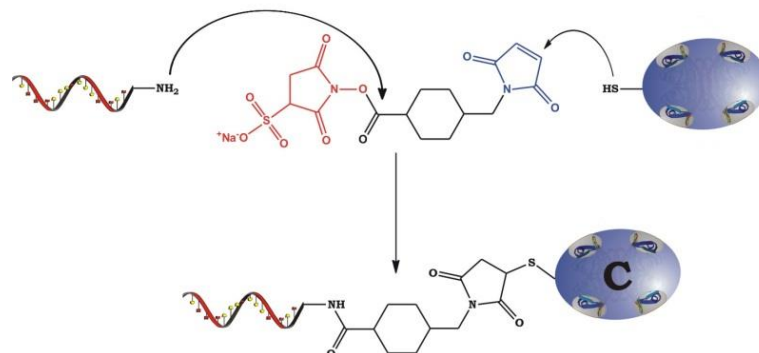


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der DNA-nSTV-SH Konjugatsynthese mit sSMCC. Die Reaktion folgt einem invertierten Ansatz der Reaktion aus *Abbildung 2.2*.

Disulfidbrücken wurden zwischen dem, zuerst von Rabe kloniertem, nSTV-SH mit DTT reduziert. Im nächsten Schritt wurde das Amino-modifizierte Oligonucleotid mit sSMCC derivatisiert. Dann wurden aktiviertes nSTV-SH und modifiziertes Oligonucleotid über Gelfiltrationssäulen aufgereinigt. Die Lösungen wurden für die Konjugatsynthese vereinigt und analog zur Konjugatsynthese von DNA-STV-Konjugaten unter 2.1.1.1 aufgereinigt und gelagert. Das Quenchen der Konjugationslösung vor der FPLC mit Mercaptoethanol entfiel.

Ein repräsentatives Beispiel für die Anionenaustauschchromatographie bei der DNA-nSTV-SH-Konjugatsynthese mit dem Oligonucleotid F9 (F9-nSTV-SH) ist *Abbildung 2.7* gezeigt.

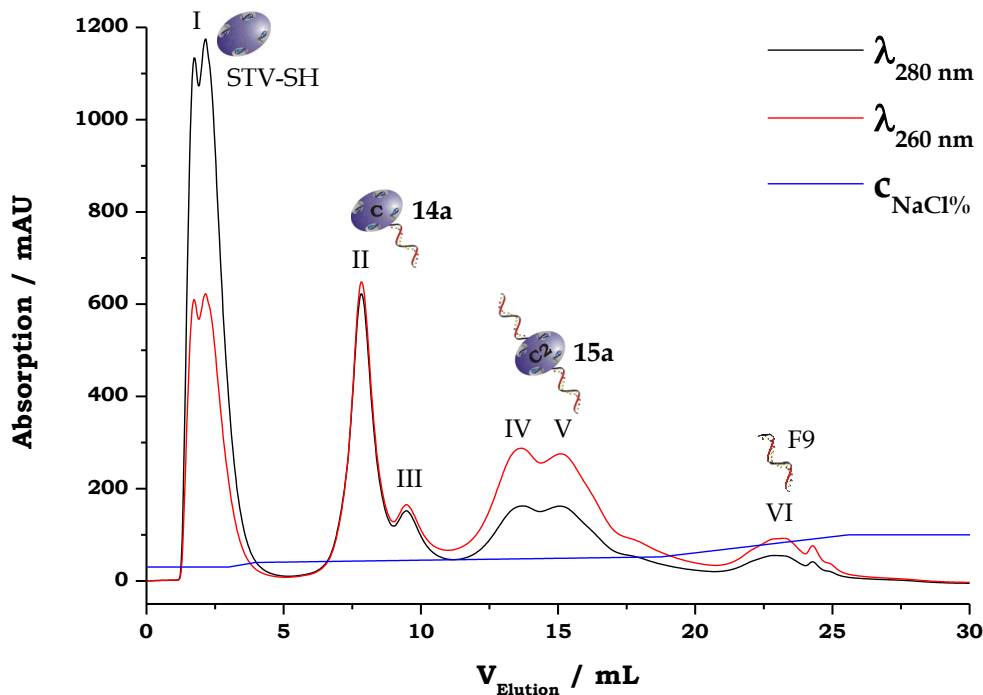


Abbildung 2.8: Repräsentatives Anionenaustauschchromatogramm von einer F9-nSTV-SH-Konjugataufreinigung. I) nicht konjugiertes nSTV-SH, II & III) **14a**, IV & V) **15a** und VI) nicht konjugiertes Oligonucleotid.

In *Abbildung 2.7* treten sämtliche detektierten Peaks als Doppelpicks auf. Dieses Phänomen wurde bei allen DNA-STV-SH-Konjugatsynthesen beobachtet. Dabei blieb das A_{260}/A_{280} -Verhältnis innerhalb eines Doppelpicks konstant, was für ein gleichbleibendes Verhältnis von STV-SH zum Oligonucleotid innerhalb der Lösung unter einem Doppelpick spricht. Eine ausführliche Beschreibung der Nomenklatur ist in der Tabelle in Kapitel 8 abgebildet.

Peak I wurde nicht konjugierten nSTV-SH zugeordnet. Peak II/III wurde als **14a** identifiziert, was sich auch an dem für Monokonjugat charakteristischen A_{260}/A_{280} -Wert von ≈ 1 erkennen ließ. Peak IV/V wurde **15a** zugeordnet, wobei ein A_{260}/A_{280} -Wert von > 1 charakteristisch für ein höhervalentes Konjugat ist. Die Schulter von Peak V deutete auf Anteile eines DNA-nSTV-SH-Trikonjugat hin.

Peak VI wurde anhand der Elution bei ca. 0.75 mol/L NaCl und des A_{260}/A_{280} -Wertes von ≈ 2 nicht konjugiertem F9 zugeordnet.

Die DNA-nSTV-SH-Konjugatsynthese resultierte in Mono- (**14**) und Bikonjugaten (**15**). Ursache für die Bildung von **5** und **6** war das eingesetzte nSTV-SH, welches eine statistische Verteilung von Untereinheiten mit C-terminalen Cys aufwies. Dabei führte die Konjugation von sSMCC-derivatisierten Oligonucleotid mit nSTV-SH mit einem C-terminalen Cysteinrest nSTV-(SH)₁ zu **14** und mit nSTV-SH mit zwei C-terminalen Cysteinresten nSTV-(SH)₂ zu **15**.

Bei der DNA-nSTV-SH-Konjugatsynthese wurden isolierte Ausbeuten von $7.2\% \pm 0.7\%$ für das Monokonjugat **14** und $1.8\% \pm 0.8\%$ für das Bikonjugat **15** erzielt.

Die F9-nSTV-SH-Konjugate wurden mittels ndPAGE charakterisiert. Dafür wurden jeweils 2 pmol **14a**, **15a** und als Kontrolle bf5 sowie **14a** inkubiert mit einem und vier äquivalenten bf5 in die Geltaschen geladen. Alle Proben wurden vor der Elektrophorese mit 6x Orange DNA Loading Dye gemischt. Das zugehörige Gel ist in *Abbildung 2.9* gezeigt.

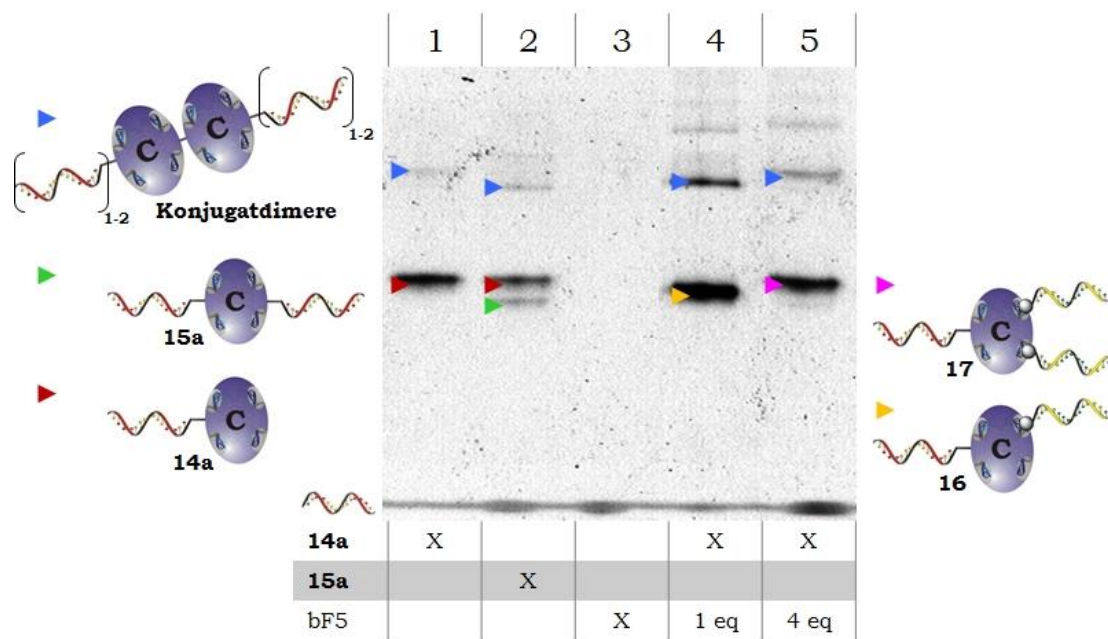


Abbildung 2.9: 8.5% ndPAGE von F9-nSTV-SH und cF9-nSTV-SH nach Anfärben mit Sybr Gold; **Spur 1: 14a**, **Spur 2: 15a**, **Spur 3: bf5**, **Spur 4: 14a + 1 eq bf5**, **Spur 5: 14a + 4 eq bf5**.

In Spur 1 wurde Probe aus den Fraktionen unter Peak II/III im FPLC-Chromatogramm in *Abbildung 2.7* aufgetragen. Es ist in Spur 1 eine scharfe Bande (▶) zu erkennen, der **14a** zugeordnet wurden. Zusätzlich lässt sich eine weniger intensive Bande (►) mit geringerer gelelektrophoretischer Mobilität in Spur 1 erkennen. Wie schon bei DNA-nSTV-Bikonjugat (Spur 2) in *Abbildung 2.6* wurden dieser Bande dem Konjugatdimer (**14a**)₂ zugeordnet, die vermutlich die Ursache für die, bei der FPLC beobachteten, Doppelpeaks waren.

In Spur 2 wurden Proben aus den Fraktionen unter Peak IV/V der Anionenaustauschchromatographie in *Abbildung 2.8* aufgetragen. Die elektrophoretisch mobilste Bande (▶) wurde **15a** zugeordnet. Der Bande (►) mit identischer elektrophoretischer Mobilität zur Hauptbande aus Spuren 1 wurde **14a** zugeordnet. Zudem lassen sich in Spur 2 eine Bande (►) mit reduzierter Mobilität erkennen, welcher (**15a**)₂ zugeordnet wurden. Da die ausreichende Peaktrennung bei der Anionenaustauschchromatographie eine hinreichende Auftrennung zwischen **14a** und **15a** erwarten lässt, lassen die Anteile von **14a** und freien Oligonucleotiden (siehe Gelfront) in Spur 2 schlussfolgern, dass **15a** bei der Lagerung in **14a** und freie Oligonucleotide zerfällt.

In Spur 3 wurde bF5 als Kontrolle aufgetragen, die Oligonucleotide zeigten erwartungsgemäß eine zur Gelfront identische Mobilität. Weitere Banden von freien Oligonucleotiden lassen sich in den Spuren 2, 4 und 5 erkennen.

In Spur 4 wurde **14a**, das zuvor mit einem Äquivalent bF5 inkubiert wurde, aufgetragen. Im Vergleich zu Bande (►) von **14a** in Spur 1 ist eine breite Bande (►) mit gesteigerter Mobilität zu erkennen, der Monokonjugat mit einem gebundenem bF5 (**16**) zugeordnet wurde. Daran lässt sich erkennen, dass die elektrophoretische Mobilität in der Folge der Bindung eines biotinylierten Oligonucleotid an ein DNA-nSTV-SH-Monokonjugat stieg. Eine weitere Bande mit reduzierter Mobilität (►) wurde Konjugatdimeren mit zusätzlich gebundenen bF5 (**16**)₂ zugeordnet. Diese Bande wurde im Vergleich zur Konjugatdimer-Bande in Spur 1 intensiver angefärbt, weil die größere Anzahl enthaltener Oligonucleotide mehr Cybr Gold interkalieren ließ.

In Spur 5 wurde **5a** aufgetragen, welches zuvor mit vier Äquivalenten bF5 inkubiert wurde. Es lässt sich eine intensive Bande (►) mit gegenüber der Bande von **16** reduzierter Mobilität erkennen. Dieser Bande wurde **17** zugeordnet. Daraus ließ sich erkennen, dass in Folge der Bindung von mehr als einem bF5 an **5a** die elektrophoretische Mobilität reduziert wurde. Wie schon in der vorherigen Spur kann zudem die Bande (►) eines Konjugatdimers (**17**)₂ erkannt werden.

Bei der Konjugatsynthese von DNA-nSTV-SH-Konjugaten wurden in Folge der invertierten Reaktionsführung keine Konjugatdimere erwartet, jedoch zeigte die ndPAGE-Charakterisierung der DNA-nSTV-SH-Konjugaten deutlich Anteile von Dimeren (siehe ► in *Abbildung 2.9*). Die Konjugatsynthese folgte einem Ansatz, bei dem zunächst ein Amino-modifiziertes Oligonucleotid mittels sSMCC mit einer Maleinsäureimidgruppe derivatisiert wurde. Das modifizierte Oligonucleotid wurde dann an die freie(n) Thiolgruppe(n) von nSTV-SH gekuppelt.

Eine chemische Verknüpfung von nSTV-SH in Folge der Konjugatsynthese war unwahrscheinlich, eine mögliche Ursache für die Entstehung von Konjugatdimeren war die Bildung von Disulfidbrücken zwischen zwei C-terminalen Cysteinresten der nSTV-SH-Untereinheiten. Derartig gebildete nSTV-SH-Dimere waren zudem eine mögliche Ursache für die Doppelpeaks bei der Anionenaustauschchromatographie in *Abbildung 2.8*.

Die ndPAGE-Charakterisierung von F9-nSTV-SH-Konjugaten zeigte ein von den DNA-nSTV-Konjugaten abweichende elektrophoretische Mobilität von Monokonjugat (**14**) gegenüber Bikonjugat (**15**). Dabei wurde die höchste elektrophoretische Mobilität für **14** beobachtet. Ebenso zeigte ein F9-nSTV-SH-Monokonjugat mit einem gebundenen, biotinylierten Oligonucleotid (**16**) eine höhere Mobilität als **14** erkennen.

Diese Beobachtung weicht von der elektrophoretischen Mobilität von DNA-nSTV-Konjugaten ab, wo eine Reduktion der Mobilität als Folge der Bindung weiterer Oligonucleotide beobachtet wurde (siehe *Abbildung 2.6*). Das m/z-Verhältnis von DNA-nSTV-SH-Konjugaten und DNA-nSTV-Konjugaten ist annähernd identisch, woraus sich schlussfolgern lässt, dass die unterschiedliche elektrophoretischen Mobilität von einem abweichendem hydrodynamischen Volumen verursacht wird. Bei **6** und **9** führt das gesteigerte hydrodynamische Volumen zu einer Reduktion der Mobilität gegenüber **5**. Bei **15** und **16** steigt das hydrodynamische Volumen in Folge der Bindung eines zweiten Oligonucleotids weniger als bei DNA-nSTV-Konjugaten, so dass die damit verbundene Ladungssteigerung zu einem Anstieg der elektrophoretischen Mobilität führt. Bei beiden Konjugattypen konnte bei den Trikonjugaten (**10** und **11** bzw. **16**) eine Reduktion der elektrophoretischen Mobilität gegenüber der Bikonjugate beobachtet werden. Damit folgen hier beide Konjugattypen dem in der Literatur^[44] beschriebenen Verhalten, dass der größere hydrodynamische Radius mit ansteigender Anzahl gebundener Oligonucleotide zu einer Reduktion der Mobilität führt.

Eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen hydrodynamischen Volumen von **15** und **16** gegenüber **6** und **9** ist die Bindung über den rekombinant eingefügten C-terminale Cysteinrest bei nSTV-SH. Dieser ragt weit aus der STV-SH-Oberfläche (siehe orange markierten C-Terminus in der Oberflächenstruktur von STV unter *Abbildung 2.1*). Dadurch hat das nach der Konjugation kovalent an den C-Terminus gebundene Oligonucleotid mehr Freiheitsgrade als ein über Oberflächenamine gebundenes Oligonucleotid. Wie in *Abbildung 2.10* gezeigt, können die Aminosäuren am C-Terminus bei DNA-STV-SH-Konjugaten als eine Art Spacer betrachtet werden, wodurch sich das Oligonucleotid in **15** und **16** näher an das Protein orientieren kann. Als Konsequenz des beweglicheren, kovalent gebundenen Oligonucleotids steigt das hydrodynamische Volumen bei DNA-nSTV-SH-Bikonjugaten weniger als bei DNA-nSTV-Bikonjugaten. Wird ein weiteres Oligonucleotid gebunden (siehe ► in *Abbildung 2.9*), führte die Abstoßung der negativen Ladung der Oligonucleotide zur Einschränkung der Freiheitsgrade, wodurch eine reduzierte elektrophoretische Mobilität von **17** gegenüber der DNA-nSTV-SH-Bikonjugate beobachtet wurde.

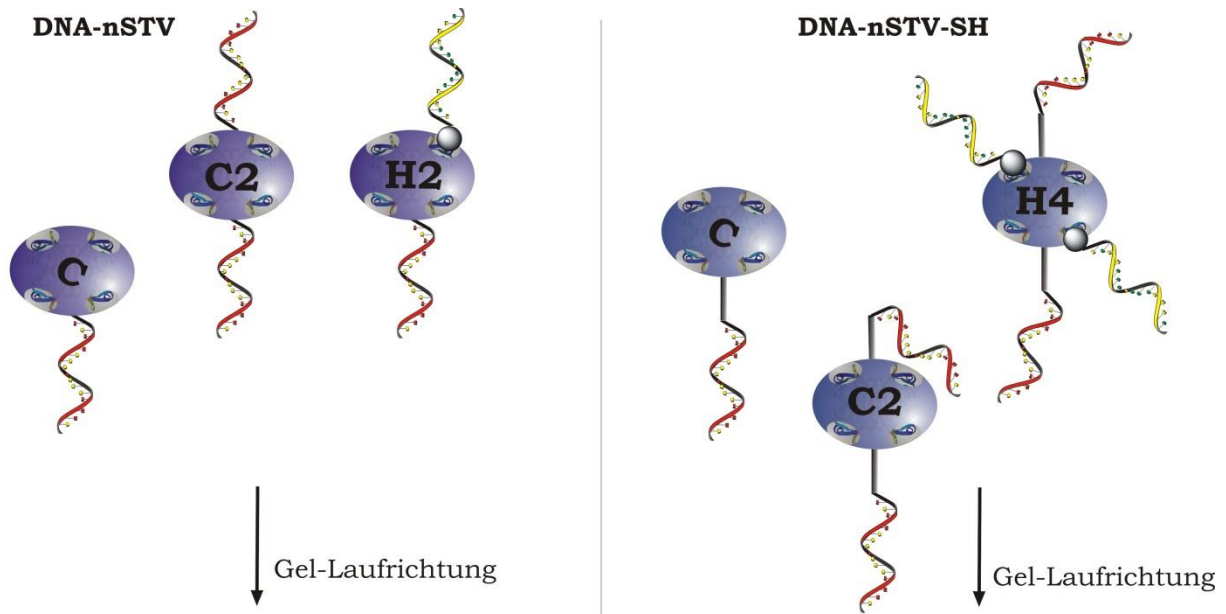


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung von DNA-nSTV (links) und DNA-nSTV-SH (rechts) bei der ndPAGE: Infolge der steigenden Anzahl gebundener Oligonucleotide (kovalent: jeweils mittig oder über Biotin-STV-Wechselwirkungen jeweils rechts; das H auf dem STV-Schemata bezeichnet die hybriden Bindungen) an den DNA₁-nSTV sinkt die gelelektrophoretischer Mobilität. Bei DNA-nSTV-SH fungieren die Aminosäuren am C-Terminus als Spacer, wodurch ein zweites, kovalent gebundenes Oligonucleotid sich näher an das Protein orientieren kann und dadurch das hydrodynamische Volumen weniger steigt. Werden weitere biotinylierte Oligonucleotide gebunden, führt die gesteigerte negative Ladungsdichte am nSTV-SH zu einer Orientierung der Oligonucleotide vom Protein weg und damit zu einer gesteigerten Raumerfüllung, welche die Mobilität reduziert.

Die Konjugatsynthese von DNA-STV-SH-Konjugaten bot somit gegenüber DNA-nSTV-Konjugaten keinen erkennbaren Vorteil. Die Gesamtausbeute der Konjugatsynthese war deutlich geringerer als bei DNA-nSTV und nach der Konjugation wurden ebenfalls Konjugatdimere beobachtet.

2.1.1.3 DNA-STV-TCH

STV-TCH setzt sich aus drei nSTV-Monomeren und einem STV-Monomer mit einer Schnittstelle für „Tobacco Etch Virus“-Protease (TEV-Schnittstelle)^[167], C-terminalem Cys und His₆-Tag zusammen (STV-TCH-Monomer). Die Rekonstitution des STV-TCH-Tetramer erfolgte analog zu nSTV-SH aus drei Äquivalenten nSTV-Monomeren und einem Äquivalent STV-TCH-Monomer. Im Gegensatz zu STV-SH konnte das STV-TCH von Mutanten mit keinem oder mehr als einem STV-TCH-Monomeren durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie abgetrennt werden. Die Expression und Aufreinigungsstrategie erfolgte damit analog zu mSTV nach Howarth *et al.* (siehe 1.1.2). Damit wurde bei der in *Abbildung 2.11* gezeigten Konjugatsynthese von DNA-STV-TCH-Konjugat eine STV-Mutante mit genau einem rekombinant eingefügten C-terminalen Cysteinrest verwendet.

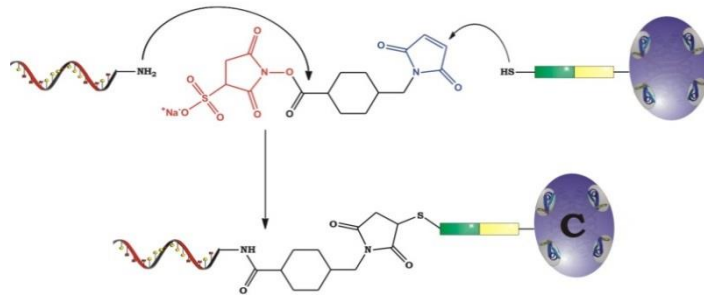


Abbildung 2.11: Schematische Darstellung der DNA-STV-TCH-Konjugatsynthese (der grün-gelbe Spacer stellt die TEV-Bindestelle und den His₆-Tag da) mit sSMCC. Die Synthesestrategie entspricht der DNA-STV-SH-Konjugatsynthese aus *Abbildung 2.7*.

Die DNA-STV-TCH-Konjugatsynthese (siehe 2.1.1.3) entsprach der DNA-STV-SH-Konjugatsynthese. Abweichend dazu wurde STV-TCH mit der halben Stoffmenge DTT aktiviert und zwei Äquivalenten STV-TCH wurden für die Konjugation mit einem Äquivalenten Amino-modifiziertem Oligonucleotid vereint.

Ein repräsentatives Beispiel für die Anionenaustauschchromatographie bei der Konjugatsynthese von DNA-nSTV-TCH-Konjugat ist in *Abbildung 2.12* gezeigt.

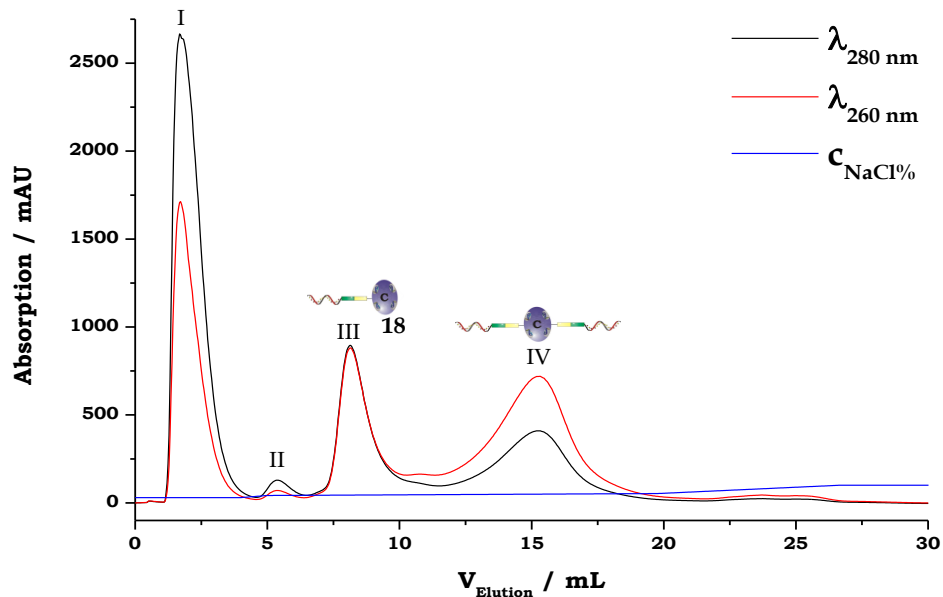


Abbildung 2.12: Repräsentatives Anionenaustauschchromatogramm von einer F1-STV-TCH-Konjugataufreinigung. I) nicht konjugiertes STV-TCH, II) Dimer von STV-TCH III) F1-STV-TCH-Monokonjugat **18** und IV) F1-STV-TCH-Bikonjugat.

Im FPLC Chromatogramm in *Abbildung 2.12* wurde Peak I nicht konjugiertem STV-TCH zugeordnet.

Bei Peak II wurde ein zu Peak I identischer A_{260}/A_{280} -Wert bestimmt. Analog zur Beobachtung von Dimeren von nSTV-SH unter 2.1.1.2 wurde Peak II als Dimer von STV-TCH identifiziert. Dimere von STV-TCH konnten mit sSMCC-derivatisierten Oligonucleotid nicht reagieren, da der freie Cystenrest nach Ausbildung der Disulfidbrücken für eine Konjugation nicht mehr zur Verfügung stand. Dieses ließ

sich auch daran erkennen, dass entgegen dem Chromatogramm von DNA-nSTV-SH keine weiteren Doppelpeaks der Konjugate zu erkennen sind.

Peak III wurde dem F1-STV-TCH-Monokonjugat **18** zugeordnet. Die NaCl-Konzentration unter Peak III und ein A_{260}/A_{280} -Wert von ≈ 1 sind typisch für die Elution eines Monokonjugats.

Peak IV wurde einem F1-STV-TCH-Bikonjugat zugeordnet. Dabei ließ der A_{260}/A_{280} -Wert von > 1 einen höheren Anteil von Oligonucleotiden im Eluenten erkennen. Eine mögliche Ursache für die Bildung von Bikonjugat waren Anteile von STV-TCH mit zwei Cysteinresten, die bei der Ni-NTA-Affinitätschromatographie nicht abgetrennt wurden.

Die weitere Charakterisierung von **18** und dem Konjugat unter dem Peak IV (F1-STV-TCH_{PeakIV}) der Anionenaustauschchromatographie von F1-STV-TCH-Konjugat erfolgte mittels SDS-PAGE und ndPAGE. Ergänzend wurde die Lagerstabilität durch den Vergleich von unmittelbar dargestelltem (t_{1d}) und einen Monat bei 4 °C gelagertem (t_{30d}) F1-STV-TCH-Konjugat verglichen.

Für die SDS-PAGE Analyse wurden jeweils 15 pmol **18**, Probe aus der Fraktion unter Peak IV nach t_{30d} und nach t_{1d} und als Kontrolle nSTV und STV-TCH mit 4x SDS-Probenpuffer gemischt und in die Geltaschen geladen. Dabei wurde je eine Geltasche mit nicht denaturierten und eine Geltasche mit thermisch denaturierten Proben beladen. Das zugehörige Gel ist in *Abbildung 2.13* gezeigt.

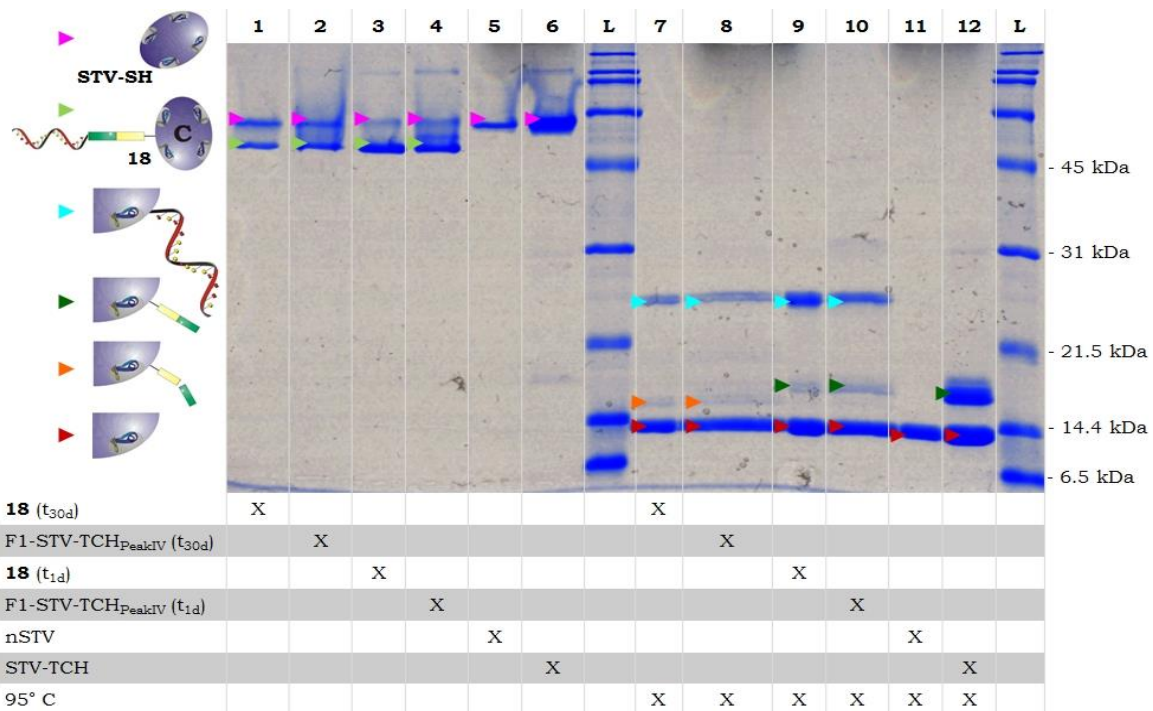


Abbildung 2.13: SDS-PAGE von F1-STV-TCH-Konjugat nach Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blau; **Spur 1:** **18** nach 30 d, **Spur 2:** Peak IV nach 30 d, **Spur 3:** **18** nach 1 d, **Spur 4:** Peak IV nach 1 d, **Spur 5:** nSTV, **Spur 6:** STV-TCH, **Spur 7:** **18** nach 30 d @95 °C, **Spur 8:** Peak IV nach 30 d @95 °C, **Spur 9:** **18** nach 1 d @95 °C, **Spur 10:** Peak IV nach 1 d @95 °C, **Spur 11:** nSTV @95 °C, **Spur 12:** STV-TCH @95 °C und **L:** Protein-Größenstandard.

Bei der SDS-Analyse von F1-STV-TCH-Konjugaten in *Abbildung 2.13* lassen sich in Spur 1 zwei Banden mit ähnlicher Intensität erkennen. Die elektrophoretisch mobilere Bande (▶) wurde **18** zugeordnet. Der andere Bande (►) wurde STV-TCH zugeordnet, deren Mobilität den Banden von nSTV und STV-TCH in den Spuren 5 und 6 entsprach. Als Ursache für den großen Anteil STV-TCH ließ sich vermuten das Anteile von **18** bei der 30tägigen Lagerung in STV-TCH und F1 aufgespalten wurden. Dieses Phänomen kann bei allen Proben mit F1-STV-TCH-Konjugat beobachtet werden. Es wurde vermutet, dass F1-STV-TCH-Konjugate eine hohe Empfindlichkeit gegen Proteasen aufweisen, welche vorwiegend im Bereich des rekombinanten modifizierten C-Terminus die Aminosäurekette spalten. Aus Zeitgründen konnte dieses Phänomen jedoch nicht genau geklärt werden.

Die Bandenzuordnung in den Spuren 2 bis 4 erfolgte analog zu Spur 1. Der mobilere Bande (▶) wurde **18** zugeordnet und der anderen Bande (►) STV-TCH. In den Spuren 3 und 4 mit unmittelbar konjugierter Probe lässt sich erkennen, dass die Bande (▶) von **18** deutlich intensiver ist als die Bande von freiem STV-TCH. Daraus ließ sich erkennen, dass bei der Lagerung bei 4 °C F1₁-STV-TCH in seine Edukte zerfiel. Zudem lässt sich erkennen, dass die Banden aus den Fraktionen unter Peak IV verschmiert sind.

In Spur 5 ist eine Bande (►) zu erkennen, der nSTV zugeordnet wurde. In Spur 6 ist eine intensive Bande (►) mit identischer Mobilität zur nSTV Bande zu erkennen. Diese Bande wurde als STV-TCH identifiziert, dabei konnte der Unterschied der elektrophoretischen Mobilität zwischen nSTV und STV-TCH bei den nicht denaturierten Proben bei der SDS-Page aufgrund eines annähernd identischen m/z-Verhältnisses und eines fast identischen hydrodynamischen Volumen nicht erkannt werden.

Eine weitere schwache Bande mit geringer Mobilität als die bereits diskutierten Banden ist in Spur 2, 3, 4 und 6 zu erkennen. Dieser Bande wurde Dimeren STV-TCH zugeordnet.

In Spur 7 sind drei Banden zu erkennen. Der intensiven, mobilsten Bande (►) wurden nSTV-Monomere zugeordnet. Die nächste schwache Bande (▶) wurde als STV-TCH-Monomer nach dem spalten von **18** zugeordnet. Dabei lässt sich erkennen, dass nach der Abspaltung des Oligonucleotids die Molmasse des STV-TCH-Monomers verglichen mit STV-TCH-Monomeren vor der Konjugatsynthese (siehe ▶ in Spur 12) abgenommen hat. Dies legt nahe, dass die Bindung im Bereich der rekombinanten Modifikation am C-Terminus gespalten wurde. Eine dritte Bande ist in einem Bereich oberhalb des Protein-Größenstandard von 21.5 kDa (▶) zu erkennen, welche STV-TCH-Monomeren gekuppelt mit F1 zugeordnet wurde.

In Spur 8 sind zu Spur 7 identische Banden zu erkennen. Darum erfolgte eine zur Spur 7 analoge Bandenzuordnung. In Spur 8 fällt eine intensive Bandenverbreitung auf.

In Spur 9 sind erneut drei Banden zu erkennen. Die Banden des nSTV-Monomers (▶) und F1-konjugiertem STV-TCH-Monomers (►) wurden analog zu Spur 7 und 8 zugeordnet. In Spur 9 wurde ein deutlich größerer Anteil der STV-TCH-Monomere gekuppelt mit F1, als bei den Proben nach 30 Tagen Lagerung beobachtet. Daraus ließ sich erkennen, dass die frisch angesetzte Probe zu einem großen Anteil **18** enthielt. Die dritte Bande (►) wurde durch den Vergleich mit Spur 13 als nicht konjugierten STV-TCH identifiziert.

In Spur 10 sind zu Spur 9 identische Banden zu erkennen, so dass eine analoge Bandenzuordnung zur Spur 9 erfolgte. Erneut ist bei der SDS-PAGE der Proben aus den Fraktionen unter Peak IV eine Bandenverbreiterung zu erkennen.

In Spur 11 ist eine Bande (▶) zu erkennen, der nSTV-Monomere zugeordnet wurde.

In Spur 12 sind zwei Banden zu erkennen. Der mobileren Bande (▶) wurden nSTV-Monomere zugeordnet. Der zweiten Bande (►) wurden STV-TCH-Monomere zugeordnet. Die bei der SDS-PAGE beobachtete Molmasse von mehr als 16 kDa eines STV-TCH-Monomer entspricht der erwarteten Molmasse von ca. 15.5 kDa.

Bei der SDS-PAGE ließ sich die Aufspaltung von **18** in STV und F9 nach der 30tägigen Lagerung gut erkennen. Die erfolgreiche Konjugatsynthese konnte anhand der gesteigerten Masse von F1-konjugierten STV-TCH-Monomeren (►) im Vergleich zu STV-TCH-Monomeren (►) erkannt werden. Bei der SDS-PAGE Analyse ließ sich kein Unterschied in der Zusammensetzung von **18** und F1-STV-TCH_{PeakIV} erkennen. Die bei der Anionenaustauschchromatographie (siehe *Abbildung 2.12*) vermuten Zuordnung von Peak IV als F9-STV-TCH-Bikonjugat wurde durch die SDS-PAGE nicht bestätigt. Die SDS-PAGE zeigte, dass unter Peak III und IV **18** eluiert.

Um die Elution von **18** unter zwei getrennten Peaks bei der Anionenaustauschchromatographie weiter zu untersuchen, wurden **18** aus den FPLC-Peaks III (**18_{III}**) und IV (**18_{IV}**) mittels ndPAGE weitercharakterisiert. Dafür wurden unmittelbar konjugierte DNA-STV-TCH-Konjugate verwendet, um die Messergebnisse nicht mit aufgespaltenen Konjugate zu verunreinigen.

Dafür wurden jeweils 2 pmol (**18_{III}**), (**18_{IV}**) und zur Kontrolle der Biotinbinde-Eigenschaften (**18_{III}**) (**18_{IV}**) für 30 min inkubiert mit einem bzw. vier Äquivalenten biotinylierten Oligonucleotid (bF10) sowie Rohprodukt der F9-STV-TCH-Konjugatsynthese mit 6x Orange DNA Loading Dye gemischt und in die Geltaschen geladen. Das zugehörige ndGel ist in *Abbildung 2.14* dargestellt.

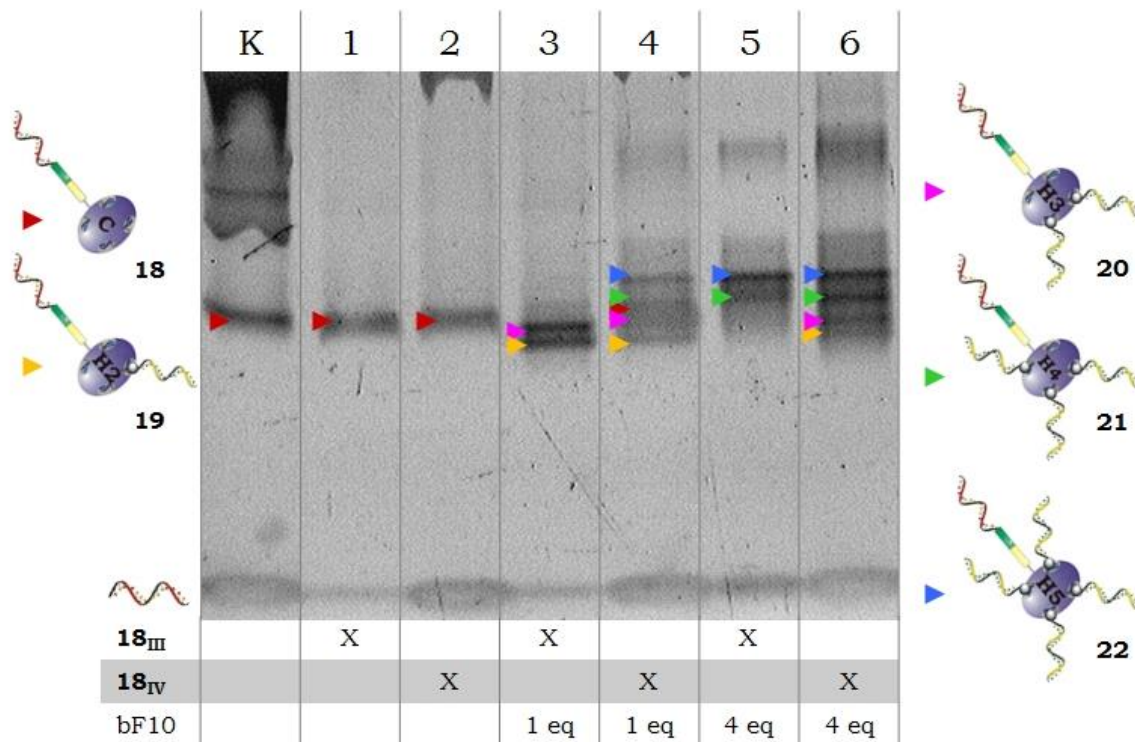


Abbildung 2.14: 7.5% ndPAGE von (**18_{III}**) und IV (**18_{IV}**) nach Anfärben mit Sybr Gold; **Spur K:** Rohprodukt der F9-STV-TCH-Konjugatsynthese, **Spur 1:** **18_{III}**, **Spur 2:** **18_{IV}**, **Spur 3:** **18_{III}** + 1 eq bF10, **Spur 4:** **18_{IV}** + 1 eq bF10, **Spur 5:** **18_{III}** + 4 eq bF10, **Spur 6:** **18_{IV}** + 4 eq bF10.

In Spur K ist eine Bande (▶) zu erkennen, der **18** zugeordnet wurde. Zusätzlich lassen sich mehrere verschmierte Banden mit verglichen zur Bande von **18** reduzierter Mobilität erkennen. Der verschmierte Bereich wurde Aggregaten der F9-STV-TCH-Konjugatsynthese zugeordnet. Es lässt sich erkennen, dass diese Aggregate nur teilweise in die Poren des 7.5% Trenngels wandern können und in den Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie von **18_{III}** erfolgreich abgetrennt wurden.

In Spur 1 ist eine Bande (▶) zu erkennen, die wie schon bei der SDS-PAGE in *Abbildung 2.13* **18** zugeordnet wurde.

In Spur 2 ist eine Bande (▶) mit identischer gelektrophoretischer Mobilität wie die Bande in Spur 1 zu erkennen. In Peak IV eluierte somit ebenfalls **18**. Zudem konnte in Spur 2 auf Höhe der Gelfront die Bande von nicht konjugiertem F1 identifiziert werden. Zusätzlich ließ sich an der oberen Kante des Trenngels ein verschmierter Bereich erkennen, der wie in Spur K aggregiertem Konjugat zugeordnet wurde. Folglich eluierte bei der FPLC-Aufreinigung (siehe *Abbildung 2.12*) unter Peak IV möglicherweise teilweise aggregiertes **18** zusammen mit daran adsorbierten F1-Oligonucleotid.

In Spur 3 sind zwei Banden mit gesteigerte Mobilität verglichen mit der Bande von **18** zu erkennen. Der mobileren Bande (▶) wurde **18** mit einem gebundenen bF10 (**19**) und der zweiten Bande (▶) wurde **18** mit zwei gebundenen bF10 (**20**) zugeordnet. Die genaue Zuordnung der elektrophoretischen Mobilität von **19** und **20** erfolgte nach der im Anhang unter *Abbildung 7.7* gezeigten nPAGE von **18**.

Ursache für die gesteigerte elektrophoretische Mobilität dieser höheren Konjugate gegenüber **18** war der Anstieg des m/z-Verhältnis bei einer nur geringeren Steigerung des hydrodynamischen Volumens. Analog zu der in *Abbildung 2.10* gezeigten Hypothese über das elektrophoretische Mobilitäten von DNA-STV- gegenüber DNA-STV-SH-Konjugaten, führt die Bindung von weiteren Oligonucleotiden an **18** zunächst zu einer Steigerung der Mobilität. So kann erneut die Aminosäuresequenz des rekombinant eingeführten C-terminalen Cysteinrest mit TEV-Schnittstelle und His₆-Tag als zusätzlicher Spacer betrachtet werde. Diese aus den Aminosäuren des C-Terminus aufgebaute Spacer führt zu mehr Freiheitsgrade des kovalent gebundenen Oligonucleotids in DNA-STV-TCH-Konjugaten im Vergleich zu über Oberflächenamin gebundene Oligonucleotide bei DNA-nSTV-Konjugaten.

In Spur 4 lässt sich ein deutlicher Unterschied im Biotin-Bindevverhalten von **18_{III}** und **18_{IV}** erkennen. Es lassen sich fünf, teilweise überlagernde Banden erkennen. Analog zur in *Abbildung 2.10* gezeigten Annahme wurde den Banden nach sinkender elektrophoretischer Mobilität **19** (▶), **20** (▶) **18** (▶), **21** (▶) und **22** (▶) zugeordnet. Eine mögliche Ursache für das von Spur 3 abweichende Bandenmuster ließ sich in den Anteilen des teilweise aggregierten **18** vermuten. Durch die aggregierten Konjugate ergab sich eine andere Verteilung der biotinylierten Oligonucleotide zum eingesetzten DNA-STV-TCH-Konjugat, wobei sich die stöchiometrische Mitte zu einer höheren Anzahl von bF10 pro **18** verschob. Eine weitere mögliche Zuordnung für die elektrophoretisch weniger mobilen Banden (▶ und ▶) waren Konjugate aus b10 und STV-TCH, welches aus der Spaltung von **18** entstanden war.

In Spur 5 lassen sich zwei Banden mit, verglichen zur Bande von **18**, reduzierter Mobilität aufweisen. Der mobileren Banden (▶) wurde **21** und der anderen Bande (▶) wurde **22** zugeordnet. In Spur 5 lässt sich erkennen, dass **18** bis zu vier biotinylierte Oligonucleotide binden konnte. Dieses Biotinbindevverhalten wurde bei **5** (siehe *Abbildung 2.6*, Spur 5) nicht beobachtet. Das kovalent über ein rekombinant eingeführten C-terminalen Cysteinrest mit TEV-Schnittstelle und His₆-Tag gebundene Oligonucleotid schirmte das Konjugat weniger sterisch ab, so dass eine größere Anzahl biotinylierter Oligonucleotide binden konnten.

In Spur 6 lässt sich eine Bandenverteilung analog zu Spur 4 erkennen. Dabei wurden die Banden von **19** (▶), **20** (▶) **21** (▶) und **22** (▶) identifiziert. Die Banden von DNA-STV-TCH-Konjugaten mit nur einem (▶) oder zwei (▶) gebundenen biotinylierten Oligonucleotiden lassen vermuten, dass Anteile der DNA-STV-TCH-Konjugate (**18_{IV}**) in Spur 6 eine geringere Anzahl von biotinylierten Oligonucleotiden binden können als die DNA-STV-TCH-Konjugate (**18_{III}**) in Spur 5. Eine mögliche Ursache dafür war ein höherer sterischer Anspruch und der Verlust von Biotinbindestelle bei **18_{IV}** infolge partieller Aggregation der Konjugate.

Zudem kann in Spur K, 2, 4, 5 und 6 eine Bande mit zur Gelfront identischer Mobilität erkannt werden, die freien Oligonucleotiden zugeordnet wurde.

Die Banden freier Oligonucleotide in den Spuren K, 2, 4, 5, 6 und die Bande von abgespaltenem STV-TCH in Spur 4 der SDS-PAGE in *Abbildung 2.13*, lassen vermuten, dass die Probelösung **18_{vi}** freies STV enthält. Dieses freie STV könnte mit bF10 nicht kovalente DNA-STV-Konjugate bilden, die anschließend bei der ndPAGE ebenfalls im Gel wandern und mit Sybr Gold angefärbt werden (vergleiche Bande 5 bis 7 in *Abbildung 2.6*). Diese nicht kovalenten Konjugate könnten eine mit den DNA-STV-TCH-Konjugaten vergleichbare elektrophoretische Mobilität aufweisen, wodurch die Gelbanden überlagern. Darum muss deutlich darauf hingewiesen werden, dass die Zuordnungen aufgrund der Vielzahl möglicher gebildeter Konjugatspezies mit einem Unsicherheitsfaktor verbunden sind.

Bei der ndPAGE wurde deutlich, dass sowohl in Peak III als auch in Peak IV der Anionenaustauschchromatographie (siehe *Abbildung 2.12*) das DNA-STV-TCH-Monokonjugat (**18**) eluierte. Dabei lag das Konjugat in den Fraktionen unter Peak III hoch rein vor, während es in den Fraktionen unter Peak IV zusammen mit aggregierten Konjugaten und ungebundenen Oligonucleotiden eluierte. Eine mögliche Ursache für die Bildung dieser Aggregate aus teilweise denaturierten DNA-STV-TCH-Konjugaten war die Aktivierung von STV-TCH mit DTT. Die zur Reduktion von Disulfidbrücken gewählten Reaktionsbedingungen könnten zur Denaturierung von Anteilen STV-TCH geführt haben. Für eine weitere Verwendung zur Assemblierung von supramolekularen DNA-STV-Nanostrukturen wurde nur das hoch reine **18** aus den Fraktionen unter Peak III verwendet.

Bei der DNA-STV-TCH-Konjugatsynthese wurden isolierte Ausbeute von $15.7\% \pm 1.4\%$ für das Monokonjugat in **18_{iii}** und $1.5\% \pm 0.6\%$ für **18_{iv}** erzielt. Verglichen mit den Flächen unter den Peaks im FPLC Chromatogramm in *Abbildung 2.12* wurde ein geringerer Unterschied bei der Ausbeute von **18_{iii}** und **18_{iv}** erwartet. Eine mögliche Ursache für den Ausbeutenunterschied war das Ausfallen von großen Anteilen der aggregierten Konjugate in den Fraktionen unter Peak IV beim Aufkonzentrieren und Umpuffern.

2.1.1.4 DNA-mSTV

DNA-mSTV erlaubte gegenüber Konjugaten auf Basis von vier Biotin-bindenden STV-Mutanten, die Bindung zu einem einzelnen biotinylierten Molekül. Auf dieser Bindeeigenschaft basierend sollten DNA-mSTV-Konjugate als zentraler Baustein für die Assemblierung von supramolekularen DNA-Protein-Nanostrukturen (siehe **1**, **2** und **3** *Abbildung 1.14*) verwendet werden. Eine Verwendung von vier Biotin-bindenden STV-Mutanten hätte einen mit einer Polymerisation vergleichbaren Effekt und würde in schwerlöslichen Aggregaten resultieren. Die Zielsetzung der DNA-mSTV-Konjugatsynthese bestand in der Bereitstellung von aufgereinigten DNA-mSTV-Monokonjugat **23** und DNA-mSTV-Bikonjugat **24** als Bausteine für die Assemblierung von supramolekularen DNA-Protein-Nanostrukturen.

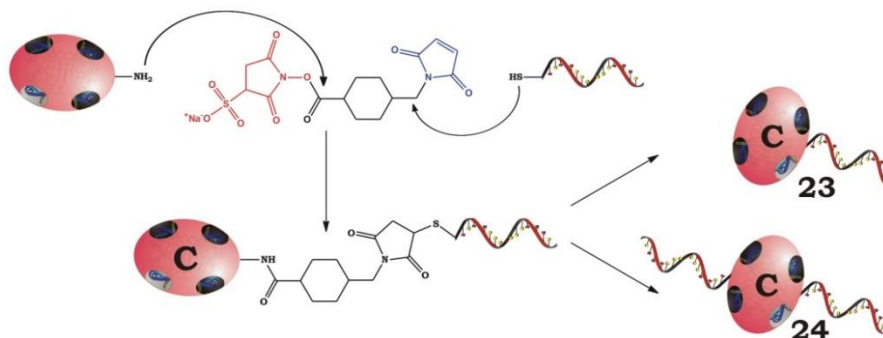


Abbildung 2.15: Schematische Darstellung der DNA-mSTV (mSTV ist im Folgenden immer in Rot abgebildet) Konjugatsynthese mit sSMCC. Die Synthesestrategie entspricht der DNA-nSTV-Konjugatsynthese aus Abbildung 2.2.

Die in *Abbildung 2.15* dargestellte DNA-mSTV-Konjugatsynthese folgte der unter 2.1.1.1 beschriebenen Synthesestrategie für DNA-nSTV-Konjugate. Vom dort beschriebenen Protokoll abweichend war für die DNA-mSTV-Konjugatsynthese eine schonendere Handhabung des mSTV notwendig. Dabei wurde in einem ersten Schritt 15 nmol mSTV mit 1.2 μ mol sSMCC derivatisiert (mSTV-sSMCC). Gleichzeitig wurden 10 nmol tDNA mit DTT aktiviert. Danach wurde das mSTV-sSMCC und die aktivierten Oligonucleotide über Gelfiltrationssäulen (NAP) aufgereinigt und anschließend vereinigt. Nach Inkubation für 1.5 h wurden die Rohprodukte der DNA-mSTV-Konjugatsynthese mittels Anionenaustauschchromatographie aufgetrennt und mittels ndPAGE charakterisiert.

Wie in 1.1.2 beschrieben setzt sich mSTV aus einem nSTV-Monomer mit His₆-Tag und drei STV-Monomeren mit deutlich reduzierter Biotinbindeaffinität (dSTV-Monomere) zusammen. Empirisch zeigte sich, dass mSTV in Gegenwart von DMSO oder mehr als 3 Vol% DMF denaturiert (siehe *Abbildung 2.16*). Darum wurde für die DNA-mSTV-Konjugatsynthese in DMF gelöstes sSMCC verwendet, wobei die verwendete Stoffmenge des sSMCC gegenüber der DNA-nSTV-Konjugatsynthese aufgrund der limitierten Löslichkeit des Crosslinkers in DMF um den Faktor vier reduziert werden musste.

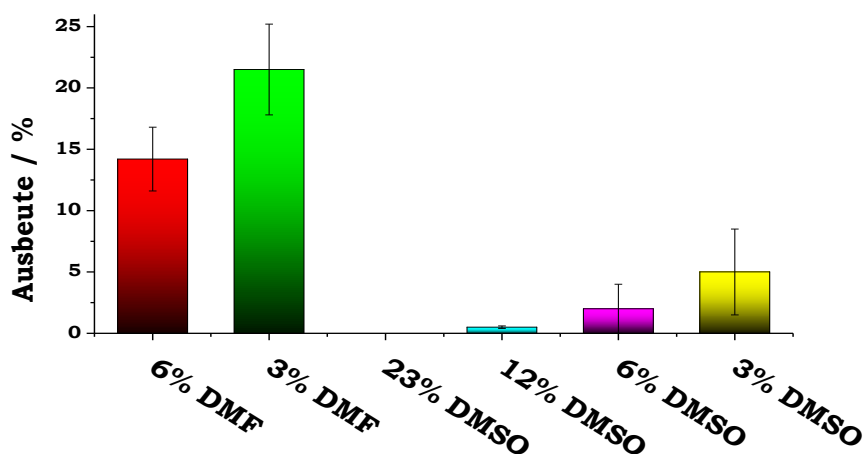


Abbildung 2.16: Säulendiagramm mit durchschnittlicher Ausbeute bei der Konjugatsynthese von DNA-mSTV-Konjugaten unter Verwendung unterschiedlicher Anteile von DMF oder DMSO.

Als repräsentatives Beispiel für die Konjugatsynthese von DNA-mSTV-Konjugaten ist in *Abbildung 2.17* das FPLC-Chromatogramm der Konjugation von mSTV mit dem Oligonucleotid F9 dargestellt. Die vollständige Nomenklaturtabelle ist in Kapitel 8 abgebildet.

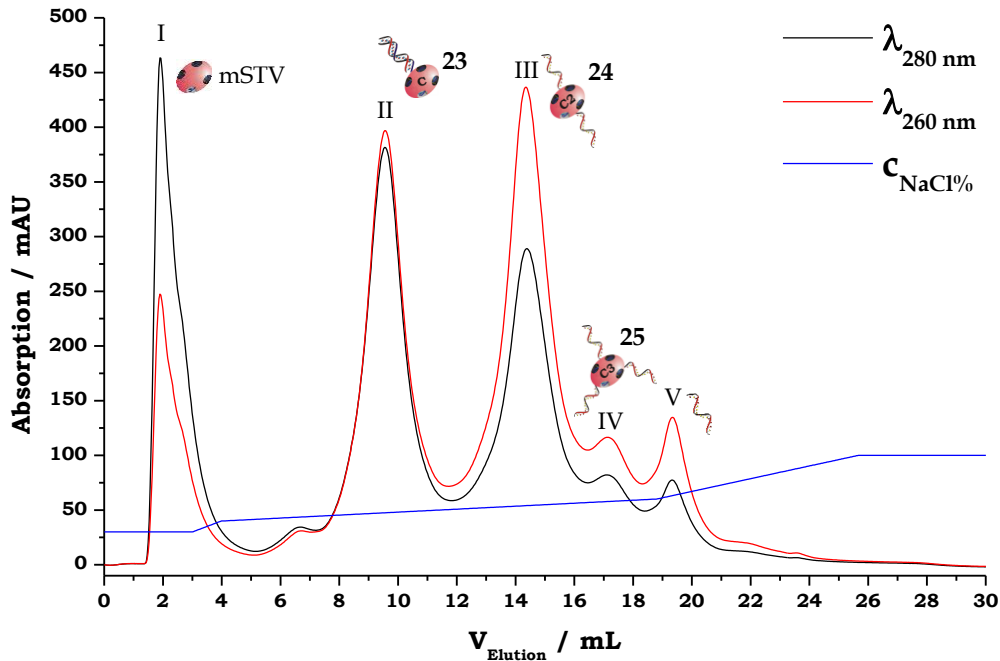


Abbildung 2.17: Repräsentatives Anionenaustauschchromatogramm von einer F9-mSTV Konjugataufreinigung. I) nicht konjugiertes mSTV, II) **23**, III) **24**, IV) **25** und V) nicht konjugiertes Oligonucleotid.

Im FPLC-Chromatogramm in *Abbildung 2.17* wurde Peak I anhand der Lage im NaCl-Gradienten dieses Eluenten und einem A_{260}/A_{280} -Wert von < 1 nicht konjugiertem mSTV zugeordnet.

Peak II wurde anhand der Elutionsreihenfolge und einem A_{260}/A_{280} -Wert von ≈ 1 dem DNA-mSTV-Monokonjugat **23** zugeordnet.

Peak III wurde anhand der Elutionsreihenfolge und einem A_{260}/A_{280} -Wert von > 1 dem DNA-mSTV-Bikonjugat **24** zugeordnet.

Dem als Schulter von Peak III auftretendem Peak IV wurde das DNA-mSTV-Trikonjugat **25** zugeordnet. Die Peaktrennung zwischen dem Bi- und Trikonjugat konnte durch einen weniger schnell ansteigenden NaCl-Gradienten nicht weiter gesteigert werden.

Peak V mit dem im Chromatogramm höchsten A_{260}/A_{280} -Verhältnis und der höchsten NaCl-Konzentration beim Eluieren wurde nicht konjugiertem tF9 zugeordnet.

Bei der DNA-mSTV Konjugation wurden isolierte Ausbeuten von $21.2\% \pm 5.7\%$ für **23**, $6.3\% \pm 2.0\%$ für **24** und $2.1\% \pm 0.9\%$ für **25** erzielt. Eine Übersicht über die isolierten Ausbeute bei den DNA-STV-Konjugatsynthesen in *Tabelle 2.2* zusammengefasst.

Die Charakterisierung der DNA-mSTV-Konjugate erfolgte mittels ndPAGE. Es wurden jeweils 2.0 pmol **23**, **24** und **25** mit 6x Orange DNA Loading Dye in die Geltaschen geladen. Das Sybr Gold (links) und Silber (rechts) gefärbte Gel ist in *Abbildung 2.18* gezeigt.

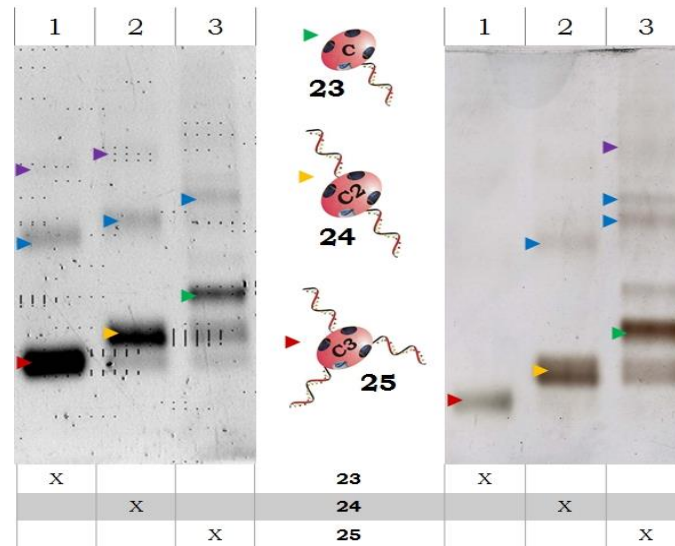


Abbildung 2.18: 8.5% ndPAGE von F9-mSTV-Konjugaten nach anschließender Sybr Gold Färbung (links) und Silber Färbung (rechts); **Spur 1: 23**, **Spur 2: 24** und **Spur 3: 25**.

Bei der Charakterisierung mittels ndPAGE ließ sich die unterschiedliche elektrophoretische Mobilität der F9-mSTV-Konjugate eindeutig erkennen. Die Zuordnung erfolgte analog zu DNA-nSTV-Konjugaten in *Abbildung 2.6*.

In Spur 1 ist eine intensive Bande (▶) mit hoher Mobilität zu erkennen. Diese konnte **23** zugeordnet werden, welches verglichen mit den höheren Konjugaten wegen eines kleineren hydrodynamischen Volumen am schnellsten durch die Gelmatrix wanderte.

In Spur 2 ist eine intensive Bande (▶) zu erkennen, welcher aufgrund der reduzierten elektrophoretischen Mobilität verglichen mit der Bande in Spur 1 **24** zugeordnet wurde. Zudem ist eine weitere weniger intensive Bande zu erkennen, der eine Verunreinigung durch **23** zugeordnet wurde.

In Spur 3 ist eine intensive Bande (▶) mit geringerer Mobilität im Vergleich zu Spuren 1 und 2 zu erkennen. Unter der Annahme, dass die elektrophoretische Mobilität mit steigender Anzahl gebundener Oligonucleotide bei DNA-mSTV sinkt, wurde diese Bande **25** zugeordnet. Zusätzlich lässt sich eine Bande mit der elektrophoretischen Mobilität von **24** erkennen, welches wie im Chromatogramm in *Abbildung 2.17* zu erkennen, nicht vollständig von **25** abgetrennt wurde (Peak IV eluierte als eine Schulter von Peak III).

In allen Spuren sind weitere Banden mit verglichen zur Hauptbande reduzierter Mobilität (▶) zu erkennen. Diese Banden resultierten aus Konjugatdimeren von **23**, **24** und **25**. Diese Dimere entstanden durch die Verknüpfung von

zwei stöchiometrisch identischen DNA-mSTV-Konjugaten. In Spur 1 lassen sich $(\mathbf{23})_2$ in Spur 2 $(\mathbf{24})_2$ und in Spur 3 $(\mathbf{24})_2$ (mobilere ► Bande) und $(\mathbf{24})_2$ (weniger mobile ► Bande) erkennen. Ferner lässt sich in Spur 1 und 2 bei der Sybr Gold Färbung und in Spur 3 bei der Silber Färbung weitere, weniger mobile Banden (►) erkennen, welche Trikonjugaten zugeordnet wurden. Diesen Banden wurde in Spur 1 $(\mathbf{23})_3$, in Spur 2 $(\mathbf{24})_3$ und in Spur 3 $(\mathbf{25})_3$ zugeordnet.

Die Anteile von Konjugatdimeren (►) und -trimeren (►) in den DNA-mSTV-Konjugaten führten bei der Assemblierung zu einer Mischung von unterschiedlichen Nanostrukturen, da die Konjugatdimeren und -oligomeren zwei oder mehr komplementärer Oligonucleotide hybridisieren und biotinylierter Moleküle binden können. Dadurch konnte die, in der Zielsetzung in *Abbildung 1.14* gezeigten, supramolekularen Nanostrukturen nicht aus DNA-mSTV-Konjugaten assembliert werden, die mit Konjugatdimeren und -oligomeren verunreinigt waren.

Die Konjugatdimere $(\mathbf{23})_2$ und $(\mathbf{24})_2$ waren folglich unerwünschte Nebenprodukte, welche wegen des zu $\mathbf{23}$ und $\mathbf{24}$ identischen m/z-Verhältnis nicht durch Anionenaustauschchromatographie abgetrennt werden konnten.

Für die Bereitstellung von Monomeren von $\mathbf{23}$ und $\mathbf{24}$ ohne Verunreinigung von Konjugatoligomeren sollten die Konjugate entweder nach der Anionenaustauschchromatographie weiter aufgereinigt werden oder durch eine optimierte Konjugatsynthese sollte die Entstehung von Konjugatoligomeren vermieden werden.

2.1.2 DNA-mSTV Konjugatsynthesen unter Verwendung unterschiedlicher heterobispezifischer Crosslinker

Die Bildung von Konjugatdimeren und -oligomeren wurden in der Literatur bereits 1994 von Niemeyer *et al.*^[44] bei der DNA-nSTV-Konjugat-synthese beschrieben (siehe Zielsetzung in *Abbildung 1.15* rechts). Diese Konjugatdimeren von $\mathbf{6}$ und $\mathbf{7}$ konnten ebenfalls bei der ndPAGE-Charakterisierung von DNA-nSTV-Konjugaten in *Abbildung 2.6* beobachtet werden. Im Vergleich zur DNA-mSTV-Konjugatsynthese waren die Anteile der Konjugatdimere bei der DNA-nSTV-Konjugatsynthese deutlich niedriger. Dieses zeigte sich besonders am Fehlen einer Bande von $(\mathbf{5})_2$ bei der ndPAGE in *Abbildung 2.6*. Diese Beobachtung ließ vermuten, dass eine Anpassung des Protokolls für die DNA-mSTV-Konjugat-synthese eine Reduktion der Bildung von Konjugatdimeren und -oligomeren erlauben würde.

Niemeyer *et al.* verwendeten bei der DNA-nSTV-Konjugatsynthese den heterobispezifische Crosslinker Sulfosuccinimidyl 4-(p-Maleinsäure-imidophenyl) Butyrat (sSMPB). Die Wahl des Crosslinkers hat einen bedeutenden Einfluss auf die Bildung von Konjugatdimeren bei der Konjugatsynthese. Die bei der DNA-STV-Konjugatsynthese eingesetzten Crosslinker, können mit bis zu sechzehn Aminogruppen (12x Lys und 4x N-terminale Amine) auf der STV-Oberfläche reagieren. Darum lässt sich annehmen, dass infolge der Derivatisierung mit einem

heterobispezifischen Crosslinker die Oberflächeneigenschaften von STV verändert werden, wobei neue, Crosslinker-abhängige Reaktivitäten eingeführt werden. Der Einfluss der veränderten Oberflächeneigenschaften und chemischen Gruppen sollte durch Variation der bei der DNA-mSTV-Konjugatsynthese verwendeten Crosslinker untersucht werden.

Darum wurden im Folgenden vier weitere heterobispezifische Crosslinker für die DNA-mSTV-Konjugatsynthese verwendet, um ihren Einfluss auf die anteilige Bildung von Konjugatdimeren und -oligomeren zu untersuchen.

Zusätzlich musste für die Bestimmung der Anteile der Konjugatdimere und -oligomere eine Methode gewählt werden, die DNA-mSTV-Konjugatmonomere von -dimeren und -oligomeren trennt und zusätzlich einen direkten Vergleich der quantitativen Stoffmengenanteile erlaubt. Analytische Asymmetrische-Fluss-Feldflussfraktionierung (aAF4) erlaubt die direkte Auftrennung der Konjugatproben in DNA-mSTV-Konjugatmonomere von -dimeren und -oligomeren (zum AF4-Prinzip siehe 1.2), sowie einen Vergleich der eluierten Stoffmengen durch Integration der aF4-Fraktogrammpeaks. Dafür wurde zunächst an der aAF4 ein Flussprofil erstellt, das eine hinreichende Peaktrennung zwischen DNA-mSTV-Konjugatmonomere von -dimeren und -oligomeren erlaubte. Das Protokoll für die Erstellung eines geeigneten Flussprofils ist unter 4.7.1.5 beschrieben. Häufig ließ sich bei der AF4 nur eine bestimmbare Trennung zwischen Konjugatmonomere und -dimeren erzielen, da die Anteile von Oligomeren in den DNA-mSTV-Konjugaten selten die Detektionsgrenze erreichten.

Ein Lauf der aF4 benötigte ca. 100 pmol DNA-mSTV-Konjugat. Für den Vergleich unterschiedlicher Crosslinker wurde zunächst DNA-mSTV-Konjugaten mit den Oligonucleotidsequenzen F9 und cF9 mit unterschiedlichen Crosslinkern dargestellt und anschließend mittels aAF4 aufgetrennt. Eine Übersicht über die Crosslinker ist in *Tabelle 2.2* zusammengefasst.

Als erstes erfolgte die aAF4 mit **23** und **24**, wobei das Flussprofil auf die aAF4 von DNA-mSTV-Konjugaten angepasst wurde.

Ein repräsentatives Beispiel für ein aAF4-Fraktogramm von **23** ist in *Abbildung 2.19* dargestellt. Wie in Kapitel 1.2 beschrieben eluieren bei der AF4 Probenmolekülen mit kleinerem hydrodynamischem Radius vor solchen mit größerem hydrodynamischen Radius. Analog ist bei der aAF4 von **23** zu erwarten, dass zuerst F9-mSTV-Konjugatmonomere **23** (als intensivster Hauptpeak) und danach Konjugatdimere (**23**)₂ und bei hinreichend Anteilen zum Überschreiten der Detektionsgrenze Konjugattrimere (**23**)₃ eluieren. Die Integration der Flächen unter den Peaks erfolgte bei der detektierten Wellenlänge $\lambda = 280$ nm (siehe roter Kasten mit Integralbereichen in *Abbildung 2.19*). Die Integration erfolgte mittels der AF4-Gerätesoftware AF 2000 Control.

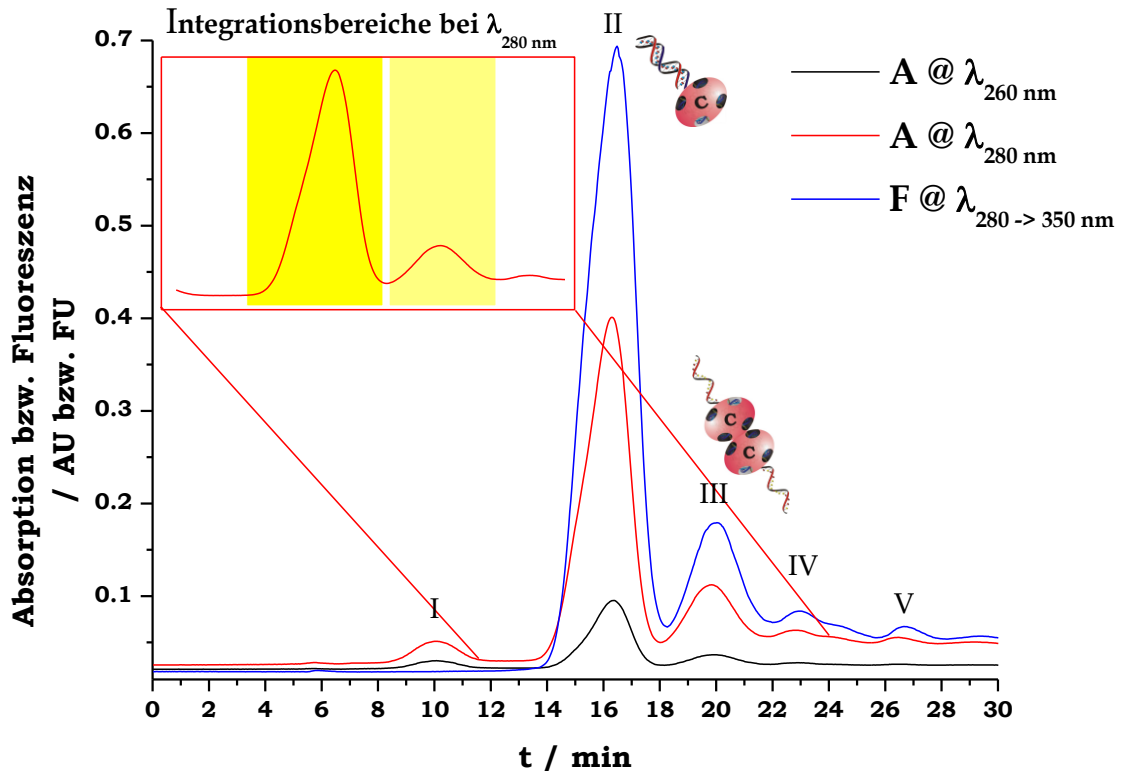


Abbildung 2.19: aAF4-Fraktogramm von **23**; I) freies Oligonucleotid, II) monomeres **23**, III) $(\mathbf{23})_2$, IV) $(\mathbf{23})_3$ und V) aggregiertes Konjugat. Im roten Feld sind die integrierten Peaks dargestellt.

In *Abbildung 2.19* sind fünf Peaks zu erkennen. Bei Peak I eluierte das Oligonucleotid F9 als Probenbestandteil mit kleinstem hydrodynamischem Radius. Das A_{260}/A_{280} -Verhältnis kann zur Abschätzung des Eluenten nicht verwendet werden, da die Detektorkanäle die Absorptionssignale geräteintern und über die Steuerungssoftware unterschiedlich verstärken und damit ein Vergleich der Signalintensitäten nicht möglich ist.

Bei Peak II eluierte der Hauptbestandteil der Probe das Konjugatmonomer **23**. Dieses entsprach der erwarteten Elutionsreihenfolge, da das Monomer über den zweitgrößten hydrodynamischen Radius der Probenbestandteil verfügte.

Peak III wurde dem Konjugatdimer $(\mathbf{23})_2$ zugeordnet.

Peak IV wurde mit dem größtem zuordenbaren hydrodynamischen Radius dem Konjugattrimer $(\mathbf{23})_3$ zugeordnet.

Bei Peak V ließ sich ergänzend ein intensives Signal des Detektors für statische Lichtstreuung (SLS; nicht im Fraktogramm gezeigt) erkennen. Es lässt sich vermuten, dass als letzter Probenbestandteil aggregierte Konjugate eluieren, die bei der Fokussierung (AF4-Schritt mit größtem Scherstress für die Probe) denaturierten. Der Detektor für SLS reagiert empfindlich auf Spezies mit großem hydrodynamischem Radius (wie Protein-Aggregate oder Vesikeln).

Aus der aAF4 ließ sich ein Verhältnis von Konjugatmonomer **23** zu Konjugatdimer $(\mathbf{23})_2$ von 3.5 zu 1 bestimmen.

2.1.2.1 sSMPB

Als erster alternativer Crosslinker wurde Succinimidyl 4-(p-Maleinsäureimidophenyl) Butyrat (sSMPB)^[168-169] (Struktur und Reaktionsschemata siehe *Abbildung 2.20*) ausgewählt. Es sollte der Einfluss auf die Bildung von Konjugatdimeren und -oligomeren in Folge des veränderten Spacers untersucht werden. Die Struktur von sSMPB unterscheidet sich von sSMCC im Spacer des heterobispezifischen Crosslinkers und hat anstelle der Cyclohexangruppe bei sSMCC eine Phenylgruppe. Die orthogonalen Reaktionsgruppen von sSMPB entsprechen denen von sSMCC. Die Spacerarmlänge des Linkers in der Bindung beträgt ca. 12 Å.

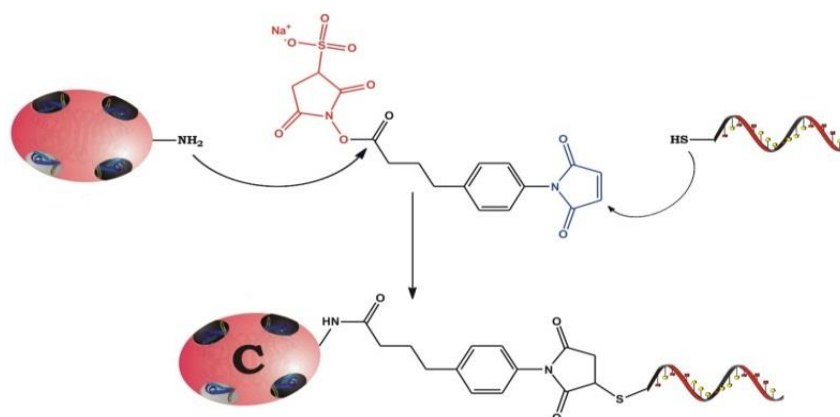


Abbildung 2.20: Schematische Darstellung der DNA-sSMPB-mSTV-Konjugatsynthese.

Das Protokoll zur Konjugatsynthese war identisch zur Konjugation mit sSMCC. Bei der Konjugation mit dem Oligonucleotid F9 und mSTV wurde das Monokonjugat **26** und das Bikonjugat **27** dargestellt. Ein repräsentatives Anionenaustauschchromatogramm und ein aAF4-Fraktogramm sind im Anhang unter *Abbildung 7.1* und *Abbildung 7.2* gezeigt.

Bei der DNA-mSTV-Konjugatsynthese mit sSMPB wurden isolierte Ausbeuten von $17.7\% \pm 3.4\%$ für das Monokonjugat **26** und $4.3\% \pm 1.1\%$ für das Bikonjugat **27** erzielt.

Aus der aAF4 ließ sich ein Verhältnis von Konjugatmonomer **26** zu Konjugatdimer (**26**)₂ von 5 zu 1 bestimmen.

2.1.2.2 sSIAB

Als nächster heterobispezifischer Crosslinker wurde Sulfosuccinimidyl (4-Iodoacetyl) Aminobenzoat (sSIAB)^[170] ausgewählt. Bei der Derivatisierung von mSTV reagiert sSIAB wie sSMCC und sSMPB mittels einer NHS-Gruppe mit freien Aminen auf der Proteinoberfläche. Im Unterschied zu den zuvor verwendeten Linkern erfolgt die Bindung mit thiolierten Oligonucleotiden, wie in *Abbildung 2.21* gezeigt, über die Iodoacetylgruppe. Die Spacerarmlänge von sSIAB in der Bindung beträgt ca. 11 Å.

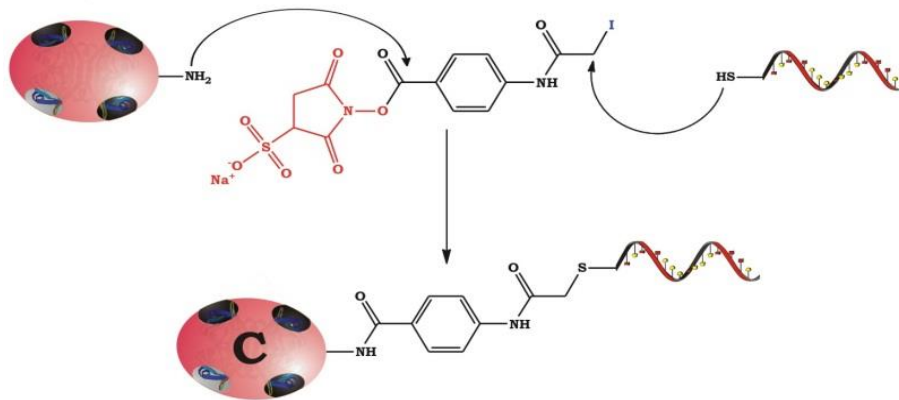


Abbildung 2.21: Schematische Darstellung der DNA-sSIAB-mSTV-Konjugatsynthese.

Abweichend zum Protokoll für die Konjugatsynthese von DNA-mSTV wurde für die nucleophile Substitution PBS mit einem pH-Wert von 8.3 gewählt, um die Spezifität der Iodoacetylgruppe für primäre Thiole zu maximieren. Dafür wurde das mit sSIAB derivatisierte mSTV und das mit DTT aktivierte Oligonucleotid mit PBS pH 8.3 von den NAP-Säulen eluiert und anschließend für 1.5 h bei RT inkubiert. Bei der Konjugation mit dem Oligonucleotid F9 und mSTV wurde das Monokonjugat **28** und das Bikonjugat **29** dargestellt. Ein repräsentatives Anionenaustauschchromatogramm und ein aAF4-Fraktogramm sind im Anhang unter *Abbildung 7.3* und *Abbildung 7.4* gezeigt.

Bei der DNA-mSTV-Konjugatsynthese mit sSIAB wurden isolierte Ausbeuten von $33.1\% \pm 5.4\%$ für das Konjugatmonomer **28** und $5.6\% \pm 1.2\%$ für das Konjugatdimer **29** erzielt.

Aus der aAF4 ließ sich ein Verhältnis von Konjugatmonomer **28** zu Konjugatdimer (**28**)₂ von 10 zu 1 bestimmen.

Die Verwendung von sSIAB bei der Konjugatsynthese führte zu einer sehr hohen Ausbeute, wobei der Anteil an Konjugatdimeren gegenüber der Verwendung von sSMCC gesenkt wurden. Dennoch war der Anteil von (**28**)₂ mit ca. 10% zu hoch, um ohne weitere Aufreinigung mit sSIAB verknüpften DNA-mSTV-Konjugate definierte supramolekulare Nanostrukturen aufzubauen.

2.1.2.3 PEG₄-SPDP

Als weiterer heterobispezifischen Crosslinker wurde PEG₄-SPDP^[171-172] für die DNA-mSTV-Konjugatsynthese ausgewählt. PEG₄-SPDP unterscheidet sich durch einen Ethylenglykol (EG)-Spacer und durch eine Thiol-reaktive Abgangsgruppe anstelle eines Maleinsäureimid- oder Iodoacetylgruppe zu den vorher verwendeten Crosslinkern. Der Crosslinkerhersteller Pierce (Rockford, USA) bietet diesen mit unterschiedlich langen Ketten des Ethylenglykol an, dadurch ergibt sich der Trivialnamen PEG_X-SPDP. Dabei beschreibt das X die Länge des Polyethylenglykol (PEG). PEG₄-SPDP führt eine Bindungslänge von ca. 25.7 Å in die Konjugation ein.

Durch die EG-Gruppen ist PEG₄-SPDP verglichen mit sSMCC, sSMPB und sSIAB deutlich hydrophiler, was sich an der besseren Löslichkeit in wässrigem Puffer und DMF sowie höherer Stabilität gegen Hydrolyse zeigte. PEG₄-SPDP erlaubt eine proteinschonende Konjugatsynthese mit der Option zur reduzierten Bildung von Konjugatdimeren und -oligomeren, durch veränderten Oberflächeneigenschaften infolge der Derivatisierung mit einem PEG-Spacer. Die Bindung zu den Oberflächenaminen von mSTV erfolgt erneut über eine NHS-Gruppe. Abweichend zu den zuvor beschriebenen Crosslinkern erfolgt die Bindung zum thiolierten Oligonucleotid über eine 2-Pyridyldithiogruppe. Diese bindet, wie in *Abbildung 2.22* gezeigt, unter Abspaltung eines 2-Mercaptopyridin das Oligonucleotid über eine Disulfidbrücke. Die Bindung zum thiolierten Oligonucleotid über eine Disulfidbrücke stellte eine, wie in der Literatur beschrieben,^[173-174] hochspezifische Reaktion da. Zudem enthält mSTV keine Thiolgruppen (kein Cys), die mit der 2-Pyridyldithiogruppe von PEG₄-SPDP reagieren können. Darum wurde eine hochspezifische Konjugatsynthese mit PEG₄-SPDP erwartet.

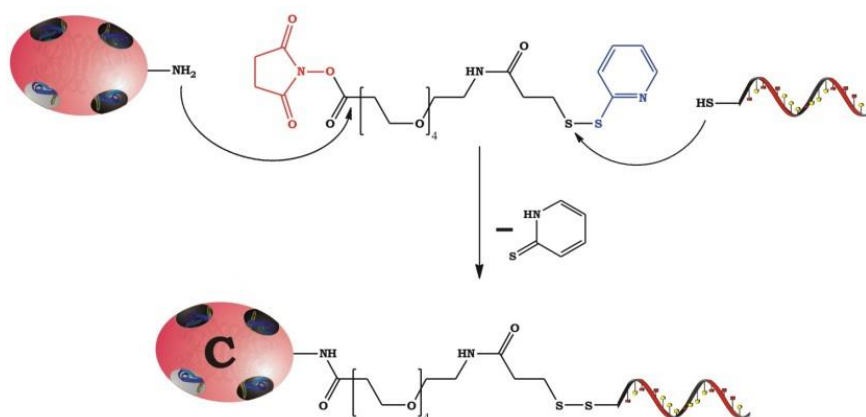


Abbildung 2.22: Schematische Darstellung der DNA-PEG₄-SPDP-mSTV-Konjugatsynthese.

Das Protokoll für die Konjugatsynthese entsprach dem Standardprotokoll für DNA-mSTV-Konjugate mit der Abweichung, dass höhere Ausbeuten bei der Inkubation des PEG₄-SPDP derivatisierten mSTV mit DTT aktivierten Oligonucleotid über 16 h bei 4 °C erreicht wurden. Bei der Konjugation mit dem Oligonucleotid F9 und mSTV wurde das Monokonjugat **30** und das Bikonjugat **31** dargestellt.

Ein repräsentatives FPLC-Chromatogramm und ein repräsentatives aAF4-Fraktogramm für die Aufreinigung bei der DNA-mSTV-Konjugatsynthese mit PEG₄-SPDP sind im Anhang unter *Abbildung 7.5* und *Abbildung 7.6* dargestellt.

Bei der DNA-mSTV-Konjugatsynthese mit PEG₄-SPDP wurden isolierte Ausbeuten von 13.1% ± 1.2% für das Konjugatmonomer **30** und 2.3% ± 0.8% für das Konjugatdimer **31** erzielt.

Aus der aAF4 ließ sich ein Verhältnis von Konjugatmonomer **30** zu Konjugatdimer (**30**)₂ von 14 zu 1 bestimmen.

2.1.2.4 SM(PEG)₄

Als letzter heterobispezifischer Crosslinker wurde Succinimidyl-[(*N*-Maleinsäureimidopropionamido)-Tetraethyleneglycol] Ester (SM(PEG)₄) ausgewählt.^[175-176] Wie schon bei PEG₄-SPDP ist der Spacer von SM(PEG)₄ aus vier EG-Gruppen aufgebaut. Die orthogonalen, reaktiven Gruppen dieses Crosslinkers entsprechen wie in *Abbildung 2.23* zu erkennen sSMCC und sSMPB. Die Konjugation erfolgt über eine NHS- und eine Maleinsäureimidgruppe. Da unter der Verwendung des hydrophileren PEG₄-SPDP der Anteil der Konjugatdimere gesenkt wurde, sollte ein weiterer Crosslinker mit EG-Gruppen und den bewährten orthogonalen, reaktiven Gruppen von sSMCC und sSMPB verwendet werden. SM(PEG)₄ führt eine Bindungslänge von ca. 24.6 Å in die Konjugation ein. Wie PEG₄-SPDP ist SM(PEG)₄ durch die EG-Gruppen verglichen mit sSMCC, sSMPB und sSIAB deutlich hydrophiler und erlaubt eine proteinschonende Konjugatsynthese.

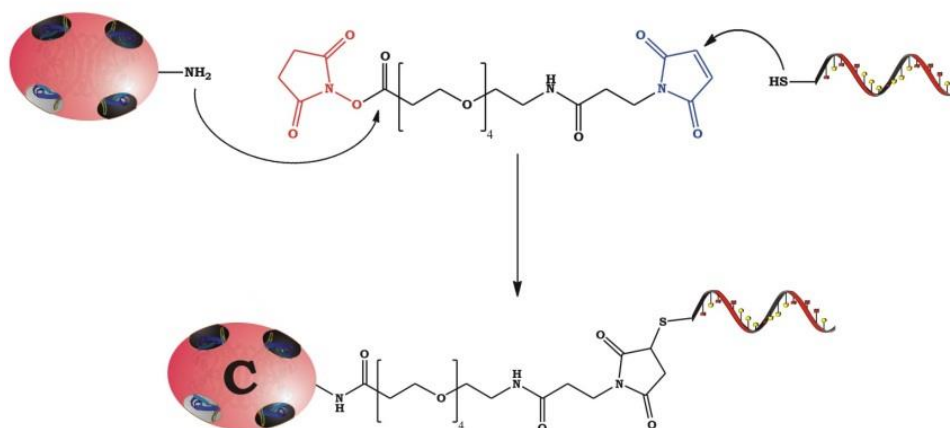


Abbildung 2.23: Schematische Darstellung der DNA-SM(PEG)₄-mSTV-Konjugatsynthese.

Das Protokoll der DNA-mSTV-Konjugatsynthese mit SM(PEG)₄ war analog zur Verwendung von PEG₄-SPDP. Die Konjugation erfolgte ebenfalls über 16 h bei 4 °C.

Bei der Konjugation mit dem Oligonucleotid F9 und mSTV wurde das Monokonjugat **32a** und das Bikonjugat **33a** dargestellt. Zudem wurden bei der Konjugation mit dem Oligonucleotid cF9 und mSTV das Monokonjugat **32b** und das Bikonjugat **33b** dargestellt. ergänzend wurden bei der Konjugation mit dem Oligonucleotiden cF1 und mSTV bzw. cF10 und mSTV die Monokonjugate **32c** und **32d** dargestellt. Eine ausführliche Tabelle für die Nomenklatur ist in Kapitel 8 dargestellt.

Ein repräsentatives FPLC-Chromatogramm für die Aufreinigung bei der DNA-mSTV-Konjugatsynthese mit SM(PEG)₄ ist in *Abbildung 2.24* dargestellt.

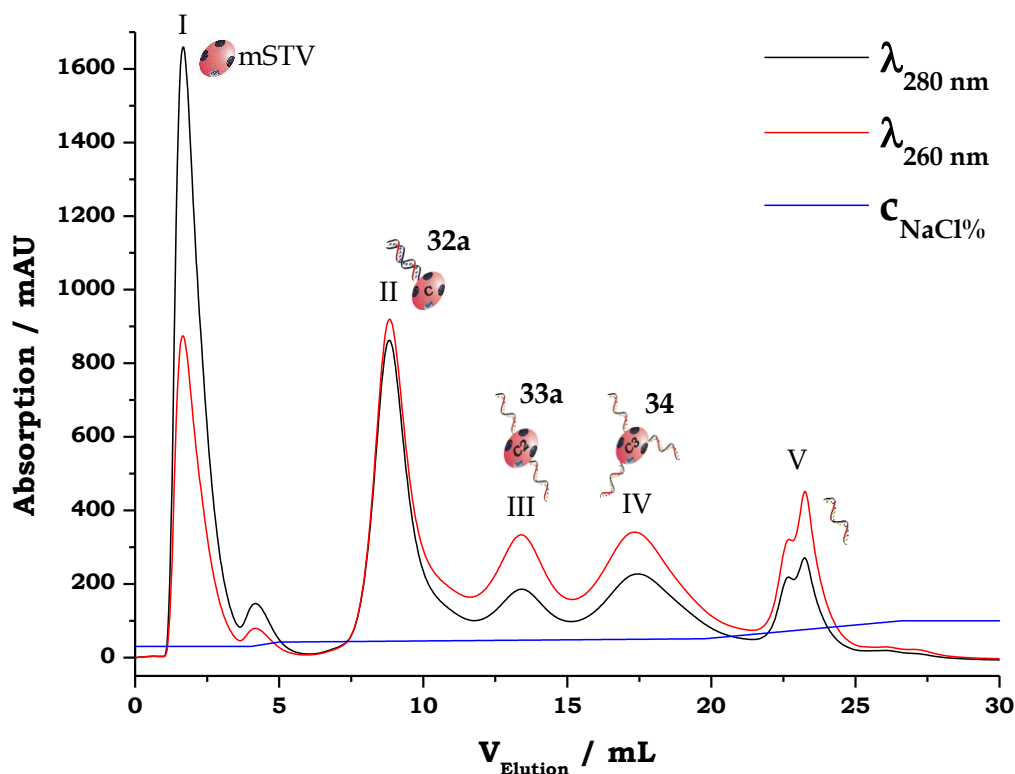


Abbildung 2.24: Repräsentatives Anionenaustauschchromatogramm der Aufreinigung von $SM(PEG)_4$ verknüpften F9-mSTV-Konjugat. I) nicht konjugiertes mSTV, II) **32a**, III) **33a**, IV) **34** und V) nicht konjugiertes Oligonucleotid.

Die Peakzuordnung erfolgte analog zum sSMCC verknüpften F9-mSTV-Konjugat in *Abbildung 2.17*.

Peak I wurde $SM(PEG)_4$ derivatisiertem mSTV zugeordnet. Ein weiterer Peak lässt sich am Sockel von Peak I erkennen. Aufgrund eines A_{260}/A_{280} -Wertes von < 1 eluiert in diesem Peak vermutlich ebenfalls nicht mit DNA-konjugiertes mSTV. Dieser Peak eluierte bei einem zu Peak I identischem NaCl-Gradienten, was die Zuordnung zu $SM(PEG)_4$ -derivatisiertem mSTV bestätigt. Peak II wurde dem Hauptprodukt der Konjugatsynthese **32a** zugeordnet. In den Fraktionen unter Peak III eluierte das Bikonjugat **33a**. Peak IV wurde **34** zugeordnet. Im Peak V eluierten nicht konjugierte Oligonucleotide.

Bei der in *Abbildung 2.24* gezeigten Anionenaustauschchromatographie von $SM(PEG)_4$ verknüpfte F9-mSTV-Konjugat wurde eine deutlich bessere Peaktrennung als bei dem sSMCC verknüpften Konjugat erreicht. Eine mögliche Ursache für die verbesserte Peaktrennung waren die veränderten chemischen Eigenschaften der PEG-modifizierten STV-Oberflächen.

Für die $SM(PEG)_4$ verknüpften F9-mSTV-Konjugatsynthese wurden Ausbeuten von $18.4\% \pm 2.5\%$ für das Monokonjugat **32** und $4.2\% \pm 1.7\%$ für das Bikonjugat **33** erreicht.

Die Anteile der Konjugatmonomere **32** zu Konjugatdimere (**32**)₂ wurden mit Hilfe von aAF4 bestimmt. Ein repräsentatives aAF4-Fraktogramm von **32a** ist in *Abbildung 2.25* dargestellt.

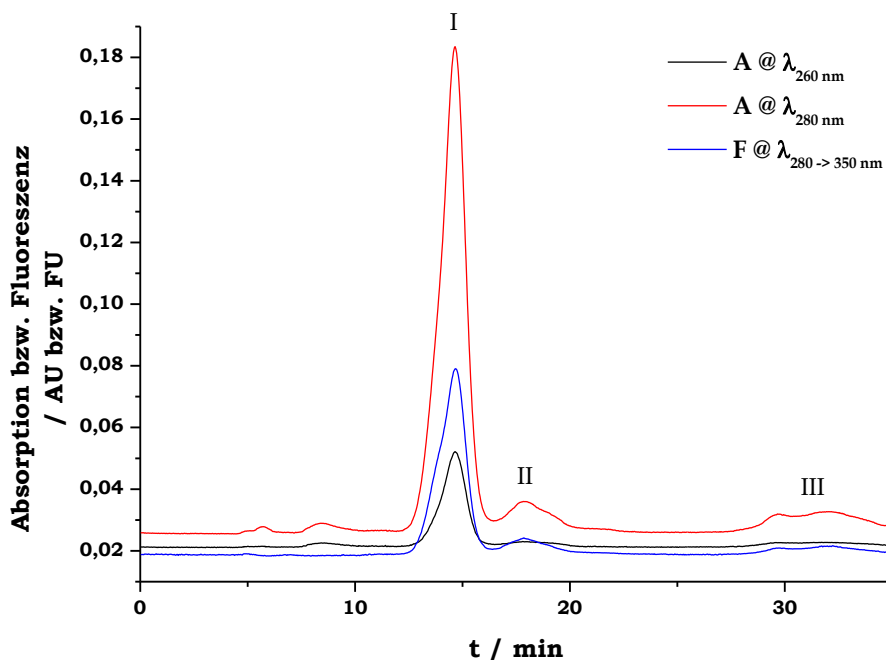


Abbildung 2.25: aAF4-Fraktogramm von SM(PEG)₄ verknüpften F9-mSTV-Monokonjugat; I) **32a**, II) (**32a**)₂ und III) aggregiertes Konjugat.

Im Peak I eluierte unmittelbar das Hauptprodukt monomeres **32a** als Probenbestandteil mit kleinstem hydrodynamischem Radius. Peak II wurde dem Konjugatdimer (**32a**)₂ zugeordnet. In Peak III eluierte nach Abschalten des Querflusses bei der Fokussierung aggregiertes Konjugat. Zusätzlich lässt sich bei $\lambda = 280$ nm ein messgerätspezifischer Voidpeak, der bei der AF4 am Ende der Fokussierung beobachtet werden kann, nach ≈ 6 min und ein Peak von freien Oligonucleotiden nach ≈ 9 min erkennen.

Aus der aAF4-Fraktogramm ließ sich ein Verhältnis von Konjugatmonomer **32a** zu Konjugatdimer (**32a**)₂ von 22 zu 1 bestimmen.

Für die Charakterisierung mittels ndPAGE wurden jeweils 2.0 pmol **32a**, **33a**, **34** und **32a**, welches vorher mit 2.0 pmol bF10 bzw. 4.0 pmol cF9 inkubiert wurde, mit 6x Orange DNA Loading Dye gemischt in die Geltaschen geladen. Als Kontrolle wurde das Rohprodukt der Konjugatsynthese auf das Gel geladen. Das zugehörige Gel ist in *Abbildung 2.26* dargestellt.

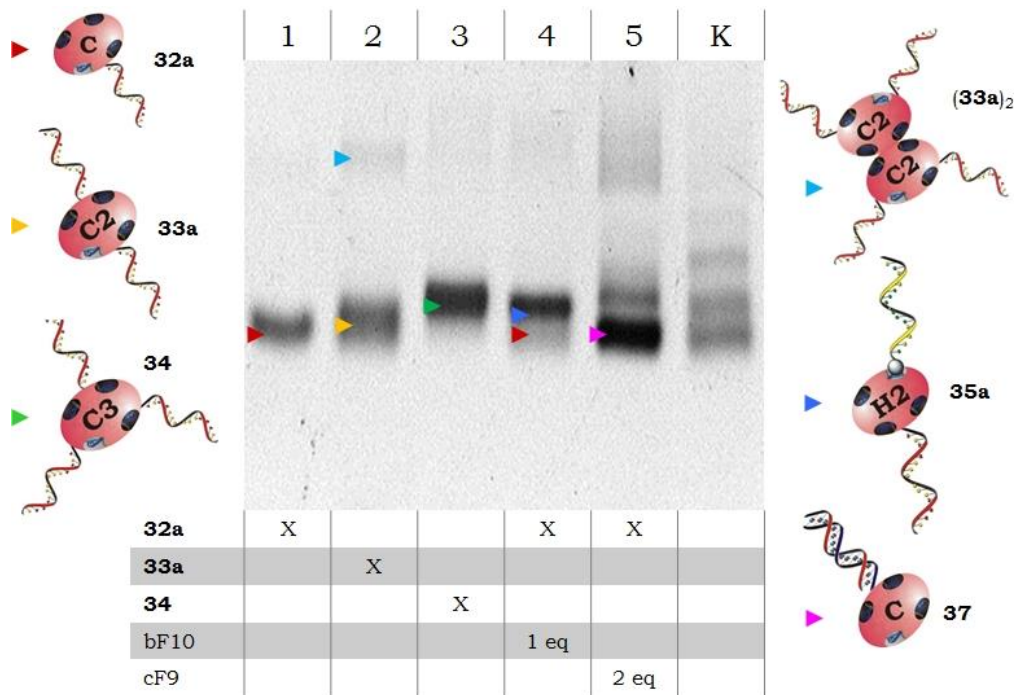


Abbildung 2.26: 8.5% ndPAGE von SM(PEG)₄ verknüpften F9-mSTV-Konjugat nach Anfärbung mit Sybr Gold; **Spur 1:** F9-mSTV-Monokonjugat **32a**, **Spur 2:** F9-mSTV-Bikonjugat **33a**, **Spur 3:** F9-mSTV-Trikonjugat **34**, **Spur 4:** **32a** + 1 eq bF10, **Spur 5:** **32a** + 2 eq cF9 und **Spur K:** Rohprodukt der Konjugatsynthese.

In *Abbildung 2.26* lässt sich erkennen, dass die erzielte Bandentrennung zwischen den SM(PEG)₄ verknüpften Mono- (**32a**), Bi- (**33a**) und Trikonjugaten (**34**) im Vergleich zur ndPAGE von sSMCC verknüpften DNA-mSTV-Konjugaten (siehe *Abbildung 2.18*) geringer war. Es ließ sich vermuten, dass die Oberflächeneigenschaften des Konjugats durch die PEG-Gruppen von SM(PEG)₄ zu einer Veränderung der elektrophoretischen Mobilität geführt haben.

In Spur 1 ist eine Bande (▶) mit einer für ein DNA-STV-Konjugat typischen elektrophoretischen Mobilität zu erkennen. Der Bande wurde das Monokonjugat **32a** zugeordnet.

In Spur 2 ist eine breite Bande (►) mit verglichen zu Spur 1 reduzierter Mobilität zu erkennen. Unter der Annahme, dass eine größere Anzahl gebundener Oligonucleotide die elektrophoretische Mobilität senkt, wurde dieser Bande **33a** zugeordnet. Mit deutlich geringerer Mobilität und Intensität lässt sich eine weitere Bande erkennen (▶), der Konjugatdimere (**33a**)₂ zugeordnet wurden.

In Spur 3 ist eine intensive Bande (▶) mit verglichen zur Bande in Spur 2 reduzierter Mobilität zu erkennen. Der Bande wurde **34** zugeordnet.

In Spur 4 sind zwei Banden zu erkennen. Die weniger mobile und intensive Bande (▶) zeigt identische Mobilität wie die Bande in Spur 1. Dieser Bande wurde **32a** zugeordnet. Die weniger mobile Banden (▶) wurde **32a** mit einem daran gebundenem bF10 (**35a**) zugeordnet. Infolge der Bindung eines biotinylierten Oligonucleotids nahm das hydrodynamische Volumen zu und führte so zu einer reduzierten Mobilität in der Gelmatrix.

In Spur 5 sind zwei Banden zu erkennen. Die erste intensive Bande (▶) zeigt eine zu **32a** vergleichbare Mobilität, wobei die Intensität der Sybr Gold Färbung deutlich gestiegen ist. Der Bande wurde **32a** mit hybridisierten, komplementären Oligonucleotid cF9 (**37**) zugeordnet. Die Intensitätszunahme der Sybr Gold Färbung der Bande wurde durch die höhere Bindeaffinität des fluoreszenten Interkalators zu dsDNA erklärt. Die weniger mobile Bande wurde einer Verunreinigung von **33a** zugeordnet, an welches zwei cF9 hybridisierten. Die gute Detektierbarkeit von geringen Mengen von **33a** mit zwei hybridisierten cF9 wurde durch die hohe Bindeaffinität von Sybr Gold zu diesem Konjugat verursacht.

In Spur K wurde das Rohprodukt der Konjugatsynthese aufgetragen. Hier lassen sich die Banden des Monokonjugats (**32a**) und die Banden zweier weniger mobiler Konjugate erkennen.

Die in *Abbildung 2.26* dargestellte ndPAGE von SM(PEG)₄ verknüpften DNA-mSTV-Konjugaten zeigte, dass **32a** erfolgreich von **33a** und **34** getrennt werden konnte. Zudem konnte in Spur 1 kein Konjugatdimer im Gel detektiert werden. Dahingegen ist in Spur 2 die Bande (▶) von (**33a**)₂ zu erkennen. Daraus wurde deutlich, dass Konjugatdimere bei der Konjugatsynthese von **33** entstanden sind und bei der Anionenaustauschchromatographie nicht abgetrennt wurden.

2.1.2.5 Vergleich der verwendeten Linkersysteme

Für jeden der verwendeten heterobispezifischer Crosslinker wurden die Bedingungen bei der DNA-mSTV-Konjugatsynthese optimiert. Dieses betraf die Pufferwahl, den pH-Wert des Puffers, Stoffmengenverhältnisse der Edukte und des Crosslinkers sowie die FPLC-Bedingungen. Ähnlich wurden zuvor die Bedingungen bei der DNA-nSTV-, der DNA-nSTV-SH- und der DNA-STV-TCH-Konjugatsynthese optimiert. Die unter diesen, im Methodenteil unter 4.8 beschriebenen Reaktionsbedingungen erzielten Ergebnisse der Konjugatsynthesen sind in *Tabelle 2.2* zusammengefasst. Dabei wurden die isolierte Ausbeuten auf Basis des in kleineren Stoffmengen eingesetzten Reaktanten (in der Regel die Oligonucleotide) bestimmt (Stoffmenge des in kleinerer Mengen eingesetzte Reaktanten \triangleq 100% Ausbeute). Hierbei wurden lediglich die isolierten Ausbeuten von Mono- und Bikonjugaten aufgeführt, da nur diese bei allen Konjugatsynthesen in reproduzierbaren Stoffmengen erhalten wurden. Die isolierten Ausbeuten wurden aus mindestens drei Konjugatsynthesen gemittelt.

Tabelle 2.2: Zusammengefasste Ergebnisse der DNA-STV-Konjugatsynthesen. Die Ausbeutenangabe des DNA-STV-TCH-Bikonjugats bezieht sich auf den Eluenten unter Peak IV bei der zugehörigen Anionenaustauschchromatographie (siehe Abbildung 2.12). Die isolierte Ausbeute wurde anhand der eingesetzten Stoffmenge Oligonucleotid bestimmt.

	STV-Mutante & Linker	Linker-struktur	Ausbeute / %		Konjugat-dimer / %
			Mono-konjugat	Bi-konjugat	
DNA-nSTV-Konjugat	nSTV sSMCC		22.1 ± 0.9	5.9 ± 0.6	2.0
DNA-nSTV-SH-Konjugat	nSTV-SH sSMCC		7.2 ± 0.7	1.8 ± 0.8	6.3
DNA-STV-TCH-Konjugat	STV-TCH sSMCC		15.7 ± 1.4	1.5 ± 0.6	/
DNA-mSTV-Konjugat	mSTV sSMCC		21.2 ± 5.7	6.3 ± 2	21.7
DNA-mSTV-Konjugat	mSTV sSMPB		17.7 ± 3.4	4.3 ± 1.1	16.9
DNA-mSTV-Konjugat	mSTV sSIAB		33.1 ± 5.4	5.6 ± 1.2	10.0
DNA-mSTV-Konjugat	mSTV PEG4-SPDP		13.1 ± 1.2	2.3 ± 0.8	6.6
DNA-mSTV-Konjugat	mSTV SM-(PEG)4		18.4 ± 2.5	4.2 ± 1.7	4.4

Die höchsten isolierten Ausbeuten bei DNA-STV-Konjugatsynthesen unter Verwendung von sSMCC wurden mit den STV-Mutanten nSTV und mSTV erzielt. Es ließ sich schlussfolgern, dass bei einer Reaktionsführung der Konjugatsynthese, bei der zuerst die Oberflächenamine von STV mit Crosslinker derivatisiert werden und anschließend die Kupplung zu einem Thiol-modifizierten Oligonucleotid erfolgt, zu höheren Ausbeuten führt als eine invertierte Reaktionsführung (wie bei DNA-nSTV-SH und DNA-STV-TCH-Konjugaten).

Aus Tabelle 2.2 lässt sich erkennen, dass die DNA-nSTV-Konjugatsynthese zu deutlich geringeren Anteile zur Bildung von Konjugatdimeren verglichen mit der DNA-mSTV-Konjugatsynthese führt. Diese Beobachtung wird unter Kapitel 2.1.4.2 diskutiert.

Die in der *Tabelle 2.2* zusammengefassten Ergebnisse der DNA-mSTV-Konjugatsynthesen sind im Folgenden in zwei Säulendiagrammen für die isolierten Ausbeuten und für die Anteile von Konjugatdimere gezeigt und diskutiert. In *Abbildung 2.27* sind die isolierten Ausbeuten der Mono- und Bikonjugate bei der DNA-mSTV-Konjugatsynthesen mit den unterschiedlichen verwendeten heterobispezifischen Crosslinkern miteinander verglichen.

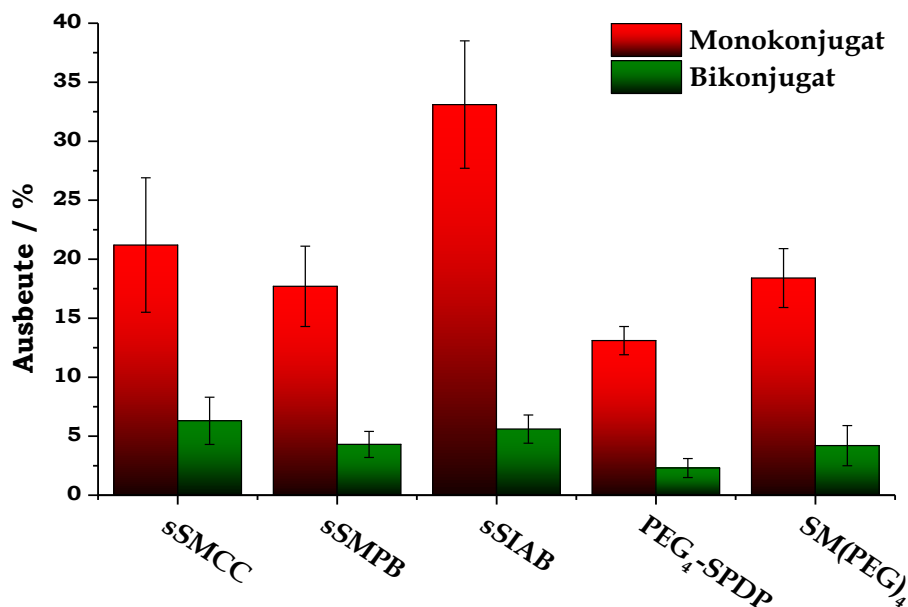


Abbildung 2.27: Säulendiagramm zum Vergleich der Ausbeute bei der DNA-mSTV-Konjugatsynthese unter Verwendung unterschiedlicher heterobispezifischer Crosslinker. In **rot** ist die Ausbeute der Monokonjugate und in **grün** ist die Ausbeute der Bikonjugate dargestellt.

Aus *Abbildung 2.27* lässt sich erkennen, dass mit dem heterobispezifischen Crosslinker sSIAB die höchsten Ausbeuten bei der Konjugatsynthese von DNA₁-mSTV von über 30% erzielt wurden. Mit den Crosslinkern sSMCC, sSMPB, PEG₄-SPDP und SM(PEG)₄ wurden Ausbeuten in einem Bereich von 15% bis 20% erzielt.

Vermutlich ist die Kupplung der thiolierten Oligonucleotide an sSIAB-derivatisiertes mSTV mittels der Iodoacetylgruppe im Vergleich zu den anderen verwendeten Crosslinkern am effizientesten. Ursache dafür ist die hohe Reaktivität der Iodoacetylgruppe, die von nucleophilen Gruppen leicht verdrängt werden kann.^[93]

Kriterien für die Auswahl des optimalen heterobispezifischen Crosslinkers für die Konjugatsynthese von DNA-mSTV waren die Ausbeute und ein möglichst geringer Anteil von Konjugatdimeren unter den Produkten der Konjugatsynthese.

Die mittels aAF4 bestimmten Anteile von Konjugatdimeren bei der DNA-mSTV-Konjugatsynthese unter Verwendung von sSMCC, sSMPB, sSIAB, PEG₄-SPDP und SM(PEG)₄ werden in *Abbildung 2.28* miteinander verglichen.

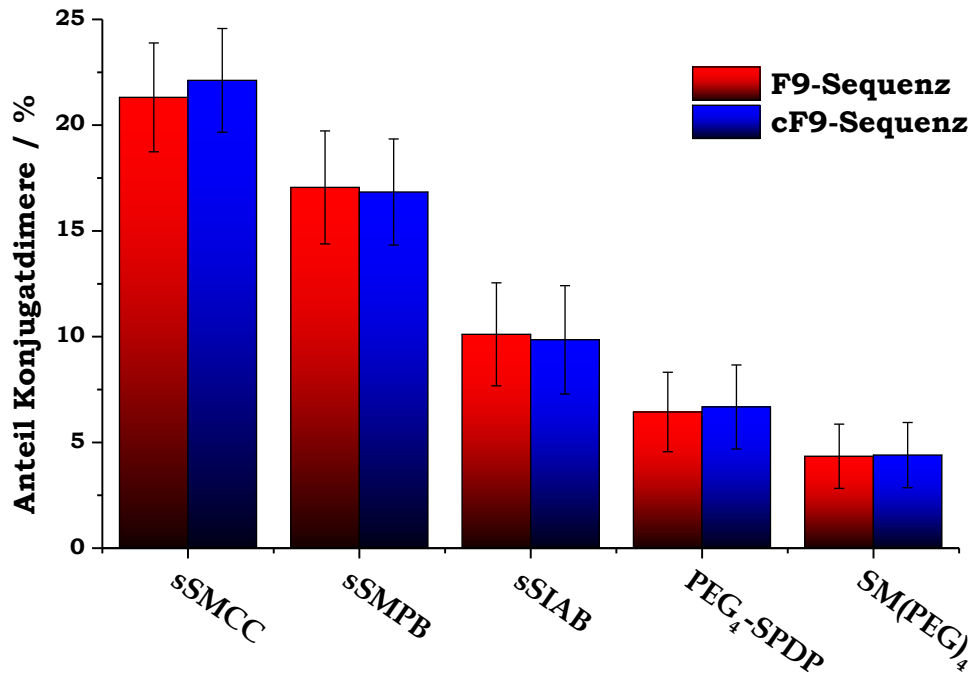


Abbildung 2.28: Säulendiagramm mit den Anteilen der Konjugatdimere bei der DNA-mSTV-Konjugatsynthese mit den verwendeten heterobispezifischen Crosslinkern sSMCC, sSMPB, sSIAB, PEG₄-SPDP und SM(PEG)₄. In **rot** sind die Dimer-Anteile bei Verwendung des Oligonucleotids F9 und in **blau** sind die Dimer-Anteile bei Verwendung des Oligonucleotids cF9 gezeigt.

Aus *Abbildung 2.28* lässt sich ein deutlicher Einfluss des heterobispezifischen Crosslinkers auf den Anteil der Bildung von Konjugatdimeren bei der DNA-mSTV-Konjugatsynthese erkennen. Bei der Konjugatsynthese mit den strukturell ähnlichen und in ihren reaktiven Gruppen identischen Crosslinkern sSMCC und sSMPB wurden die höchsten Anteile von Konjugatdimeren bestimmt. Durch die Verwendung von sSIAB ließ sich der Anteil der Konjugatdimere auf ca. 10% reduzieren. Unter Verwendung der heterobispezifischen Crosslinker mit PEG₄-Spacern (PEG₄-SPDP und SM(PEG)₄) konnten die Anteile der Konjugatdimere weiter reduziert werden. Dabei wurden mit SM(PEG)₄, welches wie sSMCC und sSMPB über eine NHS- und eine Maleinsäureimidgruppe reagiert, die geringsten Anteile der Konjugatdimeren bei der Konjugatsynthese erzielt. Eine weitere Diskussion über die Ursachen der Bildung von Konjugatdimeren unter Verwendung unterschiedlicher Crosslinker erfolgt in Kapitel 2.1.4.6 nach der Charakterisierung der Konjugatdimeren und -oligomere.

Bei der DNA-mSTV-Konjugatsynthese mit dem heterobispezifischen Crosslinker SM(PEG)₄ wurden die geringsten Anteile an Konjugatdimeren gebildet und es ließen sich gut reproduzierbare Ausbeute von ca. 20% erzielen. Darum wurde SM(PEG)₄ als Crosslinker für DNA-mSTV-Konjugate zum Assemblieren der in Kapitel 2.2 beschriebenen supramolekularen DNA-STV-Nanostrukturen ausgewählt.

2.1.3 Abtrennung von Konjugatdimeren nach der DNA-mSTV-Konjugatsynthese

Unter Verwendung von SM(PEG)₄ konnte der Anteil von Konjugatdimeren auf ca. 4% reduziert werden. Dennoch zeigte sich bei den ersten Ansätzen der Assemblierung von supramolekularen DNA-STV Nanostrukturen (siehe Kapitel 2.2), dass durch DNA-mSTV-Konjugatdimere unerwünschte Strukturen aufgebaut wurden. Daraus wurde deutlich, dass eine zusätzliche präparative Abtrennung der Konjugatdimere und -oligomere notwendig war.

Aufgrund des identischen m/z-Verhältnisses von Konjugatmonomere und Konjugatdimeren konnten diese bei der Anionenaustauschchromatographie nicht voneinander getrennt werden. Darum musste für die Abtrennung der Dimere und Oligomere eine auf Größentrennung basierende Methode gewählt werden.

2.1.3.1 Aufreinigung durch Flüssigchromatographie

Aufgrund der bestehenden Routinen mit dem FPLC-System wurde zunächst dieses unter Verwendung einer Größenausschluss säule mit einer festen Phase aus Superdex oder alternativ Sephacryl (beide von GE Healthcare; Freiburg, D) für die Trennung von DNA-mSTV-Konjugatmonomere von DNA-mSTV-Konjugatdimere ausgewählt.

Bei der Größenausschlusschromatographie (SEC) wird nach dem hydrodynamischen Volumen, das in der Regel proportional zur Molmasse ist, aufgetrennt.^[177] Probenmoleküle mit größerer Molmasse eluieren somit schneller von der Säule, da sie nicht in die Poren des Gelfiltrationsmediums gelangen können und dadurch auf dem kürzesten Weg die Säule passieren. Je kleiner die Probenbestandteile sind, desto kleinere Poren der Säulenmatrix sind für diese zugänglich, so dass sie einen längeren Weg in der Säule zurücklegen. Folglich eluieren kleine Moleküle bei der SEC nach den größeren.

Als erstes erfolgte die Größenausschlusschromatographie (SEC) mit einer Superdex gepackten Säule. Superdex ist ein Gelfiltrationsmedium aus Dextran mit kovalent gebundener, quervernetzter Agarose.^[178] 100 µL einer 20 µmol/L Lösung von **32a** (2.0 nmol) in PBS wurden manuell auf die Säule geladen und bei einem PBS-Fluss von 0.5 mL/min eluiert. Dabei ließ sich im Durchflussphotometer kein Signal bei $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 280$ nm detektieren. Vermutlich adsorbierte **32a** am Superdex und ließ sich mit PBS nicht von der Säule eluieren.

Als zweites Säulenmaterial für die SEC an der FPLC wurde Sephacryl verwendet. Dieses Gelfiltrationsmedium setzt sich aus kovalent vernetztem Allyl-Dextran und N,N-Methylenbisacrylamid zusammen.^[178] Erneut wurden 100 µL einer 20 µmol/L Lösung von **32a** (2.0 nmol) in PBS manuell auf die Säule geladen und bei einem PBS-Fluss von 0.5 mL/min eluiert. Ein repräsentatives SEC-Chromatogramm von **32a** ist in *Abbildung 2.29* dargestellt.

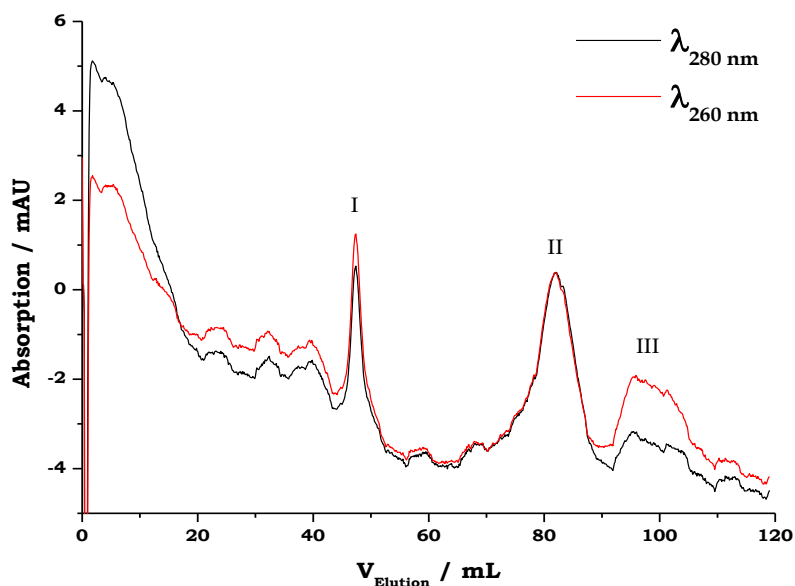


Abbildung 2.29: Repräsentatives SEC-Chromatogramm von SM(PEG)₄ verknüpftem F9-mSTV-Monokonjugat. I) (**32a**)₂, II) **32a** und III) freies F9.

Unter der Annahme, dass bei der SEC die Probenbestandteile in einer Reihenfolge der abnehmenden Molmasse eluieren, wurde Peak I dem Konjugatdimer (**32a**)₂ zugeordnet. Der A₂₆₀/A₂₈₀-Wert von ≈ 1 ließ den Erhalt der kovalenten Bindung des Oligonucleotids zum mSTV und den Erhalt Tertiärstruktur des mSTV in Peak 1 vermuten.

In Peak II eluierte das Konjugatmonomere **32a**. Auch hier zeigt der A₂₆₀/A₂₈₀-Wert von ≈ 1 , dass in diesem Peak nicht denaturierte Monokonjugate eluierten.

Peak III wurde freiem Oligonucleotid (F9) zugeordnet, was durch einen A₂₆₀/A₂₈₀-wert > 1 bestätigt wurde.

Bei der SEC mit Sephadex wurde eine isolierte Ausbeute von $1.9\% \pm 0.4\%$ für den Konjugatmonomere **32a** erzielt. Eine Quantifizierung der Fraktionen von (**32a**)₂ war mangels ausreichender Stoffmenge nicht möglich. Große Anteile des F9-mSTV-Konjugats waren erneut an der Säule adsorbiert und konnten mit den verwendeten Puffern nicht aus dem Säulenmaterial eluiert werden.

Es folgte ndPAGE zur Charakterisierung des mittels SEC aufgereinigten SM(PEG)₄ verknüpftem F9-mSTV-Monokonjugat. Dafür wurden jeweils 2.0 pmol **32a** nach SEC und als Vergleich **32b** ohne SEC auf das Gel geladen. Zusätzlich wurde als Kontrolle **32a** nach SEC mit zwei Äquivalenten cF9 bzw. bf5 inkubiert und auf die Säule geladen. Als weitere Kontrolle wurden **32a** nach SEC inkubiert mit einem Äquivalent **32b** auf die Säule geladen. Alle Proben wurden mit 6x Orange DNA Loading Dye gemischt und dann in die Taschen des 8.5% ndGel gegeben. Das dabei aufgenommene Gel ist in *Abbildung 2.30* dargestellt.

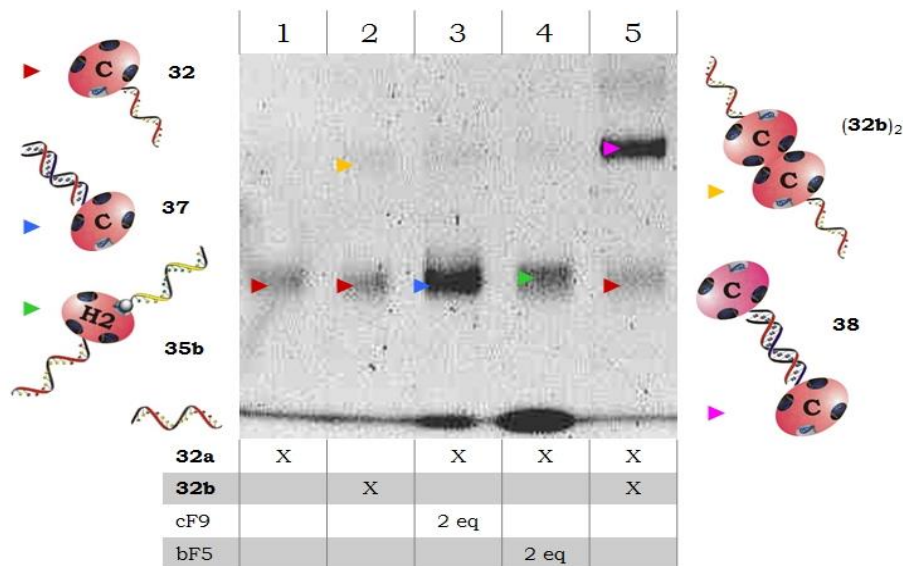


Abbildung 2.30: 8.5% ndPAGE von SM(PEG)₄ verknüpftem F9-mSTV-Monokonjugat nach der SEC mit anschließender Sybr Gold Färbung; **Spur 1: 32a** nach SEC, **Spur 2: 32b** ohne SEC, **Spur 3: 32a** nach SEC mit 2 eq cF9, **Spur 4: 32a** nach SEC mit 2 eq bF5 und **Spur 5: 32a** nach SEC + **32b** ohne SEC.

In Spur 1 ist eine Bande (▶) mit einer für DNA-STV-Konjugat typischen elektrophoretischen Mobilität zu erkennen. Dieser Bande wurde **32a** zugeordnet.

In Spur 2 kann eine Bande (▶), mit zur Bande in Spur 1 identischer Mobilität erkannt werden, der **32b** zugeordnet wurde. Einer zweiten weniger intensiven Bande (▶) mit reduzierter elektrophoretischer Mobilität wurde (**32b**)₂ zugeordnet. Der Vergleich der Banden in Spur 1 und 2 zeigt die erfolgreiche Abtrennung der Konjugatdimeren bei der SEC. In der, mit SEC-aufgereinigten **32a** beladenen, Spur 1 ist kein Konjugatdimer zu erkennen, wohingegen in der, mit nicht SEC-aufgereinigten **32b** beladenen Spur 2 die Bande (▶) des Konjugatdimeres zu erkennen ist.

In Spur 3 ist eine intensive Bande (▶) zu erkennen, dieser wurde **37** zugeordnet. Durch die Hybridisierung stiegen das m/z-Verhältnis und das hydrodynamische Volumen. Beide Effekte hatten bei **37** etwa gleich große, entgegengesetzt wirkende Einflüsse auf die elektrophoretische Mobilität. Die intensivere Anfärbung dieser Bande, war eine Folge der gesteigerten Bindeaffinität von Sybr Gold zum dsDNA in (F9₁-SM(PEG)₄-mSTV)₁.

In Spur 4 ist eine Bande (▶) mit leicht reduzierter Mobilität im Vergleich zu den Banden in den Spuren 1 bis 3 zu erkennen. Dieser Bande wurde **35b** zugeordnet.

In Spur 5 ist eine Bande (▶) zu erkennen, die analog zu Spur 1 und **32a** und **32b** zugordnet wurde. Eine weitere weniger mobile Bande (▶) wurde der hybridisierten Nanohantel **38** aus den komplementären Konjugaten zugeordnet. Das ähnliche m/z-Verhältnis und hydrodynamische Volumen der assemblierten Nanohantel führte zu einer annähernd identischen elektrophoretischen Mobilität, wie sie bei den Konjugatdimeren (▶) von **32b** beobachtet wurde. Dieser Befund ist

ein weiterer klarer Hinweis darauf, dass es sich bei der elektrophoretisch weniger mobilen Verunreinigung tatsächlich um ein Konjugatdimeren handelt. Im Gegensatz zur Bande des Konjugatdimeres wurde die Bande der Nanohantel deutlich intensiver mit Sybr Gold gefärbt. Ursache dürfte die größere Stoffmenge der Nanohantel und die höhere Affinität des fluoreszenten Interkalators zur dsDNA der Nanohantel sein.

Außerdem lassen sich in *Abbildung 2.30* in Spur 3 und 4 auf Höhe der Lauffront des Gels je eine Bande erkennen. Diesen Banden wurden cF9 (Spur 3) und bF5 (Spur 4) zugeordnet.

Bei einer durchschnittlichen isolierten Ausbeute der SM(PEG)₄ verknüpftem DNA-mSTV-Konjugatsynthese von ca. 20% und einer isolierten Ausbeute der folgenden SEC von ca. 2% wurde eine Ausbeute über beide Schritte von 4‰ erzielt. Diese geringe Ausbeute ist als Standardprotokoll für die DNA-mSTV-Konjugatsynthese und Aufreinigung unzureichend und wurde deshalb nicht weiter verfolgt.

Eine letzte Versuchsreihe mit SEC zur Trennung von SM(PEG)₄ verknüpften DNA-mSTV-Monokonjugaten von deren Konjugatdimeren erfolgte mit einer TSKgel G3000SW Säule von Tosoh (Stuttgart, D) mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC). Die Säule ist mit 10 - 13 nm großen Silicakugeln mit Diol-Funktionalisierung gefüllt, die eine Matrix mit einer Porengröße von ca. 250 Å aufbauen.^[179] TSKgel G3000SW sind für globuläre Proteine in einem Massenbereich von 10 kDa bis 500 kDa optimiert. Mit einer erwarteten Masse von ca. 60 kDa bei **32a** und ca. 120 kDa bei (**32a**)₂ war eine gute Trennleistung der SEC mit der TSKgel G3000SW zu erwarten.

Für die SEC an der HPLC wurden 20 µL 10.0 µmol/L SM(PEG)₄ verknüpftes DNA-mSTV-Monokonjugat (200 pmol) in PBS mit einem Autosampler auf die Säule geladen und bei einem Fluss von 0.5 mL/min eluiert. Die Detektion erfolgte wie bei der FPLC durch Absorptionsmessungen bei $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 280$ nm. Ein beispielhaftes HPLC-Chromatogramm ist in *Abbildung 2.31* dargestellt.

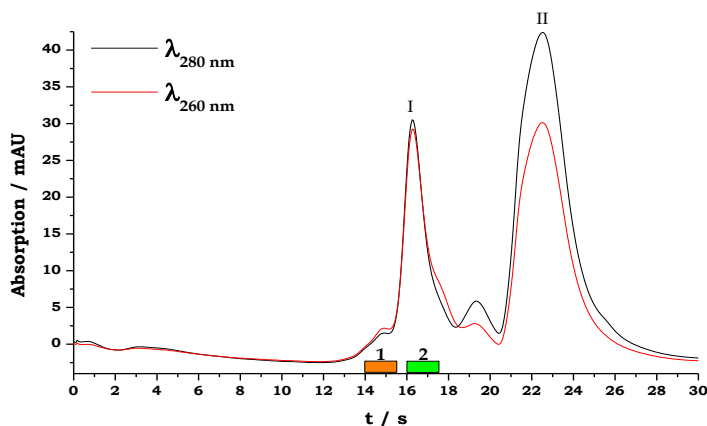


Abbildung 2.31: HPLC-Chromatogramm von SM(PEG)₄ verknüpftes DNA-mSTV-Monokonjugat; I) **32a** und II) mSTV; für die folgende ndPAGE wurden die Fraktionen **1** und **2** gesammelt und aufkonzentriert.

Bei dem in *Abbildung 2.31* gezeigten Größenausschlusschromatogramm von SM(PEG)₄ verknüpftes DNA-mSTV-Monokonjugat lassen sich zwei intensive Peaks erkennen. Im Peak I eluierte sämtliches nicht denaturiertes DNA-mSTV-Monokonjugat mit einem charakteristischen A₂₆₀/A₂₈₀-Wert von ≈ 1. Wegen der mangelnden Peaktrennung wurden die Fraktionen unter der linken Schulter von Peak I (Fraktion **1**) und dem Zentrum von Peak I (Fraktion **2**) in getrennten Fraktionen gesammelt, separat vereinigt, aufkonzentriert, quantifiziert und mittels ndPAGE charakterisiert.

In Peak II eluierte ein Konjugatbestandteil mit einer kleineren Molmasse als das Konjugat in Peak I. Unter Berücksichtigung des A₂₆₀/A₂₈₀-Wertes von < 1 und in Erwartung einer geringeren Molmasse als der Konjugatmasse, wurde Peak II freiem mSTV oder mSTV-Untereinheiten zugeordnet.

Die weitere Charakterisierung der Fraktionen erfolgte mittels ndPAGE. Dafür wurden je 2 pmol des Konjugats aus Fraktion der HPLC **1** und **2** sowie nicht HPLC-aufgereinigtes SM(PEG)₄ verknüpftes DNA-mSTV-Monokonjugat mit 6x Orange DNA Loading Dye gemischt und auf das, in *Abbildung 2.32* gezeigte, 8.5% ndGel geladen.

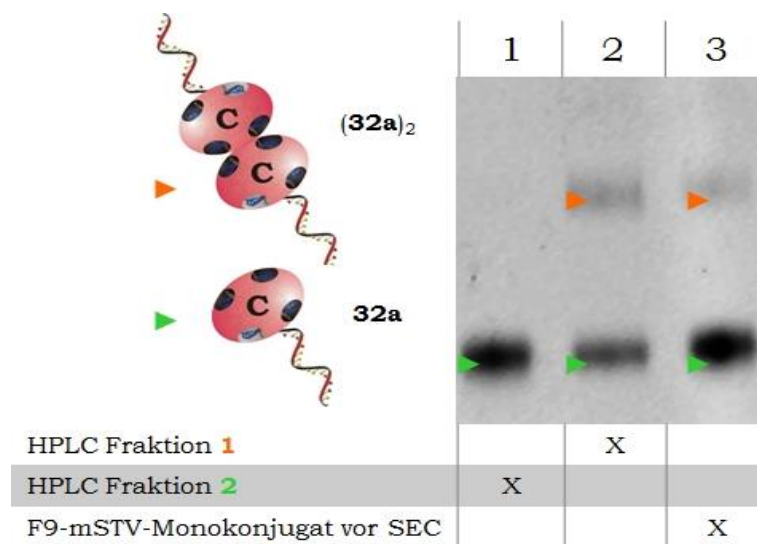


Abbildung 2.32: 8.5% ndPAGE von F9₁-SM(PEG)₄-mSTV nach SEC an der HPLC mit anschließender Sybr Gold Färbung; **Spur 1:** Fraktion **1** nach der HPLC, **Spur 2:** Fraktion **2** nach der HPLC und **Spur 3:** F9₁-SM(PEG)₄-mSTV ohne HPLC.

In Spur 1 lässt sich eine scharfe Bande (▶), mit der charakteristischen elektrophoretischen Mobilität eines Konjugatmonomeres erkennen (siehe ▶ in *Abbildung 2.30*). Der Bande wurde dem erfolgreich aufgereinigten **32a** zugeordnet.

In Spur 2 sind zwei Banden zu erkennen. Der mobileren Bande (▶) mit zur Bande in Spur 1 identischer Mobilität wurde **32a** zugeordnet. Der andere Bande (▶) der Konjugatdimer wurde (**32a**)₂ zugeordnet.

In Spur 3 sind zu Spur 2 identische Banden zu erkennen und es erfolgte eine analoge Bandenzuordnung. Die mobilere Bande (▶) wurde **32a** und die zweite Bande (▶) wurde (**32a**)₂ zugeordnet.

Peak II des HPLC-Chromatogramms wurde als freies mSTV oder mSTV-Monomere identifiziert. Diese Zuordnung wurde bei der ndPAGE bestätigt, da keine Bande aus den vereinten Fraktionen von Peak II bei der ndPAGE mit anschließender Silber Färbung zu erkennen waren (Daten nicht gezeigt). Dieses entspricht dem typischen elektrophoretischen Verhalten von mSTV, das bei der ndPAGE mangels Ladung nicht in das Trenngel wandern kann.

Die in *Abbildung 2.32* gezeigte ndPAGE bestätigte die Peakzuordnung bei der SEC in *Abbildung 2.29*. Dabei eluiert das **32a** in Peak 1 im HPLC-Chromatogramm, wobei das Konjugatdimer unter der linken Schulter von Peak I identifiziert wurde.

Durch die Auswahl der Fraktionen **1** und **2** konnte aufgereinigtes Konjugatmonomer **32a** abgetrennt werden. $(\mathbf{32a})_2$ konnte hingegen nur in einer Fraktion mit **32a** gesammelt werden. Durch die

Bei der SEC an der HPLC mit einer TSKgel G3000SW Säule wurde eine isolierte Ausbeute von $8.9\% \pm 1.3\%$ für das Konjugatmonomer **32a** erzielt. Damit wurde eine Gesamtausbeute über die DNA-mSTV-Monokonjugatsynthese und Aufreinigung von ca. 1.8% erzielt. Die Ausbeute für $(\mathbf{32a})_2$ ließ sich aufgrund der großen Anteile von Konjugatmonomeren nicht bestimmen.

Die im HPLC-Chromatogramm in *Abbildung 2.31* gezeigte Peaktrennung bei der SEC war unzureichend, da der Konjugatdimer als Schulter des Konjugatmonomers eluierte. In folgenden Ansätzen sollte die Peaktrennung unter Variation der Chromatographiebedingungen gesteigert werden. Dabei wurden die mobile Phase (PBS, Tris oder H_2O), der pH-Wert, die aufgetragene Stoffmenge und die Flussgeschwindigkeit der mobilen Phase variiert. Die Peaktrennung konnte durch Flussreduktion und Reduktion der Säulenbeladung gesteigert werden. Dieses führte jedoch gleichzeitig zu einer Reduktion der Ausbeute auf $< 1\%$.

Die SEC an der HPLC stellte sich somit zur präparative Aufreinigung der SM(PEG)₄ verknüpften DNA-mSTV-Konjugate ebenfalls als nicht geeignete Methode heraus. Vermutlich denaturierten große Anteile der aufzureinigenden DNA-mSTV-Konjugate unter den harschen Scherkräften bei der HPLC. Aufgrund der geringen Ausbeuten und der niedrigen einsetzbaren Stoffmengen wurde die Aufreinigung mittels HPLC verworfen.

2.1.3.2 Aufreinigung durch präparative Asymmetrischer-Fluss-Feldflussfraktionierung

Bei der präparativen Asymmetrischer-Fluss-Feldflussfraktionierung (pAF4) werden Probenmoleküle nach dem hydrodynamischen Radius aufgetrennt (siehe Kapitel 1.2). Dabei kann unter idealisierten Bedingungen (annähernd sphärische Partikel in einem Größenbereich von 50 nm bis 500 nm) zwischen Partikeln mit einem Massenunterschied von 10% getrennt werden.^[141]

Bei der Größenausschlusschromatographie wurden lediglich Ausbeuten unterhalb von 10% erreicht. Die DNA-mSTV-Konjugate wurden vermutlich durch die Scherkräfte in den Chromatographie-Systemen denaturiert oder zeigten eine zu hohe Bindeaffinität zu dem Säulenmaterial.

Mit der pAF4 sollten bei der Aufreinigung der DNA-mSTV-Konjugate höhere Ausbeuten erzielt werden, da bei der pAF4 minimale Scherkräfte und Wechselwirkungen zwischen Probe und Trennkanal auftreten.^[180]

Das für die aAF4 optimierte Flussprofil wurde als Ausgangsbedingung für die pAF4 übernommen. Für die präparative Verwendung der AF4 war ein großer Stoffmengenumsatz für den analytischen Trennkanal (größter verfügbarer Kanal) erforderlich. Eine Überladung der AF4 führt zur einer deutlichen Verschlechterung der Peaktrennung. Die Peaktrennung wurde deshalb durch gesteigerten Querfluss, Anpassung des Drucks im Trennkanal und einen größeren Spacer (500 μm) gesteigert.

Im Gegensatz zur aAF4 konnten bei der pAF4 300 pmol Probe (20 μL ; 15 $\mu\text{mol/L}$) in den Trennkanal geladen werden. Für die Aufreinigung größerer Stoffmengen waren sequenzielle pAF4-Läufe notwendig. Der Fraktionssammler erlaubt die fraktionierte Sammlung von bis zu zehn AF4-Läufen. So konnten über Nacht bis zu 3.0 nmol mSTV-DNA-Konjugate aufgereinigt werden. Fünf repräsentative pAF4-Fraktogramme einer Aufreinigungssequenz von $\text{SM}(\text{PEG})_4$ verknüpftes F9-mSTV-Monokonjugat sind in *Abbildung 2.33* dargestellt.

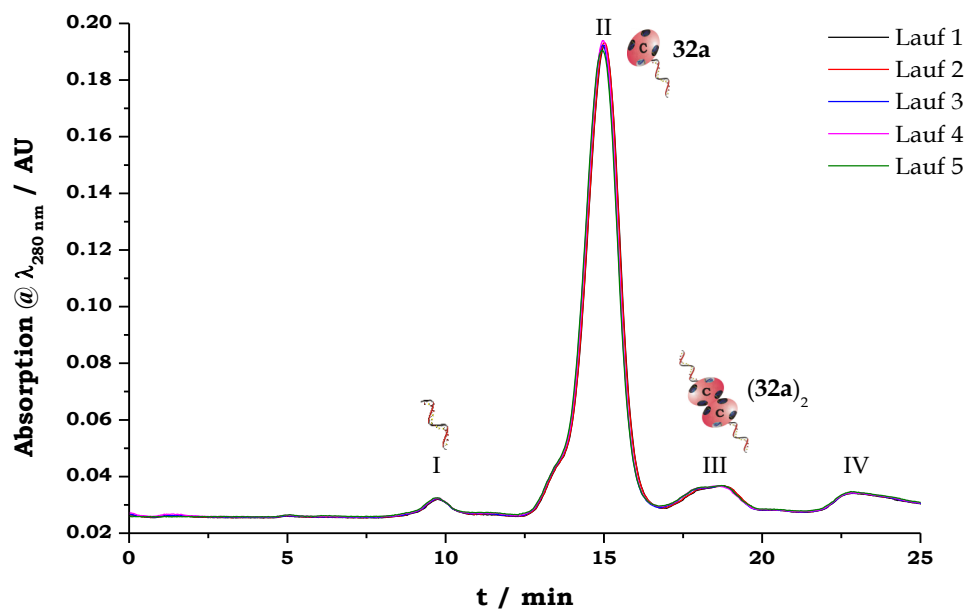


Abbildung 2.33: Fünf aufeinander gelegte pAF4-Fraktogramme einer Aufreinigungssequenz von $\text{SM}(\text{PEG})_4$ verknüpftes F9-mSTV-Monokonjugat detektiert bei $\lambda = 280 \text{ nm}$; I) freies F9, II): **32a**, III) **(32a)₂** und IV) aggregiertes Konjugat.

Die Peakzuordnung der pAF4 in *Abbildung 2.33* erfolgte analog zur aAF4 von $\text{SM}(\text{PEG})_4$ verknüpftes F9-mSTV-Monokonjugat in *Abbildung 2.25*. Hierbei ist im Gegensatz zur aAF4 auch ein Peak von freien F9 zu erkennen. Durch die verglichen

zur aAF4 verdreifachte Stoffmenge bei der pAF4 erreichten die freien Oligonucleotide die Detektionsgrenze und wurden im abgebildeten Fraktogramm Peak I zugeordnet. Die fünf sequenziellen pAF4-Läufe zeigen die gute Reproduzierbarkeit bei der AF4 und erlauben die Programmierung des Fraktionssammlers auf identische Fraktionsbereiche innerhalb eines pAF4-Laufes.

Bei der pAF4 mit SM(PEG)₄ verknüpften F9-mSTV-Monokonjugat wurden isolierte Ausbeuten von 59.6% ± 2.2% für **32a** und 5.5% ± 1.7% für (**32a**)₂ erzielt. Daraus ergibt sich eine Gesamtausbeute für **32a** nach Konjugatsynthese und Aufreinigung mittels Anionenaustauschchromatographie und pAF4 von ca. 12%.

Anschließend wurden die Fraktionen von Peak II und Peak III jeweils vereint, aufkonzentriert, in PBS umgepuffert und quantifiziert. Danach wurden die pAF4-aufgereinigten F9-mSTV-Monokonjugate mittels ndPAGE charakterisiert. Dafür wurden jeweils 2 pmol **32a**, (**32a**)₂ und nicht pAF4-aufgereinigtes F9-mSTV-Monokonjugat mit 6x Orange DNA Loading Dye gemischt und auf das, in *Abbildung 2.34* dargestellte, 8.5% ndGel geladen.

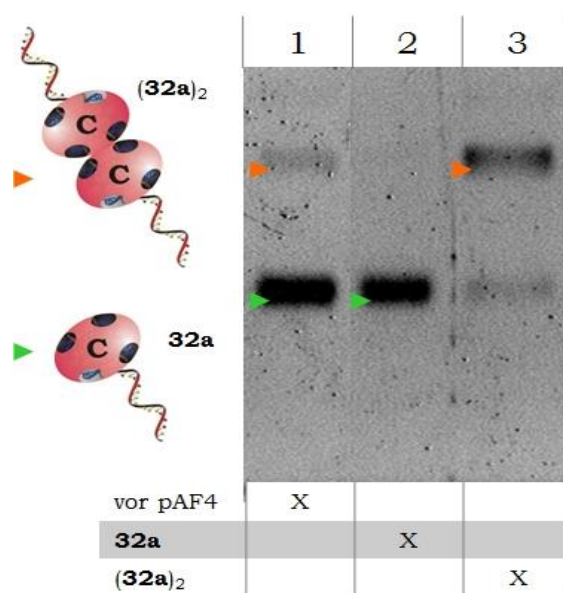


Abbildung 2.34: 8.5% ndPAGE von SM(PEG)₄ verknüpftes F9-mSTV-Monokonjugat nach pAF4 mit anschließender Sybr Gold Färbung; **Spur 1:** F9-mSTV-Monokonjugat vor pAF4, **Spur 2:** **32a** aus pAF4 Peak II und **Spur 3:** (**32a**)₂ aus pAF4 Peak II

In der mit nicht aufgereinigten F9-mSTV-Monokonjugat beladenen Spur 1 lassen sich zwei Banden erkennen. Der intensiven und elektrophoretisch mobileren Bande (▶) wurde **32a** und der anderen Bande (▶) wurde (**32a**)₂ zugeordnet.

In Spur 2 wurde Probe aus Fraktionen unter Peak II der pAF4 in *Abbildung 2.33* geladen, wobei sich im Gel eine intensive Bande erkennen lässt (▶). Der Bande wurde der erfolgreich aufgereinigte Konjugatmonomer **32a** zugeordnet.

In der mit Probe aus Fraktionen unter Peak III der pAF4 beladenen Spur 3 lassen sich zwei Banden erkennen. Der mobileren Bande wurde einer Verunreinigung durch Konjugatmonomer zugeordnet. Der anderen Bande (▶) wurde erfolgreich abgetrennten Konjugatdimer (**32a**)₂ zugeordnet.

Eine weitere Charakterisierung der pAF4 aufgereinigten F9-mSTV-Konjugatmonomere und -dimere erfolgte mittels SDS-PAGE. Dafür wurden je 20 pmol **32a**, (**32a**)₂, nicht pAF4-aufgereinigtes F9-mSTV-Monokonjugat und mSTV mit 4x SDS-Probenpuffer gemischt und in die Geltaschen geladen. Dabei wurde je eine Geltasche mit unmittelbar angesetzter Probenlösung ohne zuvor durchgeführte Denaturierung und eine weitere nach thermischer Denaturierung beladen. Das zugehörige Gel ist in *Abbildung 2.35* gezeigt.

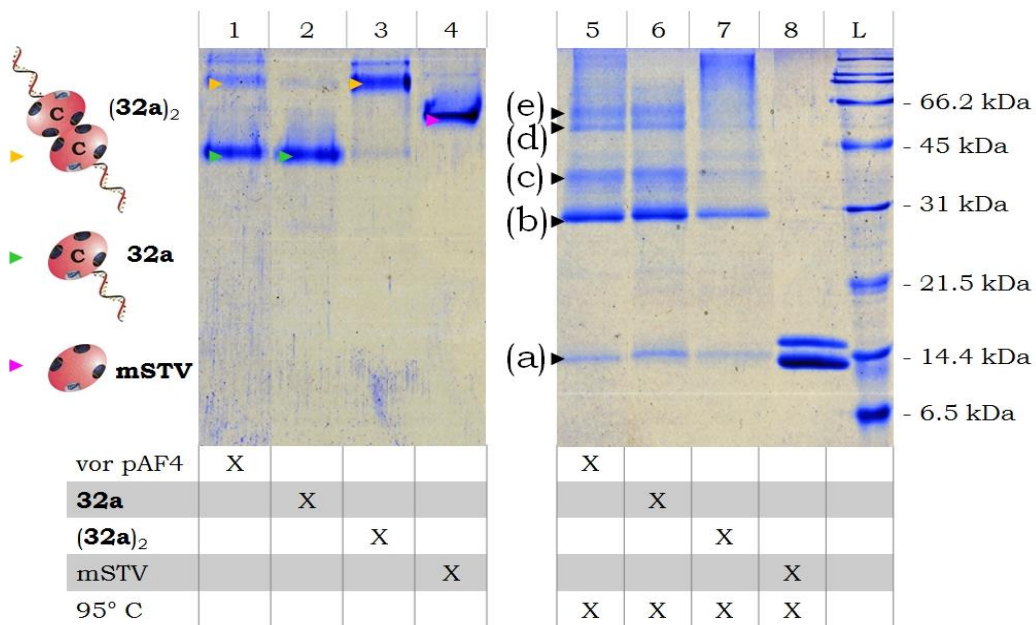


Abbildung 2.35: SDS-PAGE von **32a** und (**32a**)₂ nach Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blau; **Spur 1:** F9-mSTV-Monokonjugat vor pAF4, **Spur 2:** **32a**, **Spur 3:** (**32a**)₂, **Spur 4:** mSTV, **Spur 5:** F9-mSTV-Monokonjugat vor pAF4 @95 °C, **Spur 6:** **32a** @95 °C, **Spur 7:** (**32a**)₂ @95 °C, **Spur 8:** mSTV @95 °C und **L:** Protein-Größenstandard.

Wie an den Spuren 1 bis 3 in *Abbildung 2.35* zu erkennen ist, zeigen die Konjugate bei der SDS-Page ohne thermische Denaturierung eine zur ndPAGE vergleichbare Bandentrennung. Darum erfolgte die Bandenzuordnung bei der SDS-PAGE in den Spuren 1 bis 3 analog zur ndPAGE in *Abbildung 2.34*. Die Bande in Spur 4 (▶) konnte mSTV zugeordnet werden, das durch die Zugabe des Detergens SDS in das Trenngel wandern konnte. Wie schon bei der SDS-Page mit F9-nSTV beobachtet, zeigte **32a** (▶) eine höhere elektrophoretische Mobilität als nicht konjugiertes mSTV. Ursache dafür war das höhere m/z-Verhältnis des Konjugatmonomers gegenüber freiem mSTV. Dahingegen führte das größere hydrodynamische Volumen des Konjugatdimers (**32a**)₂ (▶) zu einer reduzierten Mobilität im Vergleich zu mSTV.

Die Banden mit thermisch denaturierten Konjugaten erlauben eine Abschätzung der molekularen Masse der Bandenbestandteile anhand des Protein-Größenstandards. Zur Vereinfachung der Diskussion sind die Hauptbanden nach sinkender gelelektrophoretischer Mobilität mit **(a)** bis **(e)** benannt.

In Spur 5 sind Banden **(a)** bis **(e)** und ein verschmierter Bereich über **(e)** zu erkennen. Unter Berücksichtigung der vom Protein-Größenstandard vorgegebenen molaren Masse, wurde **(a)** mSTV-Monomeren, **(b)** mSTV-Dimeren, **(c)** mSTV-Dimeren, die mit Oligonucleotid F9 gekuppelt waren, **(d)** mSTV-Tetrameren und **(e)** mSTV-Tetrameren die mit Oligonucleotid F9 gekuppelt waren, zugeordnet. Weiterhin lässt sich vermuten, dass der verschmierte Bereich über **(e)** durch mSTV-Dimere und -Oligomere (bestehend aus sechs und mehr STV-Untereinheiten) entstand. Eine mögliche Ursache für die Bildung dieser mSTV-Oligomere ist die intermolekulare Verknüpfung von mSTV-Untereinheiten zwischen unterschiedlichen mSTV-Tetrameren in Folge der Derivatisierung mit dem heterobispezifischen Crosslinker SM(PEG)₄.

In Spur 6 sind erneut **(a)** bis **(e)** zu erkennen. Die Bandenzuordnung entsprach Spur 5 mit der Ausnahme, dass hier kein verschmierter Bereich über **(e)** zu erkennen ist. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die mSTV-Oligomere nicht in der Fraktion des Konjugatmonomeres **32a** auftraten. Folglich enthielt **32a** keine zwischen unterschiedlichen mSTV-Molekülen verbrückten Untereinheiten. Dennoch zeigen die Banden **(a)** bis **(e)**, dass große Anteile der mSTV-Untereinheiten bei der DNA-mSTV-Konjugatsynthese kovalent miteinander verknüpft wurden.

In Spur 7 lassen sich bei reduzierter Intensität **(a)** bis **(e)** und ein stark verschmierter Bereich über **(e)** erkennen. Die Bandenzuordnung erfolgte analog zu Spur 5. Der verschmierte Bereich über **(e)** zeigte, dass **(32a)₂** einen großen Anteil an mSTV-Oligomeren enthielt.

In Spur 8 sind zwei Banden zu erkennen. Die elektrophoretisch mobilere Bande wurde dSTV-Monomeren und die weniger intensive Bande nSTV-Monomere mit His₆-Tag zugeordnet.

Die ndPAGE- und SDS-PAGE-Analysen von **32a** und **(32a)₂** zeigten die erfolgreiche Auftrennung der Konjugatmonomere und Konjugatdimere. Es wurde bei der pAF4 eine Ausbeute bei der Aufreinigung des Konjugatmonomere von ca. 60% erzielt, so dass hinreichend aufgereinigtes DNA-mSTV-Konjugat für die Assemblierung der DNA-STV-Nanostrukturen **1** bis **4** bereitgestellt werden konnte. pAF4 wurde im weiteren Verlauf als Standardmethode zur Abtrennung von Konjugatdimeren und -oligomeren nach der DNA-mSTV-Konjugatsynthese verwendet.

2.1.4 Charakterisierung der Bildung von Konjugatdimeren und -oligomeren bei der DNA-STV Konjugatsynthese

Wie im Kapitel 2.1.1.1 beschrieben wurde die Bildung von DNA-STV-Konjugaten mit einer variierenden Anzahl gebundener Oligonucleotide über das stöchiometrische Stoffmengenverhältnis der eingesetzten Menge an Protein und Oligonucleotiden gesteuert. Diese Variation führte zu einer statistischen Verteilung der DNA-STV-Monokonjugate bis Tetrakonjugate, die im Anschluss mithilfe von Anionenaustauschchromatographie voneinander getrennt werden konnten. Die Ursache für die in Kapitel 2.1 beschriebene Bildung Konjugatdimeren und -oligomeren bei der Konjugatsynthese blieb jedoch ungeklärt. Diese sollte im Folgenden näher untersucht werden. Hierzu sollten DNA-nSTV-Monokonjugate mittels Anionenaustauschchromatographie und nachfolgender pAF4 in Konjugatmonomere und -dimere aufgetrennt und anschließend mittels SDS-PAGE charakterisiert werden.

Die in *Abbildung 2.35* gezeigte SDS-PAGE Analyse von **32a** und **(32a)₂** lässt vermuten, dass höhere Konjugatdimere und -oligomere aufgrund der kovalenten Verknüpfung von mSTV-Untereinheiten entstehen, die intermolekular zwischen den mSTV-Molekülen bei der Konjugatsynthese gebildet werden. Diese Hypothese sollte im Folgenden weiter untersucht werden.

Die Charakterisierung der Bildung Konjugatdimeren und -oligomeren wird durch die Verwendung von DNA-mSTV-Konjugaten erschwert, da sich mSTV aus Untereinheiten unterschiedlichen Molgewichts zusammensetzt (mSTV- und dSTV-Monomere). Zur Umgehung dieser Probleme sollte die weitere Untersuchung dieser Dimerisierung anhand von DNA-nSTV-Monokonjugaten erfolgen.

2.1.4.1 Charakterisierung der kovalenten DNA-nSTV-Konjugate

F9-nSTV-Monokonjugat wurde zunächst mittels Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt und anschließend mittels pAF4 in das Konjugatmonomer **5a** und das Konjugatdimer **(5a)₂** aufgetrennt. Die erhaltenen Peaks wurden anschließend mittels SDS-PAGE charakterisiert.

Bei der pAF4 wurden vom Autosampler 300 pmol F9-nSTV-Monokonjugat in den Analysekanal injiziert. Für die pAF4 wurde die Aufreinigungssequenz 40mal wiederholt und die Fraktionen unter den Produktpeaks wurden anschließend jeweils vereinigt, umgepuffert, aufkonzentriert und quantifiziert. Ein repräsentatives Fraktogramm der Aufreinigung von F9-nSTV-Monokonjugat ist in *Abbildung 2.36* dargestellt.

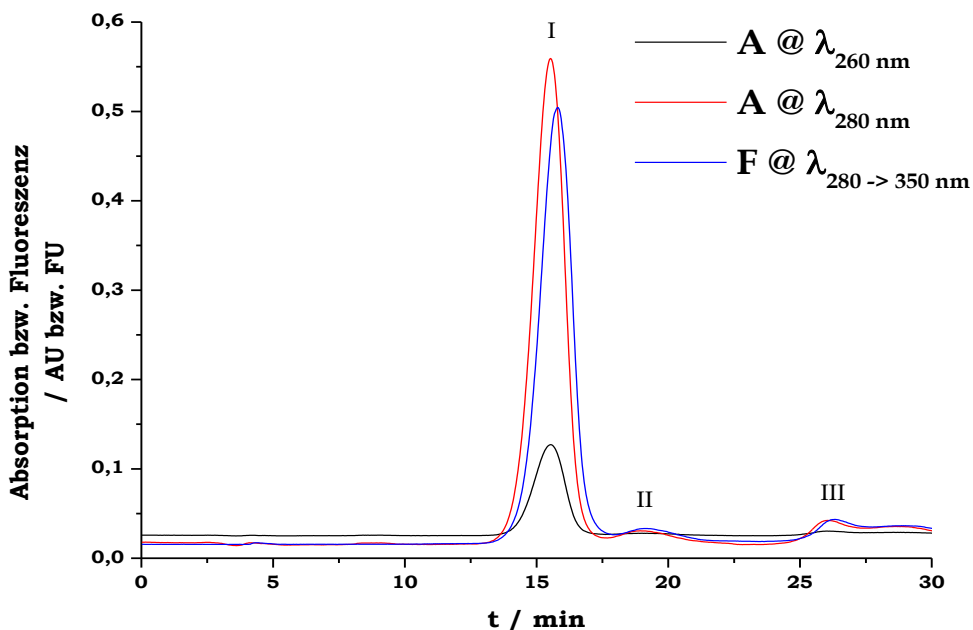


Abbildung 2.36: *aAF4-Fraktogramm von F9-nSTV-Monokonjugat; Peak I: **5a**, Peak II: (**5a**)₂ und Peak III aggregiertes Konjugat.*

Die Peakzuordnung erfolgte analog zur pAF4 von SM(PEG)₄ verknüpften F9-mSTV-Monokonjugat (siehe *Abbildung 2.33*). So eluierte in Peak I **5a**, in Peak II (**5a**)₂ und in Peak III höhermolekulares aggregiertes Konjugat. Im Fraktogramm lässt sich ein verglichen mit mSTV-DNA-Konjugaten geringer Anteil an Konjugatdimeren in Form der anteilig kleinen Fläche unter Peak II erkennen. Es wurde ein Verhältnis von (**5a**)₁ zu (**5a**)₂ von 50 zu 1 bestimmt (2% Konjugatdimer).

Daraus lässt sich berechnen, dass bei einer isolierten Ausbeute der pAF4 von 59.8% ± 2.1% für den Konjugatmonomer **5a** und 1.2% ± 0.3% für das Konjugatdimer (**5a**)₂ in einem sequenziellen Durchlauf ca. 3.7 pmol (**5a**)₂ isoliert wurden. Nach 40 pAF4-Läufen wurden damit für die weitere Charakterisierung mittels SDS-PAGE ca. 7150 pmol Konjugatmonomer und ca. 150 pmol Konjugatdimer bereitgestellt.

Im Anschluss erfolgte die SDS-PAGE Charakterisierung der mittels pAF4 aufgereinigten Konjugatmonomere und -dimere. Dafür wurden jeweils 20 pmol nicht aufgereinigtes F9-nSTV-Monokonjugat, **5a**, (**5a**)₂ und nSTV mit 4x SDS-Probenpuffer gemischt und in die Geltaschen geladen. Dabei wurde je eine Geltasche mit unmittelbar angesetzter Probenlösung ohne zuvor durchgeführte Denaturierung und je eine weitere nach thermischer Denaturierung beladen. Das zugehörige Gel ist in *Abbildung 2.37* gezeigt.

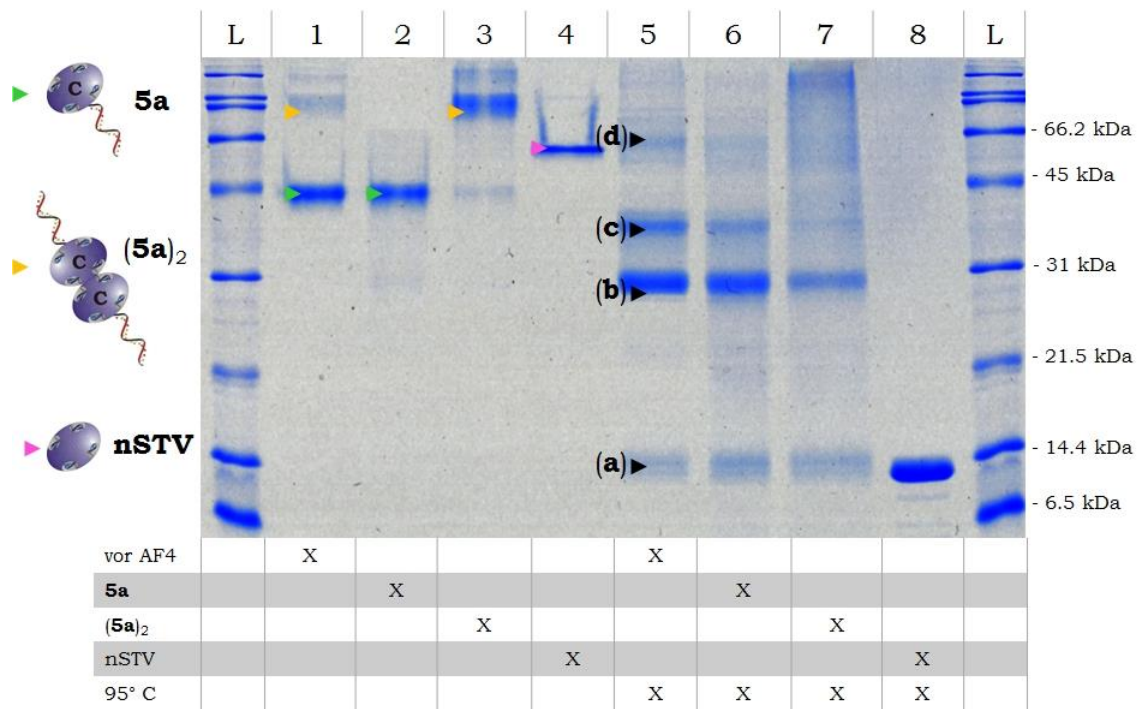


Abbildung 2.37: SDS-PAGE von F9-nSTV-Monokonjugat nach Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blau; **L:** Protein-Größenstandard **Spur 1:** F9-nSTV-Konjugat vor pAF4, **Spur 2:** **5a**, **Spur 3:** **(5a)₂**, **Spur 4:** nSTV, **Spur 5:** F9-nSTV-Konjugat vor pAF4 @95 °C, **Spur 6:** **5a** @95 °C, **Spur 7:** **(5a)₂** @95 °C und **Spur 8:** nSTV @95 °C.

In der mit nicht pAF4 aufgereinigten F9-nSTV-Konjugat beladenen Spur 1 lassen sich zwei Banden erkennen. Der elektrophoretisch mobileren Bande (▶) wurde **5a** zugeordnet, der Bande geringerer Mobilität (▶) **(5a)₂**.

In Spur 2 wurden die vereinten Fraktionen aus Peak I der pAF4 aus *Abbildung 2.36* geladen. Im Gel lässt sich eine intensive Bande erkennen (▶), dieser wurde erfolgreich aufgereinigtes Konjugatmonomer **5a** zugeordnet.

In Spur 3, die mit den vereinten Fraktionen aus Peak II der pAF4 beladen wurde, lassen sich zwei Banden erkennen. Die mobilere Bande wurde einer Verunreinigung von **5a** zugeordnet. Der Hauptbande (▶) wurde das Konjugatdimer **(5a)₂** zugeordnet.

In Spur 4 ist eine scharfe Bande (▶) zu erkennen, die dem als Kontrolle zugegebenem nSTV zugeordnet wurde.

Zu Vereinfachung der Diskussion sind die Hauptbanden der denaturierten Konjugate mit sinkender gelelektrophoretischer Mobilität von **(a)** bis **(d)** benannt.

In Spur 5 sind Banden **(a)** bis **(d)** und ein gering verschmierter Bereich über Bande **(d)** zu erkennen. Unter Berücksichtigung der vom Protein-Größenstandard vorgegebenen molaren Masse wurde **(a)** als nSTV-Monomer, **(b)** als nSTV-Dimer, **(c)** als nSTV-Dimer, das mit Oligonucleotid F9 gekuppelt war, und Bande **(d)** als nSTV-Tetramer, das mit F9 gekuppelt war, identifiziert. Weiterhin lässt sich vermuten, dass der verschmierte Bereich über **(d)** durch verschiedene nSTV-Oligomere (bestehend aus sechs und mehr Monomeren) entstanden ist. Wie bereits bei der

SDS-PAGE Analyse von SM(PEG)₄ verknüpftem F9-mSTV-Monokonjugat in *Abbildung 2.35* beobachtet, lässt sich auch hier annehmen, dass diese nSTV-Oligomere durch intermolekulare Verknüpfung von zwei oder mehr nSTV-Homotetrameren bei der Konjugatsynthese entstehen.

In Spur 6, die mit pAF4 aufgereinigtem **5a** beladen wurde, sind wie in Spur 5 die Banden (**a**) bis (**d**) zu erkennen. Die Zuordnung der Banden in dieser Spur erfolgte daher analog zu Spur 5. Unterschiede ließen sich vor allem in der weniger intensiven Bande (**d**) und dem weniger ausgeprägten verschmierten Bereich über Bande (**d**) erkennen. Diese Befunde lassen vermuten, dass durch die pAF4 Abtrennung der Konjugatdimere in Spur 6 keine nSTV-Oligomere mehr in der Probe enthalten sind.

Die intensiven Banden von nSTV-Dimeren (**b**) und nSTV-Dimeren, die mit Oligonucleotid F9 gekuppelt waren (**c**) (siehe Spuren 5 und 6) zeigen die kovalente Verknüpfung von nSTV-Monomeren bei der Konjugatsynthese. Die thermische Stabilität dieser nSTV-Dimere lässt schließen, dass die nSTV-Monomere in diesen Banden kovalent miteinander verbunden wurden. Die DNA-STV-Konjugatsynthese führt folglich zu intramolekularen, kovalenten Verknüpfungen einzelner Untereinheiten im Konjugat.

In der mit Konjugatdimer beladenen Spur 7 lassen sich die Banden (**a**), (**b**), mit schwächerer Intensität die Bande (**c**) und oberhalb von 45 kDa ein verschmierter Bereich erkennen. Die Bandenzuordnung von (**a**) bis (**c**) dürfte zu der der beiden vorhergehenden Spuren identisch sein. Auffällig ist der im Vergleich zu Spur 6 von **5a** abweichender, verschmierter Bereich in Spur 7. Dieses bestätigt erneut die Annahme, dass sich Konjugatdimere aus kovalent verknüpften nSTV-Monomeren zusammensetzen, die zum Teil aus mehr als vier nSTV-Untereinheiten bestehen. Da nSTV ein Homotetramer ist, müssen sich zur Bildung solcher Dimere zwei nSTV Untereinheiten intermolekular verknüpfen, so dass Konjugatdimere und -oligomere entstehen können.

In Spur 8 ist eine intensive Bande zu erkennen, die nSTV-Monomeren zugeordnet werden kann. Die im Vergleich zu Bande (**a**) etwas höhere elektrophoretische Mobilität lässt sich durch die Abwesenheit des oberflächenmodifizierenden Crosslinkers erklären.

Aus der in *Abbildung 2.37* gezeigten SDS-PAGE Analyse von nicht aufgereinigtes F9-nSTV-Monokonjugat, **5a** und (**5a**)₂ lässt sich somit ableiten, dass bei der Konjugatsynthese nSTV-Untereinheiten kovalent verknüpft werden. Die Ergebnisse lassen dabei vermuten, dass bei Konjugatmonomeren die Untereinheiten intramolekular verknüpft werden. Bei Konjugatdimeren liegen hingegen zusätzlich Verknüpfungen von Untereinheiten aus verschiedenen STV-Molekülen vor, sodass Dimere und vermutlich Oligomere gebildet werden.

Um den Einfluss des Crosslinkers auf die Bildung von Konjugatdimeren weiter zu untersuchen, wurden bei der Konjugatsynthese eines F1-nSTV-Konjugats die Fraktionen des mit Crosslinker-derivatisierten, jedoch nicht mit DNA-konjugiertem nSTV (nSTV-sSMCC) gesammelt, vereint, umgepuffert, aufkonzentriert und quantifiziert und anschließend mittels SDS-PAGE zusammen mit F1-nSTV-Monokonjugat analysiert.

Dabei wurden je 20 pmol nSTV-sSMCC, F1-nSTV-Monokonjugat und nSTV mit 4x SDS-Probenpuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Wie bei den zuvor abgebildeten SDS-Gelen wurden die Proben unmittelbar angesetzt und thermisch denaturiert auf das in *Abbildung 2.38* dargestellt Gel geladen.

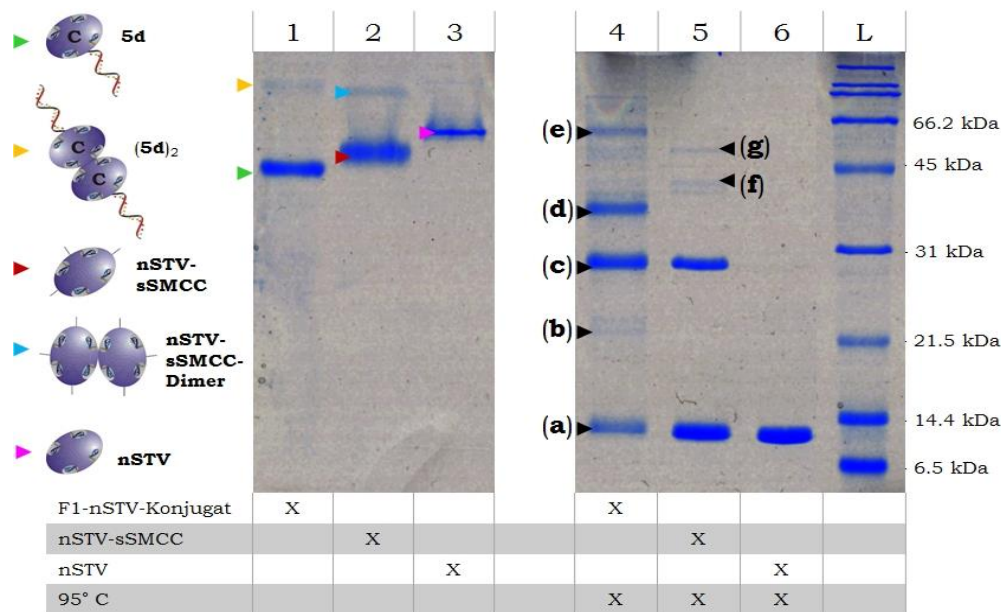


Abbildung 2.38: SDS-PAGE von F1₁-nSTV und nSTV-sSMCC nach Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blau; **Spur 1:** F1₁-nSTV, **Spur 2:** nSTV-sSMCC, **Spur 3:** nSTV, **Spur 4:** F1₁-nSTV @95 °C, **Spur 5:** nSTV-sSMCC @95 °C, **Spur 6:** nSTV @95 °C und **L:** Protein-Größenstandard.

In der mit F1-nSTV-Monokonjugat beladenen Spur 1 sind zwei Banden zu erkennen. Der mobileren Hauptbande (▶) wurde analog zur SDS-PAGE mit F9-nSTV-Konjugat in *Abbildung 2.37 5c* zugeordnet. Die elektrophoretisch weniger mobile Bande (►) wurde dem Konjugatdimer (5c)₂ zugeordnet.

In Spur 2 wurde nSTV-sSMCC aufgetragen. Es sind wie in Spur 1 zwei Banden zu erkennen. Die elektrophoretisch mobileren Bande (►) wurde (nSTV-sSMCC)₁ und der anderen Bande (▶) wurde dimeren nSTV (nSTV-sSMCC)₂ zugeordnet. Hierbei zeigt (nSTV-sSMCC)₁ verglichen mit (nSTV-sSMCC)₂ aufgrund des geringeren hydrodynamischen Volumens bei einem identischen m/z-Verhältnis eine höhere elektrophoretische Mobilität. Das F1-nSTV-Monokonjugat besitzt im Vergleich mit (nSTV-sSMCC)₁ ein kleineres m/z-Verhältnis, so dass es im SDS-Gel schneller wandern kann. Die Bildung von Konjugatdimeren (►) bzw. dimeren nSTV (▶) infolge der Derivatisierung von nSTV mit sSMCC kann in den Spuren 1 und 2 eindeutig erkannt werden.

In Spur 3 ist eine einzelne Bande zu erkennen (▶), die dem als Kontrolle aufgetragenem nSTV zugeordnet wurde. An dieser Spur lässt sich erkennen, dass ohne die Derivatisierung mit sSMCC kein dimeres nSTV gebildet wurde.

Zur Diskussion der denaturierten Proben in den Spuren 4 bis 6 wurden die Banden in Spur 4 mit abfallender elektrophoretischer Mobilität von (a) bis (e) und in Spur 5 zusätzlich mit (f) und (g) gekennzeichnet.

In Spur 4 wurde F1-nSTV-Monokonjugat aufgetragen, welches eine zu F9-nSTV-Monokonjugat (siehe *Abbildung 2.37*) identische Bandentrennung zeigte. Die hier eingesetzte experimentell optimierten Protokolle zur verbesserten Auflösung und Anfärbung (siehe 4.6.1.2 und 4.6.3.3) lassen im Vergleich zur SDS-PAGE von F9-nSTV-Konjugat die zusätzliche Bande (b) erkennen. Anhand des Protein-Größenstandards wurden die Banden (a) dem nSTV-Monomer, (b) dem F1-gekoppelten nSTV-Monomer, (c) dem nSTV-Dimer, (d) dem F1-gekoppelten nSTV-Dimer und Bande (e) dem mit F1-gekoppelten nSTV-Tetramer zugeordnet.

In Spur 5, die mit nSTV-sSMCC beladen wurde, lassen sich zwei intensive Banden (a und c) und zwei schwache Banden (f und g) erkennen. Die Hauptbanden (a) und (c) wurden, wie in Spur 4, dem nSTV-Monomer und -Dimer zugeordnet. Die nur schwach erkennbaren Banden (f) und (g) wurden anhand des Größenstandards nSTV-Trimer und -Tetramer zugeordnet.

In Spur 6 wurde als Kontrolle nSTV aufgetragen, welches als scharfe nSTV-Monomer-Bande im Gel zu erkennen ist.

Die SDS-PAGE Analyse von nSTV-sSMCC zeigt erneut sehr deutlich, dass durch die Behandlung von nSTV mit dem heterobispezifischen Crosslinker kovalente Verknüpfungen zwischen den nSTV-Monomeren entstehen.

Das Phänomen der Bildung von Konjugatdimeren infolge der Derivatisierung von nSTV mit sSMCC konnte auch, wie in *Abbildung 2.39* dargestellt, mittels aAF4 von nSTV und nSTV-sSMCC bestätigt werden.

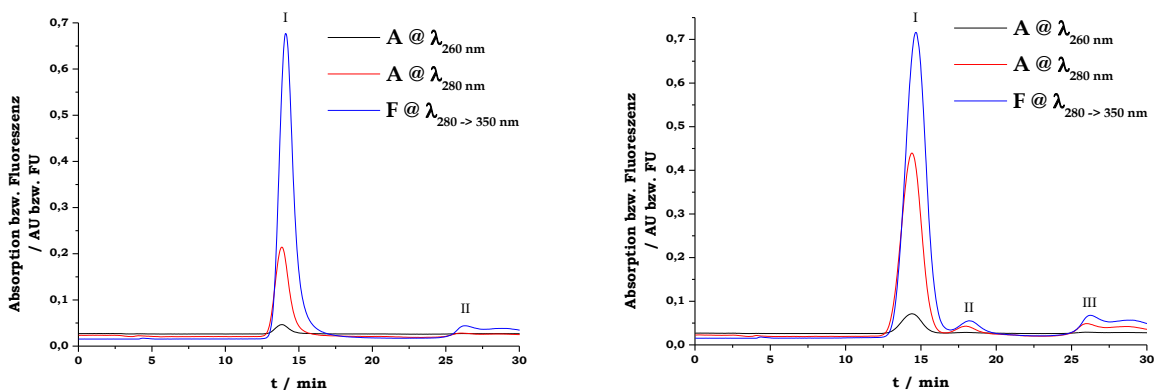


Abbildung 2.39: aAF4-Fraktogramm von nSTV; Peak I: nSTV und Peak II: aggregiertes Protein (links) und aAF4-Fraktogramm von nSTV-sSMCC; Peak I: (nSTV-sSMCC)₁, Peak II: (nSTV-sSMCC)₂ und Peak III: aggregiertes Protein (rechts).

Die AF4-Fraktogramme in *Abbildung 2.39* zeigen die Dimerisierung bei der sSMCC-Behandlung von nSTV. Im linken Fraktogramm wurde 300 pmol nSTV in den Trennkanaal injiziert. Der Hauptpeak (I) im linken Fraktogramm wurde nSTV zugeordnet. Zusätzlich wurde Peak II aggregierten Proteinen zugeordnet.

Im rechten Fraktogramm wurde 300 pmol nSTV-sSMCC in den Trennkanaal injiziert. Wurde das nSTV vor der aAF4 mit sSMCC derivatisiert ist ein dritter Peak zu erkennen. Im Hauptpeak (I) eluiert (nSTV-sSMCC)₁, in Peak II eluiert (nSTV-sSMCC)₂ und in Peak III eluiert aggregiertes Protein.

SDS-PAGE- und aAF4-Analytik zeigten somit übereinstimmend, dass die Bildung von Konjugatdimeren und -oligomeren eine Folge der Reaktion von nSTV mit dem heterobispezifischen Crosslinker sSMCC ist.

Die durchgeführten Konjugatsynthesen zeigten, dass weitere Faktoren den Anteil der Konjugatdimeren und -oligomeren beeinflussten. Diese werden im Folgenden aufgeführt und diskutiert. Ein möglicher Reaktionsmechanismus für die Verbrückung von STV-Monomeren durch sSMCC und die weitere verwendete Crosslinker wird im darauf folgenden Abschnitt dargestellt.

2.1.4.2 Vergleich der Dimerisierung bei den verwendeten STV-Mutanten

In *Abbildung 2.40* wird der Anteil der Konjugatdimere bei DNA-nSTV-Konjugaten, DNA-mSTV-Konjugaten und DNA-STV-TCH-Konjugaten verglichen.

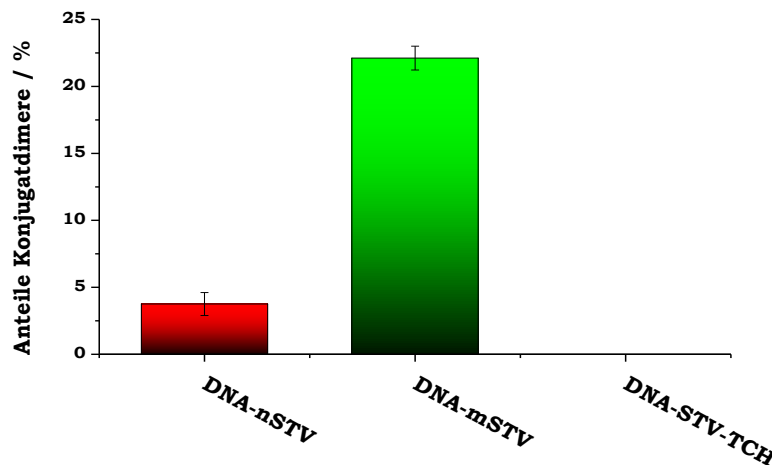


Abbildung 2.40: Säulendiagramm mit Anteilen der Konjugatdimere bei der Konjugatsynthese von **DNA-nSTV**, **DNA-mSTV** und **DNA-STV-TCH**.

Abbildung 2.40 zeigt einen deutlich geringeren Anteil an gebildeten Konjugatdimeren bei der DNA-nSTV- als bei der DNA-mSTV-Konjugatsynthese. In der Aminosäuresequenz unterscheiden sich nSTV und mSTV nur geringfügig. In drei Monomere von mSTV wurde durch die Mutationen von N10A und S14D die Bindungsaffinität zu Biotin drastisch reduziert (dSTV-Monomer). Die vierte Untereinheit von mSTV wurde am C-Terminus um einen His₆-Tag ergänzt (STV-His-

Monomer). Die Konzepte, Expression und Aufreinigung der verwendeten STV-Mutanten sind in Kapitel 1.1.2 beschrieben.

Im Zuge dieser Arbeit wurde bei der Synthese von mSTV-DNA Konjugaten eine reduzierte Stabilität des mSTV gegenüber organischen Lösemitteln beobachtet. Wie in *Abbildung 2.16* zu erkennen ist, wurde die Ausbeute der Konjugatsynthese von DNA-mSTV bei der Verwendung von DMSO oder mehr als 3% DMF drastisch reduziert. Es zeigte sich, dass mSTV in unpolaren Lösemitteln verstärkt denaturiert und ausfällt.

Wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben, lässt sich dieses Phänomen durch die drei dSTV-Untereinheiten in mSTV erklären. Durch die Mutation bildet sich die Proteinkonformation mit geschlossener L3/L4-Schleife über der Biotinbindetasche nicht aus. Da die Proteinkonformation mit geschlossener Schleife einen bedeutenden Beitrag zur Gesamtstabilität der Tertiärstruktur des STV liefert^[127,140], liegt nahe, dass durch die Mutation auch die Stabilität des mSTV gegenüber Denaturierung durch organische Lösungsmittel beeinflusst wird.

Die STV-Derivatisierung mit sSMCC erfolgt in Gegenwart von 3% DMF bei mSTV, bzw. 12% DMSO bei nSTV. Es lässt sich vermuten, dass mSTV bei der Inkubation mit sSMCC partiell denaturiert und dadurch für die Verknüpfung von STV-Monomeren reaktiver ist. Diese Annahme wird im Folgenden bei der Diskussion des Einflusses des verwendeten Crosslinkers wieder aufgenommen.

Bei der DNA-STV-TCH-Konjugatsynthese wurden keine Konjugatdimere beobachtet. Die Ursache hierfür dürfte in der grundsätzlich anderen Vorgehensweise bei der Synthese liegen (siehe *Abbildung 2.11*). Hier wurde zunächst ein Amino-modifiziertes Oligonucleotid mittels sSMCC mit einer Maleinsäureimidgruppe derivatisiert. Das modifizierte Oligonucleotid wurde dann an die freie Thiolgruppe des rekombinant eingefügten Cysteinrestes gekuppelt. Da bei diesem Vorgehen keine direkte Reaktion zwischen STV-TCH und NHS-Reagenzien erfolgt, kommt es nicht zur intramolekularen Quervernetzung von STV-TCH-Untereinheiten, da die Michaeladdition des Thiols gegenüber der Reaktion mit einem Amin um den Faktor 1000 schneller abläuft.^[181] Sollte es dennoch zur Reaktion von Maleinsäureimidgruppen mit Oberflächenaminen am STV-TCH kommen, würde dieses zu höhervalenten Konjugaten, jedoch nicht zur Quervernetzung von STV-TCH-Untereinheiten führen.

Der Befund, dass bei der DNA-STV-TCH-Konjugatsynthese keine höheren Dimere gebildet wurden, verdeutlicht, dass die Konjugatdimere und -oligomere bei der Derivatisierung von STV mit dem heterobispezifischen Crosslinker entstehen. Wird also ein Maleinsäureimid-modifiziertes Oligonucleotid mit STV gekuppelt, entstehen keine Konjugatdimere und -oligomere. Da jedoch ein monovalentes STV mit einer C-terminalen Cys-Mutation nicht zur Verfügung stand und aus Zeitgründen nicht herstellbar war, konnte diese Strategie nicht für die Herstellung von mSTV-DNA-Konjugaten herangezogen werden.

2.1.4.3 Einfluss der Oligonucleotidsequenz auf die Bildung von Konjugatdimeren

In weiteren Versuchen sollte untersucht werden, ob die Basensequenz der gekoppelten Oligonucleotide einen Einfluss auf die Dimerisierung bei der DNA-nSTV-Konjugatsynthese zeigt. Hierzu wurden die DNA-nSTV-Konjugate **5a**, **5b**, **5c**, **5d**, **5e** und **5f** unter Verwendung von sSMCC nach dem Standardprotokoll (4.8.1) hergestellt und die gebildeten Anteile an Konjugatmonomeren und -dimeren wurden mittels aAF4-Analytik quantifiziert. Die Ergebnisse sind im Diagramm in *Abbildung 2.41* dargestellt.

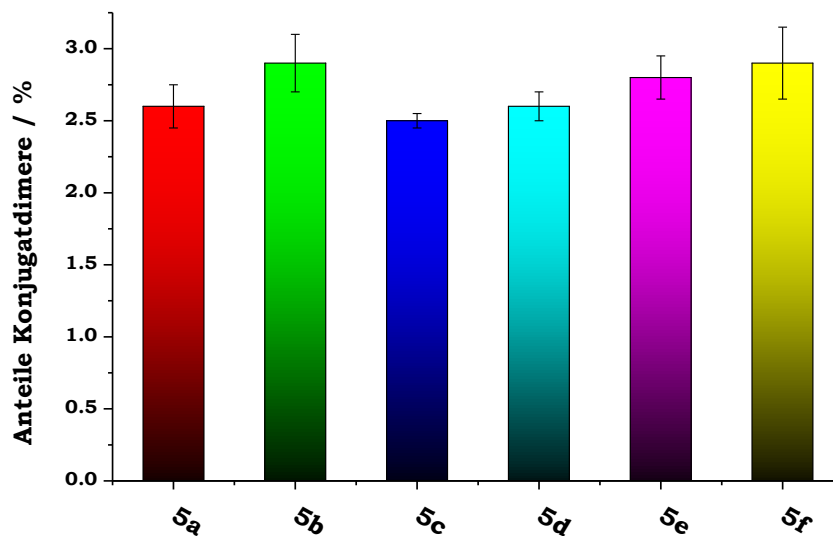


Abbildung 2.41: Säulendiagramm mit Anteilen von Konjugatdimeren bei der DNA-nSTV-Konjugatsynthese von **5a**, **5b**, **5c**, **5d**, **5e** und **5f**.

Abbildung 2.41 zeigt deutlich, dass bei sämtlichen DNA-nSTV-Konjugatsynthesen ein vergleichbar Anteil von 2.5 - 3% an Konjugatdimeren gebildet wurden. Es konnte kein signifikanter Einfluss der Oligonucleotidsequenz auf die Bildung von Konjugatdimeren und -oligomere bei der DNA-nSTV-Konjugatsynthese nachgewiesen werden. Dieses ist im Einklang mit den Erwartungen, da nach der in 2.1.4.1 beschriebenen Hypothese, die kovalente Quervernetzung der STV-Untereinheiten auf die Wirkung des Maleinsäureimidhaltigen Crosslinkers zurückzuführen ist. Die Quervernetzung erfolgt bereits vor der Kupplung des Oligonucleotids.

2.1.4.4 Einfluss der DNA-STV-Konjugat Lagerung auf die Bildung von Konjugatdimeren

Zur weiteren Untersuchung der unerwünschten, kovalenten Quervernetzung wurde überprüft, ob längere Lagerungszeiten zur Erhöhung der Anteile von Konjugatdimeren führen. Um einen möglichen Anstieg der Konjugatdimere bei der Konjugatlagerung systematisch zu untersuchen, wurde frisch konjugiertes cF9-

nSTV-Monokonjugat und F9-nSTV-Monokonjugat über vier Wochen bei 4 °C gelagert. Dabei wurden die Anteile der Konjugatdimere (**5a**)₂ und (**5b**)₂ in regelmäßigen Zeitabständen mittels aAF4-Analytik bestimmt.

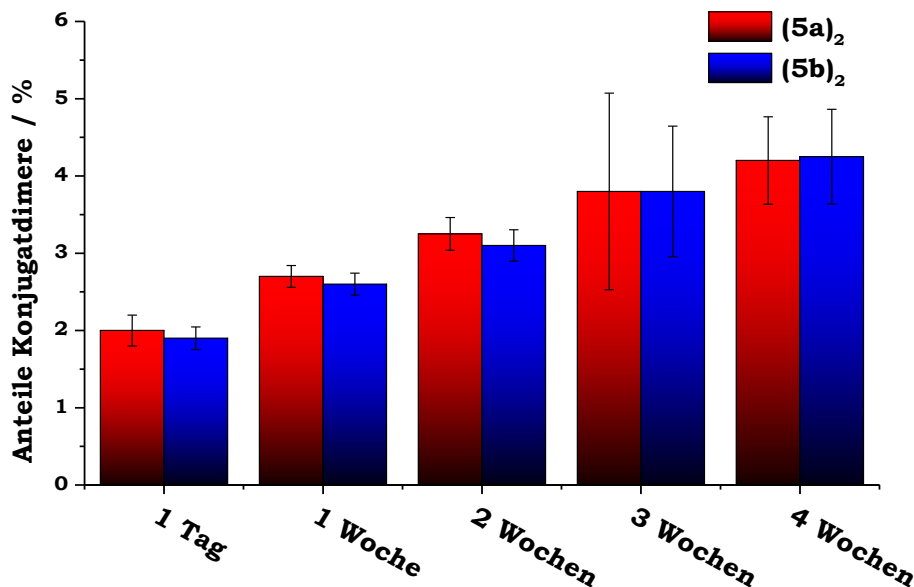


Abbildung 2.42: Säulendiagramm mit Anteilen von Konjugatdimeren bei **F9-nSTV-Monokonjugat** und **cF9-nSTV-Monokonjugat** während der Lagerung bei 4 °C.

Das Diagramm in *Abbildung 2.42* zeigt, dass der Anteil der Konjugatdimere im Laufe der Lagerung von ca. 2% auf 4% anstieg. Dabei lässt sich ein annähernd konstanter Anstieg der Konjugatdimere (**5a**)₂ und (**5b**)₂ über den Zeitraum der Lagerung beobachten. Diese bestätigt frühere, sporadisch gemachte Beobachtungen, dass bei älteren Chargen der DNA-STV-Konjugate ein erhöhter Anteil von Konjugatdimeren vorliegt.

Weitere, hier nicht abgebildete Experimente ergaben, dass bei einer Lagerung in PBS, der 20 Vol% Glycerol enthielt, bei einer Temperatur von -80 °C die Bildung weiterer Konjugatdimere vermieden werden kann.

Eine mögliche Erklärung für die Bildung von Konjugatdimeren während der Lagerung besteht darin, dass auch trotz des Ablöschens der Maleinsäureimidgruppen mit Mercaptoethanol, noch intakte und damit reaktive Maleinsäureimide vorhanden sind. Möglicherweise befinden sich diese in weniger zugänglichen Bereichen des Proteins und reagieren erst über längere Zeiträume ab. Um diesen Punkt zu untersuchen, wurden weitere Experimente zum Quenchen der Maleinsäureimidgruppe mit Mercaptoethanol unter 2.1.4.5 durchgeführt.

Zudem ist ein Austausch von quervernetzten nSTV-Untereinheiten zwischen nSTV-Homotetrameren denkbar, jedoch aufgrund der hohen Stabilität des nSTV unwahrscheinlich.

2.1.4.5 Einfluss freier Maleinsäureimide auf die Bildung von Konjugatdimeren

Bei der Modifikation mit sSMCC können bis zu sechszehn Oberflächenamine am nSTV modifiziert werden. Von diesen wird ein Maleinsäureimid für die Konjugation mit thiolierten Oligonucleotid bei DNA-nSTV-Konjugate benötigt. Die verbliebenen Maleinsäureimide stehen damit für weitere Reaktionen zur Verfügung. Um diese reaktiven Zentren auf der Proteinoberfläche zu blocken, wird nach dem etablierten Standardprotokoll^[163] im Anschluss an die Umsetzung mit dem Crosslinker Mercaptoethanol zur Reaktionslösung gegeben. Im Folgenden wurde der Einfluss des Blockierens der Maleinsäureimide auf die Bildung von Konjugatdimeren untersucht. Dafür wurde die Reaktionslösung von F1-nSTV-Konjugaten nach der Inkubation von sSMCC-derivatisierten nSTV mit DTT-aktivierten tF1 in zwei Teile getrennt. Ein Teil wurde nach der üblichen Versuchsvorschrift mit Mercaptoethanol versetzt, während der zweite Teil nicht weiter behandelt wurde. Beide Chargen der F1-nSTV-Konjugaten wurden mittels Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt und die Anteile an Konjugatdimeren in den F1-nSTV-Monokonjugaten wurden unmittelbar nach der Konjugatsynthese sowie nach einer zweiwöchigen Lagerung bei 4 °C mittels aAF4 quantifiziert.

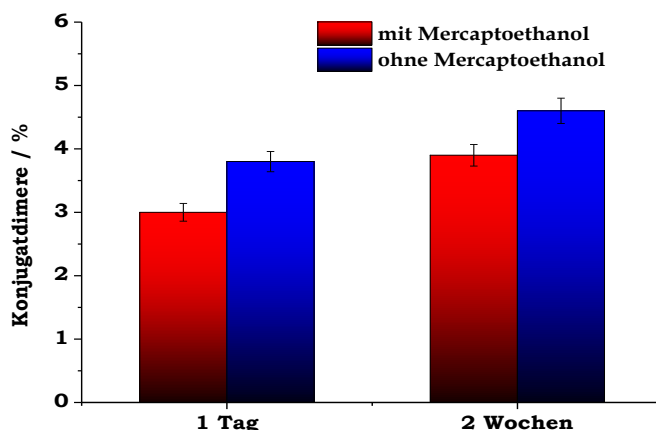


Abbildung 2.43: Säulendiagramm mit Anteilen von Konjugatdimeren in F1-nSTV-Monokonjugaten nach Abblocken der freien Maleinsäureimide mit Mercaptoethanol (rot) und ohne Blocken der freien Maleinsäureimide (blau).

Abbildung 2.43 zeigt, dass beide Chargen der F1-nSTV-Konjugate ähnliche Anteile von Konjugatdimeren (**5c**)₂ enthielten, wobei durch Quenchen der freien Maleinsäureimidgruppe mit Mercaptoethanol der Anteil von (**5c**)₂ um ca. 1% gesenkt wurde. Dieses entspricht einer Reduktion der Konjugatdimer-Anteile um ca. 25% unmittelbar nach der Konjugatsynthese. Jedoch stieg der Anteil von (**5c**)₂ unabhängig von der Zugabe von Mercaptoethanol um ca. 1% während der einwöchigen Konjugatlagerung.

Diese Befunde legen nahe, dass noch freie Maleinsäureimide keinen signifikanten Einfluss auf den Anstieg der Anteile von Konjugatdimeren bei der Konjugatlagerung haben. Daher kann auch der Anstieg der Konjugatdimere und -oligomere im Laufe der Konjugatlagerung nicht primär auf freie Maleinsäureimidgruppen zurückgeführt werden.

2.1.4.6 Einfluss des heterobispezifischen Crosslinkers auf die Bildung von Konjugatdimeren

Die Ergebnisse in Kapitel 2.1.4.1 haben gezeigt, dass bei der DNA-STV-Konjugatsynthese Konjugatdimere und -oligomere bei der Derivatisierung von STV mit dem Crosslinker sSMCC entstehen. Einen signifikanten Einfluss auf die Dimerisierung ließ sich bei der Verwendung von nSTV im Gegensatz zu mSTV erkennen. Es ließ sich vermuten, dass die unterschiedliche Zugänglichkeit der an der Reaktion beteiligten Aminosäuren infolge der primär auftretenden STV-Konformationen (siehe 1.1.2) der beiden STV-Mutante zu den unterschiedlichen Anteilen an Konjugatdimeren und -oligomeren führte.

Wie in Kapitel 2.1.2 diskutiert und im Diagramm in *Abbildung 2.28* dargestellt, hat die Wahl des heterobispezifischen Crosslinkers einen erheblichen Einfluss auf die Dimerisierung von DNA-STV-Konjugaten. Im Folgenden soll die Ursache für die Verknüpfung von STV-Monomeren mit den verwendeten Crosslinkern erläutert werden. Dabei soll für alle gewählten Linkersysteme ein Reaktionsmechanismus für die Verknüpfung der STV-Untereinheiten diskutiert werden.

2.1.4.6.a sSMCC

Eine schematische Darstellung für die DNA-STV-Konjugatsynthese mit sSMCC ist in *Abbildung 2.44* dargestellt. Jeder am Protein derivatisierte Crosslinker steigert die molare Masse um 219.09 g/mol. Die Länge des Spacers von sSMCC beträgt dabei 8.3 Å.^[182]

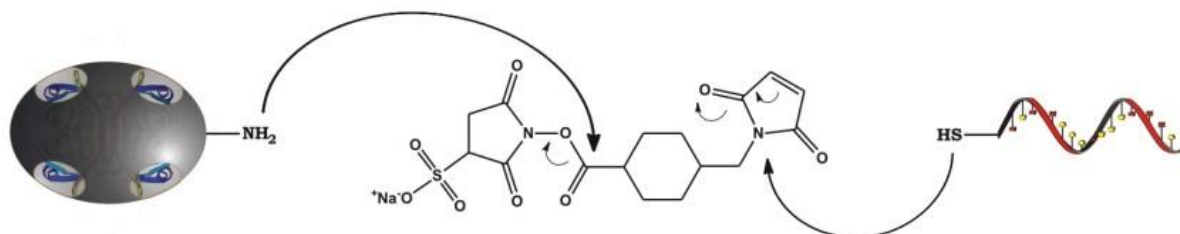


Abbildung 2.44: Schematische Darstellung der DNA-Protein-Konjugatsynthese mit sSMCC.

Die Derivatisierung von STV erfolgte mittels der NHS-Funktionalität von sSMCC, die an primäre Amino-Gruppen von Lysin-Seitenketten und an die α -Aminosäure des N-Terminus auf der Oberfläche des Proteins angreift.^[183] Eine mögliche Ursache für die kovalente Verknüpfung der STV-Untereinheiten ist die Addition von, auf der Proteinoberfläche eingeführten, Maleinsäureimidgruppe von sSMCC mit geeigneten, funktionellen Gruppen einer benachbarten STV-Untereinheit. In der Literatur ist die Reaktion von Maleinsäureimiden mit freien Aminogruppen von Lysin und Histidin beschrieben.^[184-185] Der dabei postulierte Reaktionsmechanismus ist in *Abbildung 2.45* dargestellt. Dabei reagiert die Maleinsäureimidgruppe (in blau abgebildet) von sSMCC mit der Amino-Gruppen von einer Lysin-Seitenketten oder dem Imidazolring von Histidin.

Die Reaktivität einer Maleinsäureimidgruppe ist beim gewählten pH-Wert gegenüber Thiolgruppen um den Faktor 1000 höher als zu Aminogruppen.^[181] Damit wird die Konjugation mit thiolmodifizierten Oligonucleotiden zwar favorisiert, da die Oligonucleotide jedoch erst nach einer 1.5 h Inkubation mit dem Crosslinker zum sSMCC-modifizierten STV gegeben werden, kann es zuvor zur Verknüpfung von STV-Monomeren über Maleinsäureimide und Aminen kommen. Am wahrscheinlichsten ist die kovalente Verknüpfung von auf der STV-Oberfläche gebundenen Maleinsäureimidgruppe mit einem der zwei Histidine eines nSTV-Monomeres, da die freien, primäre Amino-Gruppen von Lysin-Seitenketten und die α -Aminosäure des N-Terminus die Reaktion mit der NHS-Funktionalität von sSMCC favorisieren.^[93]

Es lässt sich zudem vermuten, dass diese Reaktion bei der DNA-STV-Konjugatsynthese begünstigt wird, weil die Maleinsäureimide bei der Derivatisierung von STV mit sSMCC in räumliche Nähe mit freien Aminogruppen von Lysin oder Histidin gebracht werden.

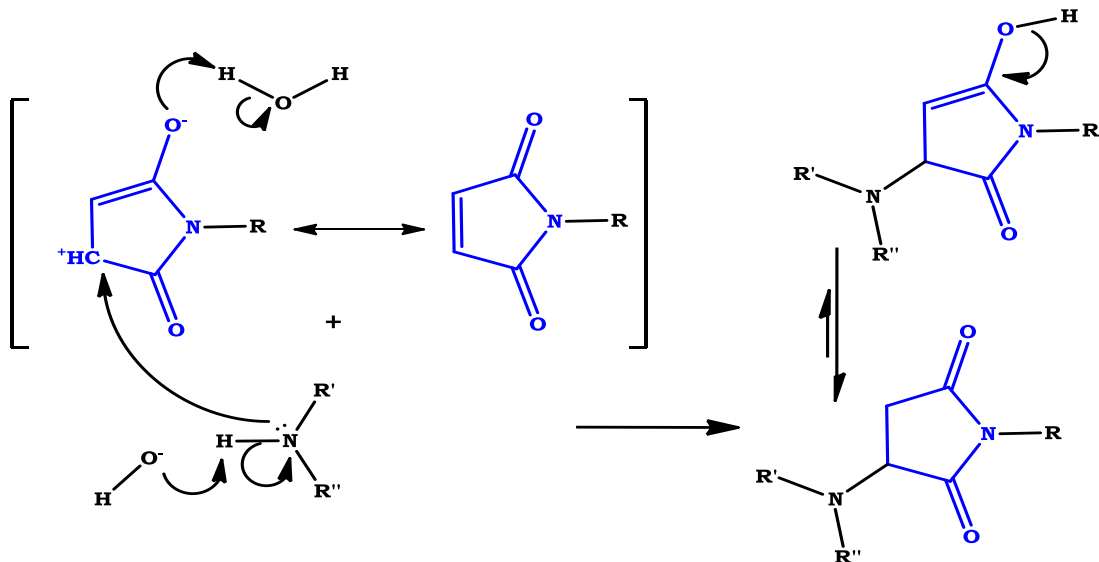


Abbildung 2.45: Postulierter Reaktionsmechanismus für die Maleinsäureimidbindung an eine Aminogruppe. R' und R'' repräsentieren entweder die Lys-Seitenkette und ein Proton oder den Imidazolring von His.^[185]

Abbildung 2.45 zeigt den möglichen Reaktionsmechanismus für eine intra- und intermolekulare Verknüpfung von STV-Monomeren. Wie die SDS-PAGE von nSTV-sSMCC in Abbildung 2.38 zeige, werden dabei zu großen Anteilen nSTV-Untereinheiten innerhalb eines STV-Homotetramers und zu kleineren Anteilen nSTV-Untereinheiten zwischen zwei STV-Molekülen verknüpft.

Alternativ könnten die installierten Maleinsäureimid-Gruppen unter Ringöffnung mit Carboxylgruppen reagieren, was wegen der hohen Stabilität des Maleinsäureimids beim gewählten pH-Wert jedoch vernachlässigt werden kann.^[186] So wurde das Maleimid in sSMCC von Ishikawa *et al.*^[187] bis pH 7.5 durch das Fehlen eines aromatischen Rings im Spacer des Crosslinkers als sehr stabil beschrieben.

2.1.4.6.b sSMPB

Der Unterschied von sSMPB gegenüber sSMCC besteht in einem längeren Spacer mit einer Phenylengruppe, wohingegen die reaktiven Gruppen identisch sind (siehe Reaktionsschemata von sSMPB unter *Abbildung 2.20*). Die Konjugatsynthese mittels sSMPB folgt einem zu sSMCC identischen Reaktionsmechanismus. Wie in *Abbildung 2.45* gezeigt, erfolgt die Verknüpfung von STV-Monomeren bei der Konjugatsynthese analog zu sSMCC über die Reaktion eines an der Proteinoberfläche gebundenen Maleinsäureimids mit einer freien Aminogruppe von Lysin oder Histidin in einer benachbarten STV-Untereinheit. Im Unterschied zu sSMCC wurden bei der DNA-mSTV-Konjugatsynthese mit sSMPB die Bildung von 5% weniger Konjugatdimeren beobachtet. Eine mögliche Ursache für die niedrige Bildung von Konjugatdimeren ist der ca. 3 Å längere Spacer von sSMPB in Vergleich zu sSMCC. Dadurch könnten den freien Amino-Gruppen von Lysin oder Histidin eine niedrigere lokale Konzentration an Maleinsäureimide für die intra- und intermolekulare Verknüpfung von STV-Untereinheiten zur Verfügung stehen.

2.1.4.6.c sSIAB

Im Unterschied zu sSMCC und sSMPB verfügt sSIAB, wie in *Abbildung 2.21* dargestellt, über eine Iodoacetyl-Gruppe für die Konjugation mit einem thiolmodifizierten Oligonucleotid. Der Spacer enthält wie sSMPB eine Phenylgruppe, ist jedoch drei aliphatische Kohlenwasserstoffe kürzer, wodurch sSIAB in der Bindung nur eine Länge von 8 Å aufweist. Die Amin-reaktive funktionelle Gruppe von sSIAB ist sulfo-NHS.

Im leicht alkalischen pH-Bereich reagiert die Iodoacetyl-Gruppe hoch spezifisch mit Thiol-modifizierten Molekülen, sofern die Iodoacetyl-Gruppen nicht im deutlichen Überschuss vorliegen.^[188] Stehen den Iodoacetyl-Gruppen keine stöchiometrische Menge von Thiol-modifizierten Molekülen zur Verfügung, sind Reaktionen mit beiden Stickstoffatomen des Imidazolrings von Histidin, dem Thioether von Methionin, dem ϵ -Amin von Lysin und der α -Amino-Gruppe des N-Terminus möglich.^[188-189]

Wie schon bei sSMCC und sSMPB ist auch bei sSIAB eine Reaktion der Iodoacetyl-Gruppe mit einem Histidin einer nSTV-Untereinheit am wahrscheinlichsten. Die von Cresterfield *et al.*^[190] postulierten Reaktionsmechanismen für die S_N1 - und S_N2 -Reaktionen der Iodoacetyl-Gruppe von sSIAB mit den Stickstoffatomen des Imidazolrings von Histidin sind in *Abbildung 2.46* dargestellt.

Die Reaktion des Thioethers von Methionin mit einer Iodoacetyl-Gruppe wurde unter nahezu allen Reaktionsbedingungen mit einem pH-Wert > 1.7 beobachtet.^[191] Jedoch sind die Reaktionsprodukte von Methioninthioether mit Iodoacetylen hoch komplex, da sie teilweise unvorhersehbar umlagern oder zerfallen.^[93,191]

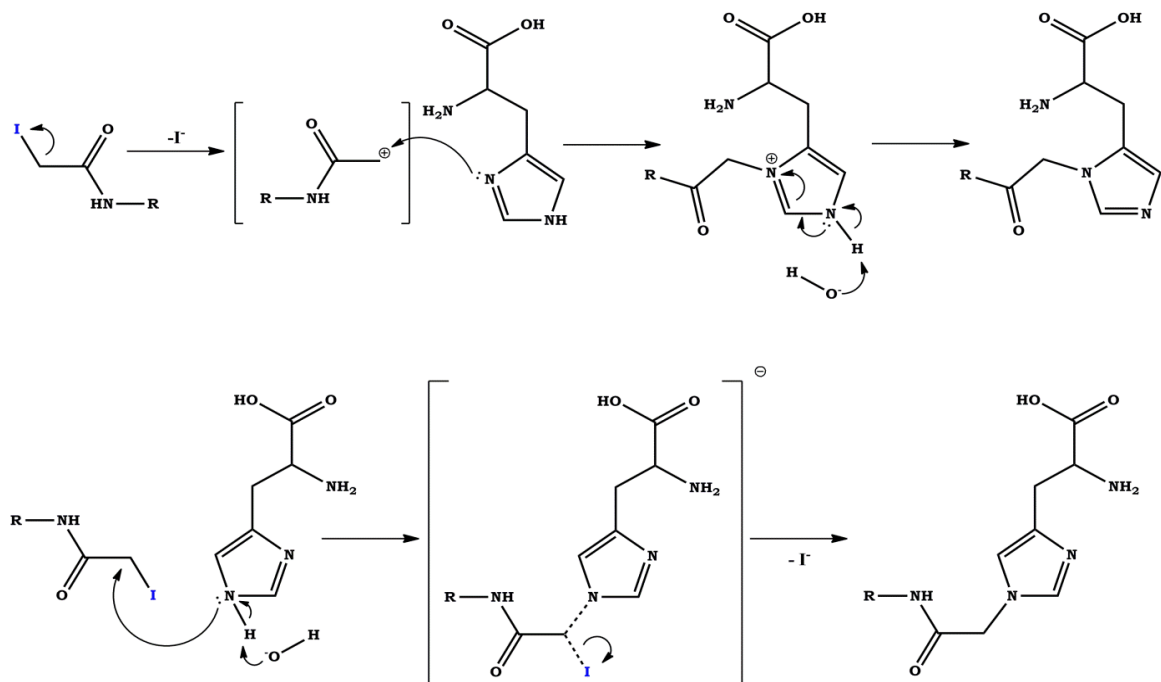


Abbildung 2.46: Postulierter Reaktionsmechanismus für die Reaktion der Iodoacetyl-Gruppen mit den Stickstoffatomen des Imidazolrings von His nach einem S_N1 - (oben) und S_N2 - (unten) Reaktionsmechanismus. [190]

Bei der Konjugatsynthese von DNA-mSTV-Konjugaten wurden die Thiol-modifizierten Oligonucleotide erst nach einer 1.5 h Inkubation mit dem Crosslinker zum sSIAB-modifizierten mSTV gegeben. Während der Derivatisierung mit sSIAB konnte es zur Verknüpfung von STV-Monomeren über die Iodoacetyl-Gruppe und dem Imidazolring von Histidin (zwei pro Monomer), dem Thioether von Methionin (einmal pro Monomer) oder die freien Amino-Gruppen von Lysin-Seitenketten (vier pro Monomer) und der α -Aminosäure des N-Terminus (einmal pro Monomer) kommen, wodurch eine Vielzahl von Reaktionspartnern für eine Quervernetzung zur Verfügung standen. Auf Basis der Vielzahl möglicher Nebenreaktionen von sSIAB mit den an der mSTV-Oberfläche zugänglichen Aminosäuren und dem kürzesten Spacer aller verwendeten Crosslinker, ließ die DNA-mSTV-Konjugatsynthese mit sSIAB die Bildung von mehr Konjugatdimeren als bei sSMCC und sSMPB erwarten. Wie in *Abbildung 2.28* gezeigt, sank der Anteil der Konjugatdimere bei der Verwendung von sSIAB gegenüber sSMCC und sSMPB um ca. 12% bzw. 7%. Diese Befunde legen nahe, dass die freie Maleinsäureimide von sSMCC und sSMPB die Verknüpfung von STV-Untereinheiten mehr favorisieren als die Iodoacetyl-Gruppe von sSIAB.

2.1.4.6.d SM(PEG)₄

Der in *Abbildung 2.23* dargestellte heterobispezifische Crosslinker SM(PEG)₄ weist zu sSMCC und sSMPB identische funktionelle Gruppen auf. Der Unterschied zu den zuvor verwendeten Linkern besteht in dem, aus vier Ethylenglycol-Einheiten aufgebauten, Spacer. Durch den PEG-Spacer ist SM(PEG)₄ hydrophiler, was sich auch an der deutlich besseren Wasserlöslichkeit verglichen mit sSMCC, sSMPB und sSIAB erkennen ließ. Ergänzend führt der PEG-Spacer zu einem mehr als doppelt so großen Abstand zwischen der STV-Oberfläche und den konjugierten Oligonucleotiden.

Bei der in *Abbildung 2.28* gezeigten DNA-mSTV-Konjugatsynthese mit SM(PEG)₄ wurden ca. 4% Konjugatdimere gebildet. Die Ursache für die Entstehung dieser Konjugatdimere war analog zu sSMCC und sSMPB die in *Abbildung 2.45* gezeigte intra- und intermolekulare Verknüpfung von STV-Untereinheiten über STV-gebundene Maleinsäureimide mit freien Aminogruppen von Lysin und Histidin.

Trotz identischer reaktiver Gruppen bei SM(PEG)₄, sSMCC und sSMPB wurden bei der DNA-mSTV-Konjugatsynthese mit SM(PEG)₄ 17% bzw. 13% weniger Konjugatdimere gebildet als bei sSMCC bzw. sSMPB. Diese Befunde legen nahe, dass die deutlich niedrigere Bildungsrate an Konjugatdimeren bei der DNA-mSTV-Konjugatsynthese mit SM(PEG)₄ eine Folge der schlechteren Zugänglichkeit der freien Aminogruppen am mSTV für den hydrophileren Crosslinker ist. Ergänzend könnte der PEG-Spacer von SM(PEG)₄ durch einen größeren Abstand zwischen der STV-Oberfläche und dem Maleinsäureimid zu einer niedrigeren lokalen Konzentration dieser funktionellen Gruppen in der Nähe von freien Aminogruppen von mSTV führen. Dieses ist eine weitere mögliche Ursache für die niedrigere Anzahl von intra- und intermolekulare Verknüpfung von STV-Untereinheiten bei der Verwendung von SM(PEG)₄.

2.1.4.6.e PEG₄-SPDP

Der in *Abbildung 2.22* gezeigte heterobispezifische Crosslinker PEG₄-SPDP ist bis auf die 2-Pyridyldithio-Gruppe für eine Reaktion mit einem freien Thiol identisch zu SM(PEG)₄. Durch den aus vier Ethylenglycol-Einheiten aufgebauten Spacer ist PEG₄-SPDP hydrophiler als sSMCC, sSMPB und sSIAB, jedoch wegen der 2-Pyridyldithio-Gruppe hydrophober als SM(PEG)₄.^[192] Der Austausch von 2-Mercaptopyridinen mit einer freien Thiolgruppe ist laut Literatur hoch spezifisch.^[173,193] Die DNA-mSTV-Konjugatsynthese mit PEG₄-SPDP führte zu einem Konjugatdimeranteil von ca. 6%. Daraus lässt sich erkennen, dass trotz der spezifischeren Reaktivität der 2-Pyridyldithio-Gruppe die Konjugatsynthese zu einem größeren Anteil an Konjugatdimeren führte als die Konjugatsynthese mit SM(PEG)₄.

Eine mögliche Ursache für die Bildung von Konjugatdimeren bei der DNA-mSTV Konjugatsynthese mit PEG₄-SPDP könnte die Verknüpfung von PEG₄-SPDP-derivatisierten mSTV über eine 2-Pyridyldithio-Gruppe und eine zu einer Thiol-Gruppe reduzierten 2-Pyridyldithio-Gruppe sein. Da das 2-Mercaptopyridin als mesomeriestabilisierte Abgangsgruppe vom PEG₄-SPDP leicht abgespalten werden kann,^[171] sollten in kleinen Anteilen des PEG₄-SPDP-derivatisierten mSTV freie Thiol-Gruppen entstehen. Diese konnten dann nach dem in *Abbildung 2.47* schematisch dargestellten Reaktionsmechanismus mit einer 2-Pyridyldithio-Gruppe zwei STV-Untereinheiten intra- oder intermolekular verknüpfen und führten dadurch zu Bildung von Konjugatdimeren bei der DNA-mSTV-Konjugatsynthese mit PEG₄-SPDP.

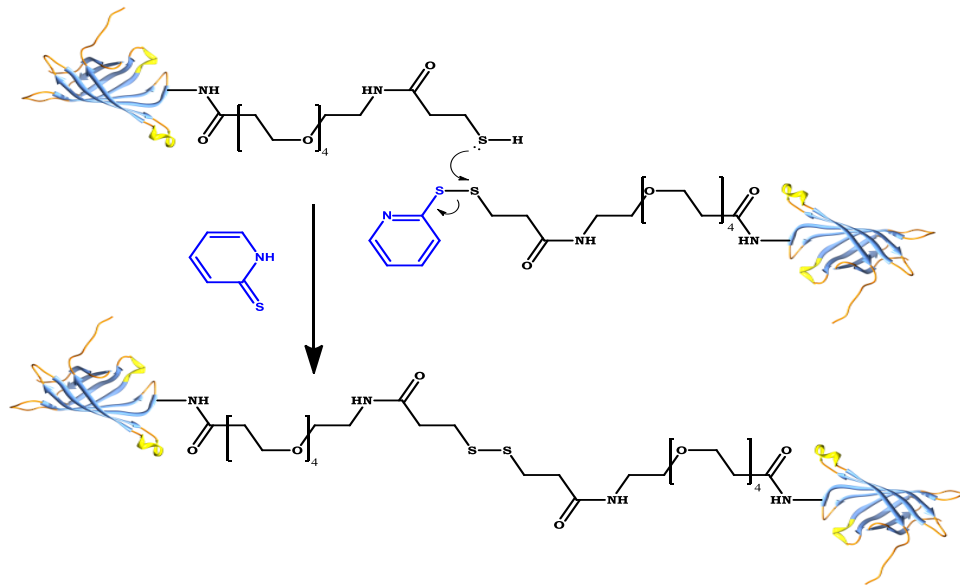


Abbildung 2.47: Reaktionsmechanismus für die Reaktion einer zur Thiolgruppe reduzierten PEG₄-SPDP-Crosslinker, gebunden an einem STV-Monomer mit der 2-Pyridyldithio-Gruppe eines zweiten an einem STV-Monomer gebundenem PEG₄-SPDP-Crosslinker.

2.1.4.7 Fazit zur Bildung von Konjugatdimeren und -oligomeren bei der DNA-STV-Konjugatsynthese

SDS-PAGE und aAF4 von DNA-nSTV-Monokonjugat, sSMCC bzw. SM(PEG)₄ verknüpftem DNA-mSTV-Monokonjugat und nSTV-sSMCC zeigen deutlich die kovalente Verknüpfung von STV-Untereinheiten bei der Derivatisierung von STV mit den eingesetzten heterobispezifischen Crosslinkern. In den Konjugatmonomeren ließen sich Dimere und Tetramere von STV-Untereinheiten nachweisen, die durch eine intramolekulare Verknüpfung im STV-Molekül entstanden waren. In den Konjugatdimeren hingegen ließen sich zusätzlich zu kovalent verknüpften Dimere und Tetramere aus STV-Untereinheiten, Oligomere mit sechs, acht oder eine noch größeren Anzahl von kovalent verbundenen STV-Untereinheiten nachweisen. Als Ursache für die Bildung von Konjugatdimeren und -oligomeren wurde damit die kovalente Verknüpfung von STV-Molekülen über die verwendeten, heterobispezifischen Crosslinker identifiziert.

Die Variation der heterobispezifischen Crosslinker zeigte, dass bei der Konjugatsynthese mit allen gewählten Crosslinkern Konjugatdimere als Nebenprodukte entstanden. Dabei war die Bildung von Konjugatdimeren bei der Verwendung von hydrophoben Linkern höher als bei hydrophilen, längeren Crosslinkern (mit einem PEG-Spacer). Eine mögliche Ursache für die niedrigere Bildung von Konjugatdimeren bei der Verwendung hydrophiler Crosslinker war eine schlechtere Zugänglichkeit der für die Verknüpfung von zwei STV-Untereinheiten verantwortlichen reaktiven Gruppen mit einem PEG-Spacer-haltigen Crosslinker. Zusätzlich könnte der längere PEG-Spacer zu einer niedrigeren lokalen Konzentration der funktionellen Gruppen des Crosslinkers bei der Verknüpfung von STV-Untereinheiten führen.

Im Rahmen der durchgeführten Konjugatsynthesen zeigte sich, dass bei der Verwendung von nSTV ein deutlich geringerer Anteil Konjugatdimere gebildet wurde, als bei der Verwendung von mSTV. mSTV ist weniger stabil als nSTV,^[140] da die dSTV-Monomere nicht in die stabilste Proteinkonformation von STV umlagern können. Dieses bestätigte die Annahme, dass die STV-gebundenen heterobispezifischen Crosslinker sich an hydrophobere Proteinstrukturen annähern müssen, um die STV-Untereinheiten zu verknüpfen. Dabei waren die hydrophoben Proteinstrukturen für die Crosslinker bei partieller Entfaltung des Proteins besser zugänglich. Partiiell denaturierte Proteinstrukturen sind bei dSTV-Monomeren häufiger zu erwarten als bei nSTV-Monomeren. Darum führt die DNA-mSTV-Konjugatsynthese zur Bildung größerer Anteile von Konjugatdimeren als die DNA-nSTV-Konjugatsynthese.

2.2 Assemblierung von supramolekularen DNA-STV-Nanostrukturen

Die im Kapitel 2.1 beschriebenen Konjugatsynthesen stellen die Bausteine für die Assemblierung von supramolekularen DNA-STV-Nanostrukturen (siehe schematische Darstellungen in der Zielsetzung unter *Abbildung 1.14*) dar. Zur Assemblierung der Bausteine sollten diese miteinander hybridisiert und/oder über die hohe Bindeaffinität von D-Biotin zu Streptavidin miteinander verbunden werden.

Die anfängliche Motivation zur Assemblierung von definierten supramolekularen DNA-STV Nanostrukturen war das Design eines polykatalytische Konstrukts mit der Bezeichnung: „Nano-Spinne“,^[138] wie sie in *Abbildung 2.48* dargestellt ist. Eine ausführliche Beschreibung der verwendeten Nomenklatur ist in der Tabelle in Kapitel 8 abgebildet.

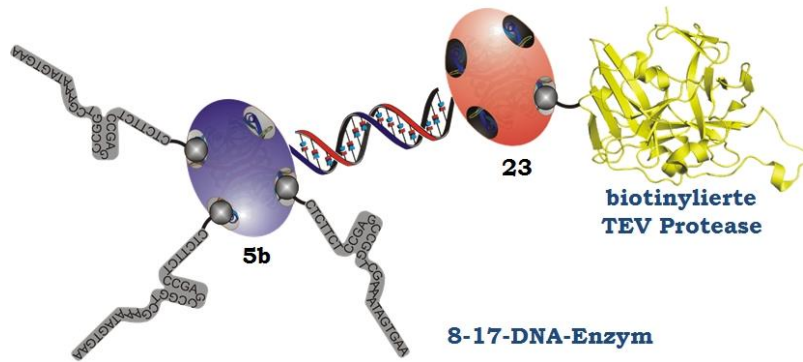


Abbildung 2.48: Schematische Darstellung des „Nano-Spinne“ mit 8-17-DNA-Enzym (grau), TEV-Protease (gelb), nSTV-DNA-Konjugat **5b** (blau) und mSTV-DNA-Konjugat **23** (rot); (Kristallstruktur der TEV-Protease aus PDB-Eintrag 1LVM^[194]).

Die „Nano-Spinne“ war als ein polykatalytisches Konstrukt konzipiert, das auf einer DNA-modifizierten Oberfläche mit den 8-17-DNA-Enzym-Beinen hybridisieren und sich auf dieser fortbewegen können sollte. Dafür sollte das 8-17-DNA-Enzym, die an diesem hybridisierte Ankeroligonucleotidsequenz abspalten und anschließend an einem weiteren Ankeroligonucleotid hybridisieren. Die Fortbewegung auf der DNA-modifizierten Oberfläche sollte durch Abspalten von fluoreszenten Markierungen mit einer TEV-Proteaseschnittstelle detektiert werden.

Wie in *Abbildung 2.48* gezeigt, sollte als Rückgrat der „Nano-Spinne“ die DNA-STV-Hantel **39** verwendet werden, welche aus dem DNA-mSTV-Monokonjugat **23** und dem komplementären DNA-nSTV-Monokonjugat **5b** assembliert ist (siehe *Abbildung 2.49*, links). Die DNA-STV-Hantel **39** sollte bis zu drei biotinylierte 8-17-DNA Enzyme und eine biotinylierte TEV-Protease binden. Danach war als nächster Schritt, ein komplexeres Strukturdesign vorgesehen. Wie in *Abbildung 2.49* (rechts) dargestellt, sollte die DNA-STV-Doppelhantel **40** aus dem DNA-mSTV-Bikonjugat **24** mit zwei daran hybridisierten **5b** aufgebaut werden, an dieses polykatalytisches Konstrukt sollten dann bis zu sechs biotinylierte 8-17-DNA-Enzyme gebunden werden.

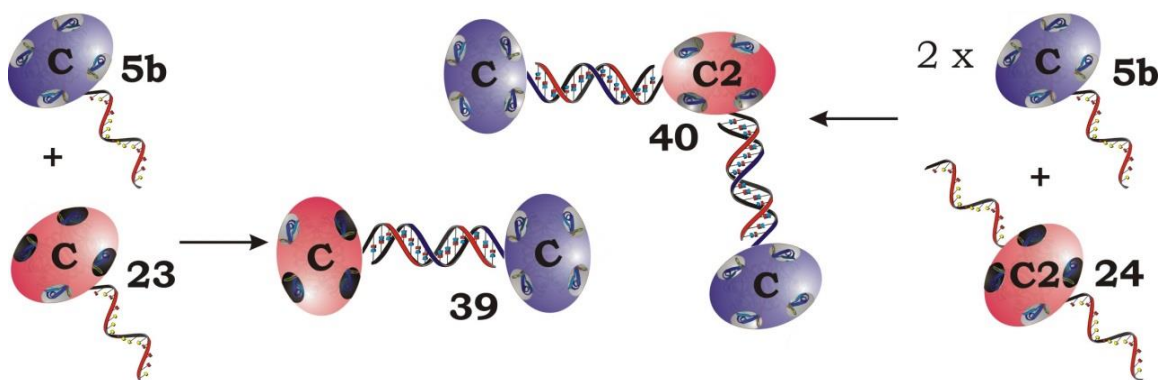


Abbildung 2.49: Schematische Darstellung der DNA-STV-Hanteln **39** (links) aus den DNA-STV-Monokonjugaten **5b** und **23** und der DNA-STV-Doppelhantel **40** (rechts) aus zwei DNA-nSTV-Monokonjugaten **5b** und einem DNA-mSTV-Bikonjugat **24**.

2.2.1 Assemblierung der DNA- STV-Hantel **39** und -Doppelhantel **40**

Die DNA-STV-Nanostrukturen **39** und **40** sollten aus F9-mSTV-Monokonjugat und cF9-nSTV-Monokonjugat bzw. F9-mSTV-Bikonjugat und zwei cF9-nSTV-Monokonjugaten aufgebaut werden. Nach Konjugation, Anionenaustauschchromatographie, Umpuffern, Aufkonzentrieren, Quantifizieren und Charakterisieren der Konjugate erfolgte die Assemblierung der supramolekularen Nanostrukturen in PBS bei RT für 30 min. Für die ersten Versuche zur Assemblierung von **39** und **40** wurden noch keine pAF4-aufgereinigten DNA-STV-Konjugate verwendet, da diese Methode erst im späteren Verlauf der Arbeit etabliert und optimiert wurde.

Die Charakterisierung von **39** und **40** sollte mittels ndPAGE erfolgen, da bei der ndPAGE-Analyse mittels Hybridisierung und Biotin-STV-Wechselwirkungen generierte Bindungen erhalten bleiben. Darum wurde diese Methode für die Charakterisierung der Nanohanteln und -Doppelhanteln gewählt. Um die Banden bei der ndPAGE den eingesetzten Konjugaten zuordnen zu können, wurden die DNA-mSTV- und DNA-nSTV-Konjugate vor dem Hybridisieren mit biotinylierten Fluoreszenzfarbstoffen markiert.

Zur Kontrolle der Assemblierung von **39** und **40** wurden je 16 pmol von F9-mSTV-Monokonjugat und F9-mSTV-Bikonjugat mit 80 pmol biotinylierten Atto 550 von ATTO-TEC (Siegen, D) sowie 16 pmol cF9-nSTV-Monokonjugat mit 80 pmol biotinylierten Atto 647 von ATTO-TEC (Siegen, D) bei RT für 30 min inkubiert. Dann wurden aus diesen Konjugatlösung die Nanostrukturen und Kontrollproben nach der Tabelle in *Abbildung 2.50* assembliert und bei RT für 30 min inkubiert. Danach wurden jeweils 2 pmol der Proben mit 6x Orange DNA Loading Dye in ein 8.5% ndGel geladen. Die Geldokumentation, des in *Abbildung 2.50* gezeigten Gels, erfolgte am Fluoreszenzgelscanner.

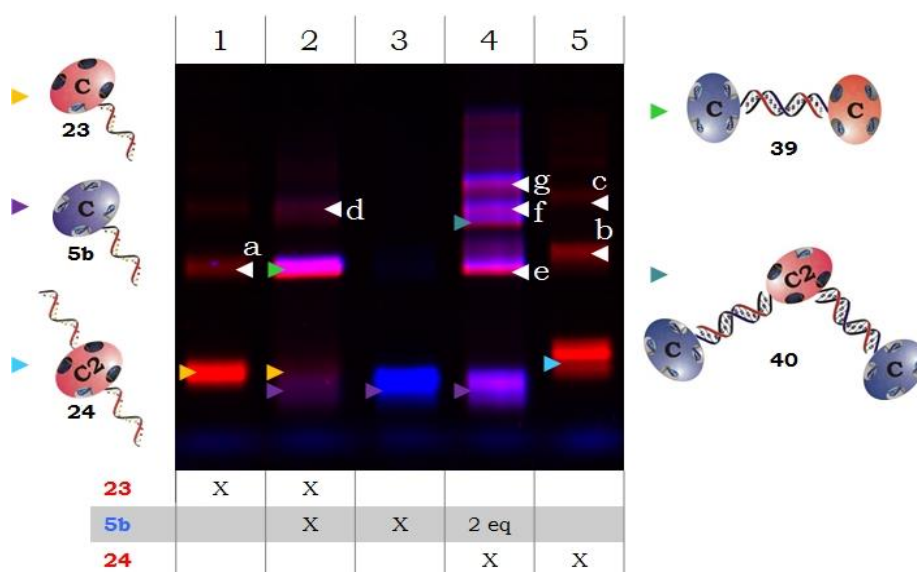


Abbildung 2.50: 8.5% ndPAGE von **39** und **40** nach Scannen des Fluoreszenzgels mit Cy3-Filter für **Atto 550** und Cy5-Filter für **Atto 647**; **Spur 1:** F9-mSTV-Monokonjugat **23**, **Spur 2:** **23** + cF9-nSTV-Monokonjugat **5b**, **Spur 3:** **5b**, **Spur 4:** F9-mSTV-Bikonjugat **24** + 2 eq **5b**, **Spur 6:** **24**.

Die Zuordnung der Banden in *Abbildung 2.50* erfolgte analog der bekannten Bandentrennung aus der ndPAGE von F9-mSTV-Konjugaten in *Abbildung 2.18* und F9-nSTV-Konjugaten in *Abbildung 2.6*. Die Banden der verglichen mit DNA-STV-Konjugaten gelelektrophoretisch weniger mobilen STV-DNA-Nanostrukturen **39** und **40** konnten zusätzlich anhand ihrer Fluoreszenz identifiziert werden. Dabei wurden die Banden der Konjugatdimere und STV-DNA-Nanostrukturen zur leichteren Diskussion mit **(a)** bis **(f)** benannt.

In der mit F9-mSTV-Monokonjugat beladenen Spur 1 lassen sich zwei rote Banden erkennen. Der elektrophoretisch mobileren Banden (**▶**) wurde Konjugatmonomer **23** und der anderen (**c**) wurde Konjugatdimer **(23)₂** zugeordnet.

In Spur 2 wurde zuvor miteinander inkubiertes F9-mSTV-Monokonjugat und cF9-nSTV-Monokonjugat geladen. Den mobileren Banden wurden die eingesetzten Konjugatmonomere **5b** (**▶**) und **23** (**▶**) zugeordnet. Der intensive rosa gefärbten Bande (**▶**) wurde die DNA-STV- Hantel **39** zugeordnet. Der am wenigsten mobilen Bande in Spur 2 (**d**) wurde die Nanodoppelhantel aus einem Konjugatmonomer **5b** und einem Konjugatdimer **(23)₂** zugeordnet.

In der mit cF9-nSTV-Monokonjugat beladenen Spur 3 lässt sich eine blaue Bande (**▶**) erkennen, der **5b** zugeordnet wurde. Wie unter 2.1.4.2 beschrieben, führte die DNA-nSTV-Konjugatsynthese zu einer deutlich geringeren Bildung von Konjugatdimeren als die DNA-mSTV-Konjugatsynthese. Darum erreichten die Konjugatdimere in Spur 3 die Detektionsgrenze nicht.

Spur 4 wurde mit zuvor miteinander inkubiertem F9-mSTV-Bikonjugat **24** und 2 eq cF9-nSTV-Monokonjugat **5b** beladen. Der mobilsten Bande (**▶**) wurde **5b** zugeordnet. Wie schon in Spur 2 ist diese Bande des Konjugatmonomers lila, was vermuten lässt, dass cF9-nSTV-Monokonjugat nicht vollständig durch biotinyliertes Atto 647 geblockt war und dadurch biotinyliertes Atto 550 binden konnte. Die Bande (**e**) zeigt eine elektrophoretische Mobilität und Farbverhältnisse vergleichbar mit der Bande von **39** in Spur 2, wodurch diese Bande die Nanohantel aus **5b** und **24** zugeordnet wurde. Der folgenden Bande (**▶**) wurde die Doppelhantel **40** zugeordnet. Diese Zuordnung erfolgte anhand der erwarteten elektrophoretischen Mobilität von **40**, wobei eine niedrigere Mobilität als bei der Nanohantel aus **5b** und **24** und eine höhere Mobilität als bei einer Nanodoppelhantel aus einem DNA-STV-Konjugatmonomer und einem -dimer erwartet wurde. Bande (**f**) zeigt eine zu Bande (**d**) identische Mobilität und wurde der Nanodoppelhantel aus **5b** und **(24)₂** zugeordnet. Diese Nanodoppelhantel wanderte im Vergleich zu **40** langsamer in der Gelmatrix, weil **(24)₂** durch die vier gebundenen Oligonucleotide ein größeres hydrodynamisches Volumen einnimmt. Mit der geringsten elektrophoretischer Mobilität wurde der Bande (**g**) Nanostrukturen aus vier miteinander verbundenen DNA-STV-Konjugaten zugeordnet. Diese Nanostrukturen könnten sich aus einem Konjugattrimer **(24)₃** mit daran hybridisierten **5b** oder einem Konjugatdimer **(24)₂** mit zwei daran hybridisierten **5b** aufbauen.

In der mit F9-mSTV-Bikonjugat beladenen Spur 5 lassen sich drei rote Banden erkennen. Der elektrophoretisch mobilsten Bande (▶) wurde Konjugatmonomer **24**, (b) –dimer (**24**)₂ und (c) –trimer (**24**)₃ zugeordnet.

An der wenig intensiven Bande von **40** (▶) in Spur 4 lässt sich erkennen, dass große Anteile der eingesetzten DNA-STV-Konjugate nicht zur Nanodoppelhantel assemblierten.

Bei der ndPAGE-Charakterisierung von fluoreszenzmarkierten DNA-mSTV-nSTV-Hanteln und Doppelhanteln ließ sich die erfolgreiche Assemblierung der supramolekularen DNA-STV Nanostrukturen **39** und **40** erkennen. Jedoch wurde sehr deutlich, dass eine ergänzende Konjugataufreinigung nach der Anionenaustauschchromatographie notwendig war. Ohne weitere Aufreinigung assemblierten zusätzlich Nanostrukturen aus DNA-STV-Konjugatdimeren und -trimeren, wie sie in den Banden (**d**), (**f**) und (**g**) beobachtet wurden. Diese Nanostrukturen assemblierten vorwiegend aus (**23**)₂ bzw. (**24**)₂ und (**24**)₃ und **5b**. Darum sollten alle im Folgenden assemblierten DNA-STV-Nanostrukturen aus zuvor pAF4 aufgereinigten Konjugaten assembliert werden. Zusätzlich wurde der Anteil der Konjugatdimere bei der DNA-mSTV-Konjugatsynthese durch Verwendung des Crosslinkers SM(PEG)₄ gesenkt.

2.2.2 Assemblierung der DNA-mSTV-Hantel **38**

Die im Folgenden assemblierte DNA-mSTV-Hantel **38** (Struktur siehe *Abbildung 2.30*) sollten aus den SM(PEG)₄ verknüpften DNA-mSTV-Monokonjugaten **32a** und **32b** aufgebaut werden. Für **38** sollte im Gegensatz zu **39** nur Konjugatmonomere aus mSTV verwendet werden, welche zuvor mittels pAF4 von Konjugatdimeren (siehe Kapitel 2.1.3) getrennt wurden. Die Notwendigkeit der pAF4-Aufreinigung wurde im Kapitel 2.2.1 gezeigt. Die Vorteile und die höhere Herausforderung bei der Verwendung von DNA-mSTV-Konjugaten ist in der Zielsetzung unter 1.3 beschrieben.

Die Assemblierung von **38** sollte den erfolgreichen Aufbau von Nanostrukturen aus pAF4-aufgereinigten DNA-STV-Konjugaten mit zeigen.

Die Kontrolle der Assemblierung erfolgte über ndPAGE und anschließendes Scannen des Gels am Fluoreszenzbildgerät. Hierzu wurde der LaVision Bioanalyser verwendet, dieser ist für das Fluoreszenzscannen von Mikroarrays optimiert. Für Gele musste eine Adapterglasplatte in einem leeren Mikrotiterplattenrahmen verwendet werden. Dabei wurde das ndGel vom Fluoreszenzbildgerät in Bildabschnitten aufgenommen und das vollständige Bild mit der Gerätesoftware nachträglich zusammengefügt. Dabei wurden keine mit dem Fluoreszenzgelscanner, welcher zu diesem Zeitpunkt für Messungen nicht mehr zur Verfügung stand, vergleichbaren Auflösungen erreicht.

Um die DNA-mSTV-Konjugate und daraus assemblierten Nanostrukturen nach der ndPAGE den erhaltenen Banden zuordnen zu können, wurden diese vor dem Hybridisieren mit biotinylierten Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Zusätzlich wurden als Kontrolle nicht AF4 aufgereinigte Konjugate assembliert und in das ndGel geladen. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden anhand der FITC- und Cy3-Filter des Fluoreszenzbildgerätes gewählt.

Für die Assemblierung wurden je 16 pmol von **32a** und nicht AF4 aufgereinigtes F9-STV-Monokonjugat mit 32 pmol biotinylierten Atto 550 (bAtto 550) sowie je 16 pmol **32b** und AF4 aufgereinigtes cF9-STV-Monokonjugat mit 32 pmol biotinylierten Atto 488 (bAtto488) von ATTO-TEC (Siegen, D) bei RT für 30 min inkubiert. Dann wurden 8 pmol **32a** mit 8 pmol **32b** und 8 pmol nicht AF4 aufgereinigtes F9-STV-Monokonjugat mit 8 pmol nicht AF4 aufgereinigtes cF9-STV-Monokonjugat für 30 min bei RT assembliert. Je 2 pmol dieser Proben wurden mit 6x Orange DNA Loading Dye gemischt und in das unter *Abbildung 2.51* dargestellte 8.5% ndGel geladen.

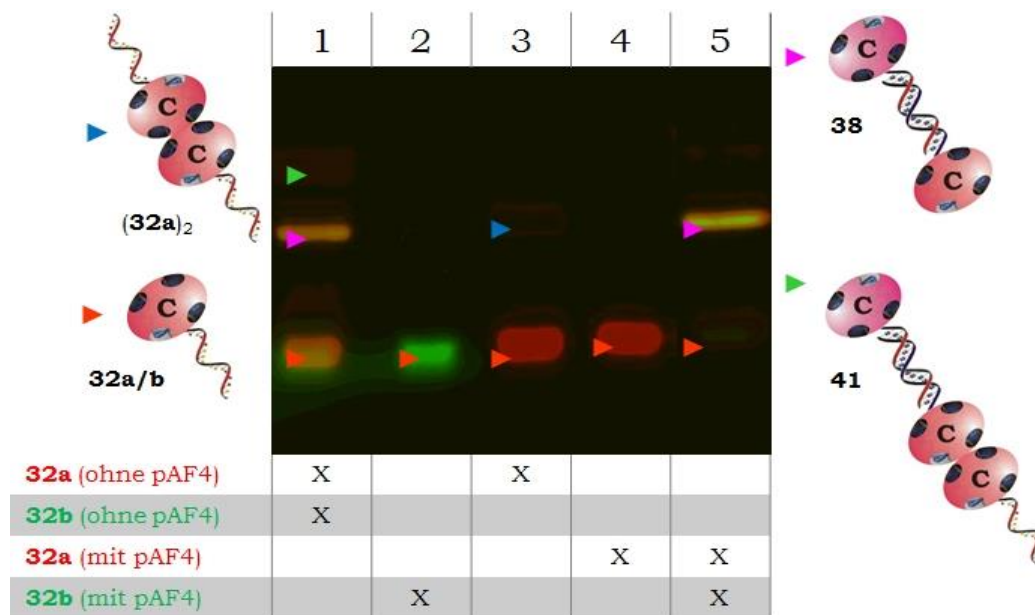


Abbildung 2.51: 8.5% ndPAGE von DNA-mSTV-Hanteln nach Scannen des Fluoreszenz mit Cy3-Filter für **Atto 550** und FITC-Filter für **Atto 488**; **Spur 1:** nicht AF4 aufgereinigtes F9-STV-Monokonjugat + nicht AF4 aufgereinigtes cF9-STV-Monokonjugat, **Spur 2:** **32b**, **Spur 3:** nicht AF4 aufgereinigtes F9-STV-Monokonjugat, **Spur 4:** **32a**, **Spur 5:** **32a** + **32b**.

Die Bandenzuordnung in *Abbildung 2.51* erfolgte analog zur DNA-mSTV-nSTV-Hantel und -Doppelhantel in *Abbildung 2.50*.

Spur 1 wurde zur Kontrolle der AF4-Aufreinigung mit nicht pAF4-aufgereinigten DNA-mSTV-Konjugaten beladen. Die Banden wurden mit fallender elektrophoretischer Mobilität den DNA-mSTV-Monokonjugaten **32a** und **32b** (▶), der assemblierten DNA-mSTV-Hantel **38** (▶) und Doppelhanteln **41** aus einem Konjugatdimer (**32a**)₂ bzw. (**32b**)₂ mit einem daran hybridisierten Konjugatmonomer **32a** bzw. **32b** (▶) zugeordnet.

In Spur 2 ist eine grüne Bande (▶) zu erkennen, der Atto 488 markiertem Monokonjugat **32b** zugeordnet wurde.

Spur 3 wurde mit Atto 550 markiertem, nicht AF4 aufgereinigtem F9-STV-Monokonjugat. Es ist eine intensive rote Bande (▶) zu erkennen, der **32a** zugeordnet wurde. Der anderen Bande (▶) wurde Konjugatdimer **32a** zugeordnet.

In Spur 3 ist eine rote Bande (▶) zu erkennen, der Atto 550 markiertem Monokonjugat **32a** zugeordnet wurde.

Spur 5 wurde mit hybridisierten **32a** und **32b** beladen. Es ist eine elektrophoretisch mobilere Bande (▶) zu erkennen, der die Konjugatmonomere **32a** und **32b** zugeordnet wurden. Der Hauptbande (▶) wurde die Nanohantel **38** zugeordnet.

Die ndPAGE mit fluoreszenzmarkierten Proben zeigte, dass die DNA-mSTV-Hantel **38** aus den DNA-mSTV-Konjugaten **32a** und **32b** erfolgreich assembliert wurde (siehe ▶). Bei der Assemblierung aus AF4-aufgereinigten Konjugaten hybridisierten im Vergleich zu den nicht aufgereinigten Konjugaten deutlich größere Anteile der DNA-mSTV-Konjugate zur Nanohantel (siehe schwach ausgeprägte Bande der Konjugatmonomere (▶) in Spur 5). Eine mögliche Ursache dafür war eine präzisere Quantifizierung der Bausteine der Assemblierung der Nanohantel aus aufgereinigten DNA-mSTV-Konjugatmonomeren gegenüber der Assemblierung aus einer gemischten Lösung von Konjugatmonomeren und -dimeren.

In der Kontrollspur mit nicht AF4-aufgereinigtem F9-mSTV-Monokonjugat lassen sich deutlich weniger Konjugatdimere (▶) erkennen, als bei dem sSMCC verknüpften F9-mSTV-Monokonjugat in *Abbildung 2.50*. Dennoch wurden bei der Assemblierung von **38** aus nicht pAF4-aufgereinigten DNA-mSTV-Monokonjugaten die aus Konjugatdimeren aufgebaute Nanostruktur **41** (siehe ▶) beobachtet. Daraus wurde erneut deutlich, dass auch bei der Verwendung des Crosslinkers SM(PEG)₄, trotz der reduzierten Bildung von Konjugatdimeren eine ergänzende pAF4-Aufreinigung vor der Assemblierung der DNA-STV-Nanostrukturen notwendig ist.

In einem weiteren Aufreinigungsschritt wurden die assemblierten DNA-mSTV-Hanteln **38** mittels einer weiteren pAF4-Aufreinigung von nicht-hybridisierten DNA-mSTV-Konjugaten getrennt. Dafür wurden jeweils 3 nmol **32a** und **32b** für 30 min bei RT inkubiert. Dann wurden 300 pmol der unmittelbar assemblierten Nanohantel-Lösung in den Analysekanal der AF4 injiziert. Das für die pAF4 gewählte Flussprofil entsprach den Einstellungen der pAF4 von DNA-mSTV-Konjugaten. Das dabei entstandene AF4-Fraktogramm ist in *Abbildung 2.52* gezeigt.

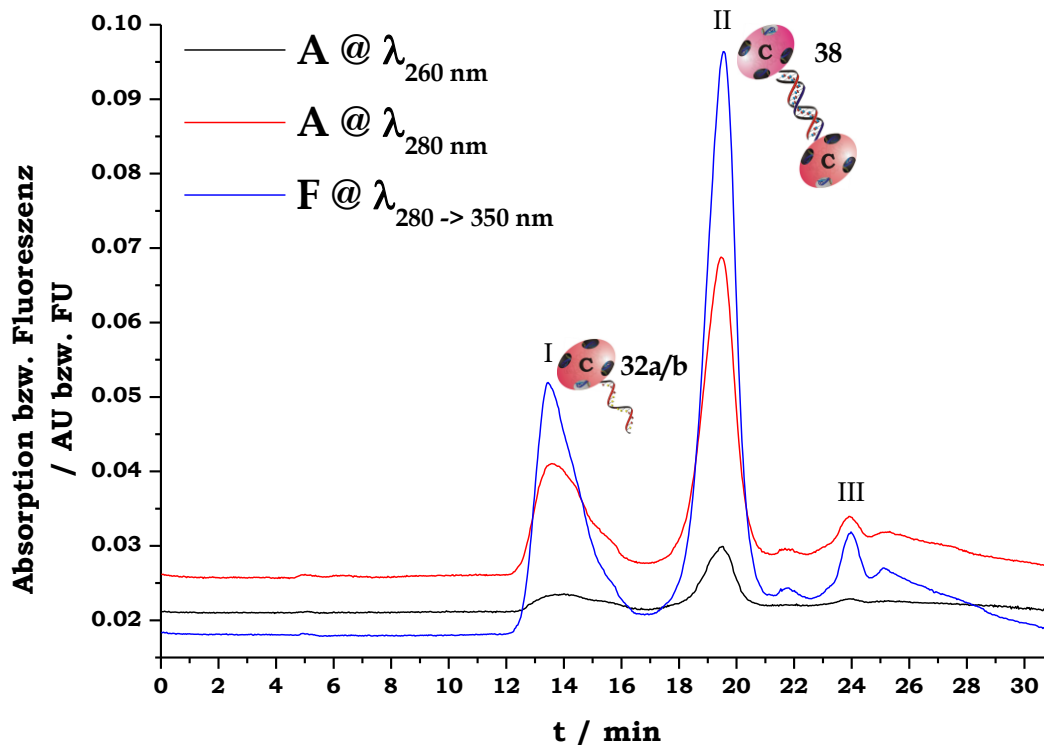


Abbildung 2.52: pAF4-Fraktogramm der DNA-mSTV-Hantel **38**; Peak I: **32a** und **32b**, Peak II: **38** und Peak III aggregiertes Konjugat.

Im AF4-Fraktogramm der DNA-mSTV-Nanohantel **38** in *Abbildung 2.52* sind drei Peaks zu erkennen. Peak I wurde den Probenbestandteilen mit kleinstem hydrodynamischem Radius, d.h. den nicht hybridisierten DNA-mSTV-Konjugatmonomeren **32a** und **32b** zugeordnet. Peak II wurde anhand der Reaktionsreihenfolge der DNA-mSTV-Hantel **38** zugeordnet. Peak III eluierte nach vollständiger Reduktion des Querflusses unter einem intensiven Signal der SLS. Darum wurden Peak 3 aggregierte Konjugaten zugeordnet, die als Zufallsknäule mit großem hydrodynamischen Radius eluierten. Die Fraktionen aus zehn aufeinanderfolgenden pAF4-Läufen von Peak I und Peak II wurden jeweils vereint, aufkonzentriert, umgepuffert und quantifiziert.

Um den Einfluss des zusätzlichen pAF4-Aufreinigungsschrittes zu verdeutlichen, wurde in der folgenden ndPAGE-analyse **32a** und **32b** und daraus assemblierte DNA-mSTV-Hanteln **38** vor und nach der pAF4 aufgetragen. Zusätzlich wurden als Kontrolle nicht pAF4-aufgereinigte DNA-mSTV-Monokonjugate und eine daraus assemblierte Nanohantel verwendet. Hierfür wurde ein ndGel mit jeweils 2.0 pmol der in der Tabelle in *Abbildung 2.53* aufgeführten Proben beladen. In den Spuren 7 und 8 sind 2.0 pmol der Proben aus Peak I und Peak II des Fraktogramms in *Abbildung 2.52* aufgetragen.

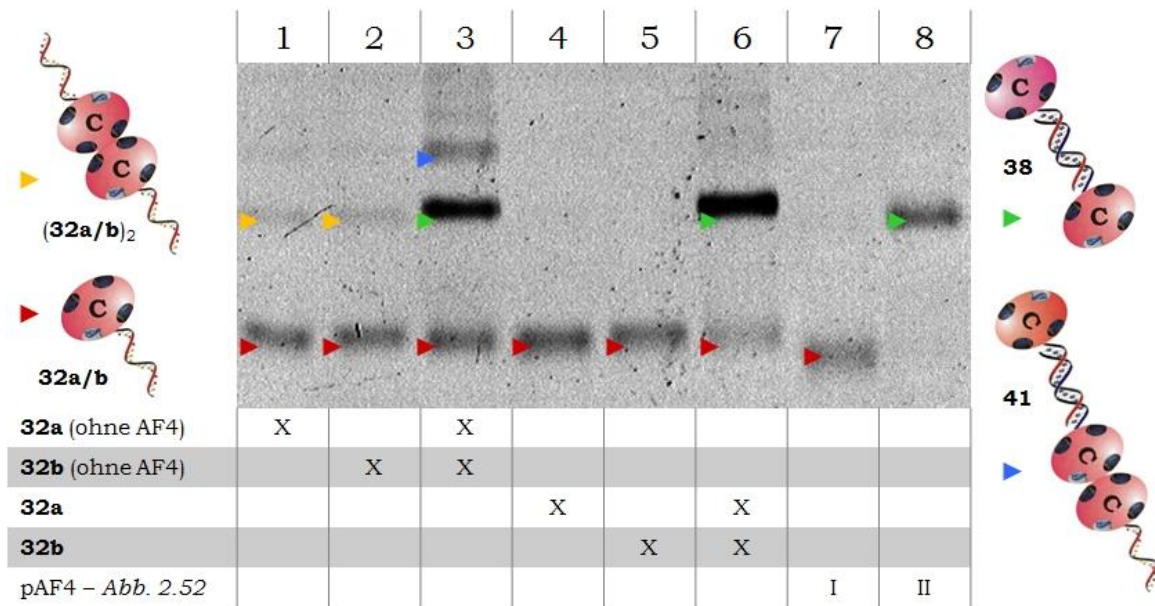


Abbildung 2.53: 8.5% ndPAGE der DNA-mSTV-Hantel **38** und ihrer Bausteinen vor und nach pAF4 mit anschließender Sybr Gold Färbung; **Spur 1:** nicht AF4 aufgereinigtes F9-STV-Monokonjugat **32a**, **Spur 2:** nicht AF4 aufgereinigtes cF9-STV-Monokonjugat **32b** **Spur 3:** nicht AF4 aufgereinigtes **32a** + nicht AF4 aufgereinigtes **32b**, **Spur 4:** AF4 aufgereinigtes **32a**, **Spur 5:** AF4 aufgereinigtes **32b** **Spur 6:** AF4 aufgereinigtes **32a** + AF4 aufgereinigtes **32b**, **Spur 7** und **Spur 8** Peak I und Peak II der pAF4 aus Abbildung 2.52.

In Spur 1 wurden die Banden des Konjugatmonomers **32a** (▶) und -dimers (**32a**)₂ (►) beobachtet. Vergleichbare elektrophoretische Mobilität lassen sich bei den Banden des komplementären Monokonjugats in Spur 2 erkennen, welche **32b** (▶) und (**32b**)₂ (►) zugeordnet wurden.

Spur 3 wurde mit den zuvor hybridisierten nicht AF4 aufgereinigten Monokonjugaten aus den Spuren 1 und 2 beladen. Es wurden die Banden von **32a** und **32b** (▶), von der Nanohantel **38** (►) und von der Nanodoppelhantel **41** (►) zugeordnet. Zusätzlich lassen sich über der Bande von **41** Banden erkennen, die DNA-mSTV-Nanostrukturen mit vier und mehr Konjugatbausteinen zugeordnet wurden. Diese Strukturen wurden vermutlich bei der Hybridisierung von Konjugatdimeren oder -oligomeren assembliert.

Den Banden in Spur 4 und 5 wurden den AF4 aufgereinigten Konjugatmonomeren **32a** bzw. **32b** (▶) zugeordnet.

Spur 6 wurde mit den vorher hybridisierten AF4 aufgereinigten Konjugatmonomeren aus Spur 4 und 5 beladen. Es lassen sich zwei Banden erkennen, von denen der mobileren Bande (▶) die **32a** und **32b** zugeordnet wurde. Der zweiten Bande (►) wurde die Nanohantel **38** zugeordnet.

In Spur 7 wurden die Fraktionen unter Peak 1 der pAF4 der DNA-mSTV-Hantel **38** (siehe Abbildung 2.52) aufgetragen. Hier lässt sich eine Bande (▶) erkennen, der die Konjugatmonomere **32a** und **32b** zugeordnet wurde.

Spur 8 wurde mit den Fraktionen unter Peak 2 der pAF4 der DNA-mSTV-Hantel **38** beladen. Es lässt sich eine Bande (▶) erkennen, der die erfolgreich aufgereinigte Nanohantel **38** zugeordnet wurde.

Die ndPAGE-Analyse zeigt deutlich die Bedeutung der pAF4-Aufreinigungsschritte für die Assemblierung von supramolekularen Nanostrukturen aus DNA-mSTV-Konjugaten. Bei der Assemblierung der Nanohantel **38** aus nicht AF4-aufgereinigten DNA-mSTV-Monokonjugaten (Spuren 1 bis 3) assemblieren zusätzlich zu **38** weitere DNA-mSTV-Nanostrukturen aus drei (**41**) und mehr Konjugatbausteinen. Infolge der AF4-aufreinigung der Konjugate (Spuren 4 bis 6) konnten Konjugatdimere abgetrennt werden und die Konjugatmonomere **32a** und **32b** wurden erfolgreich zur Nanohantel **38** assembliert. In der Spur der assemblierten DNA-mSTV-Hantel (Spur 6) lässt sich erkennen, dass keine weiteren Nanostrukturen aus mehr als zwei Konjugatbausteinen assemblierten. Die pAF4 der Nanohantel **38** erlaubte zusätzlich, nicht assemblierte Konjugatmonomere **32a** und **32b** (Spur 7) von der DNA-mSTV-Hantel (Spur 8) abzutrennen. Dieser Befund zeigte, dass unter den pAF4-Bedingungen eine mittels Hybridisierung assemblierte DNA-STV-Nanostrukturen stabil ist und dass mit dieser Methode DNA-STV-Nanostrukturen von ihren Konjugatbausteinen isoliert werden können.

Die assemblierten Nanoanteln **38** ließen sich bei der pAF4 (siehe *Abbildung 2.52* Peak II) zuordnen. Mittels aAF4 mit fluoreszenzmarkierten DNA-mSTV-Konjugaten sollten im Folgenden die einzelnen Bausteine und die assemblierte DNA-mSTV-Hantel identifiziert werden. Dadurch sollte gezeigt werden, dass die erfolgreiche Assemblierung unmittelbar bei der aAF4 detektierbar ist. Dafür wurden 150 pmol **32a** mit 300 pmol biotinylierten Atto 550 und 150 pmol **32b** mit 300 pmol biotinylierten Atto 488 bei RT für 30 min inkubiert. Zunächst wurden separat 50 pmol der fluoreszenzmarkierten Konjugatmonomere in die AF4 injiziert, um das Elutionsprofil von **32a** und **32b** aufzuzeichnen. Parallel wurden je 150 pmol fluoreszenzmarkierte **32a** und **32b** vereint und für 30 min bei RT zur DNA-mSTV-Nanohanteln assembliert. Dann wurden 50 pmol der fluoreszenzmarkierten Nanohantel **38** in die AF4 injiziert. In *Abbildung 2.54* sind die Fraktogramme der daraus resultierenden aAF4-Läufe zusammengelegt. Das Fraktogramm von **32a** ist als Punktlinie (⋯⋯), das Fraktogramm von **32b** ist als Strichlinie (----) und das Fraktogramm von **38** als durchgezogene Linie (—) dargestellt.

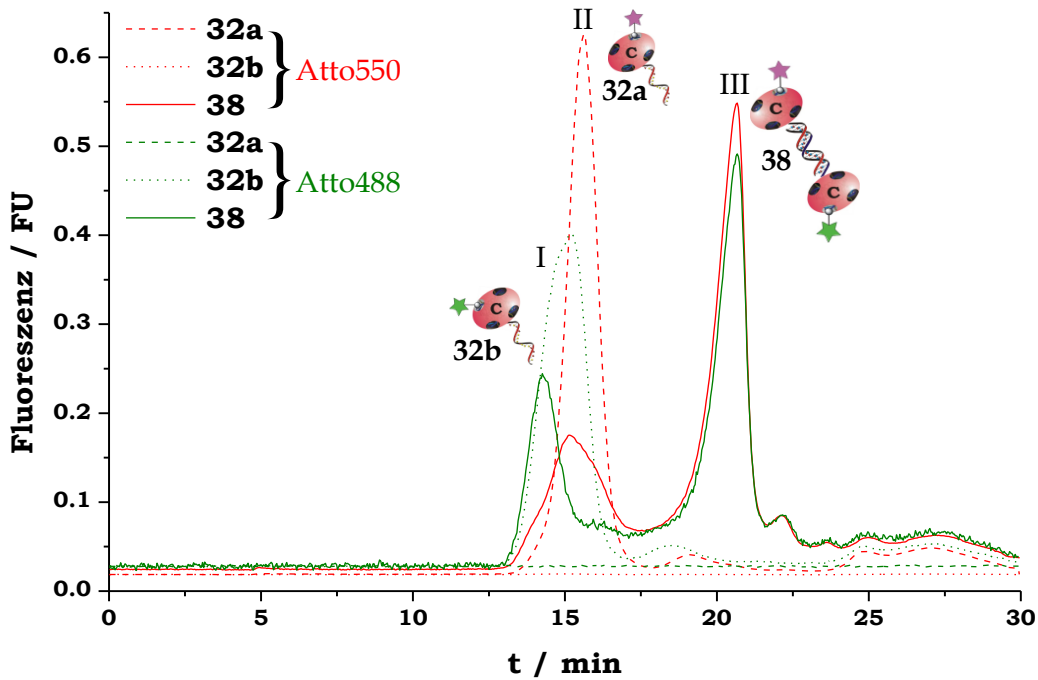


Abbildung 2.54: aAF4-Fraktogramme von fluoreszenzmarkierten DNA-mSTV-Konjugatmonomeren **32a** und **32b** und der DNA-mSTV-Nanohantel **38** detektiert bei $\lambda_{\text{Abs}} = 552 \text{ nm}$ mit $\lambda_{\text{Em}} = 576 \text{ nm}$ (**Atto 550**) und $\lambda_{\text{Abs}} = 501 \text{ nm}$ mit $\lambda_{\text{Em}} = 523 \text{ nm}$ (**Atto 488**); Peak I: **32b**, Peak II: **32a** und Peak III: **38**.

In den drei ineinandergelegten Fraktogrammen in *Abbildung 2.54* wurde Peak I Atto 488 markiertes Konjugatmonomer **32b**, Peak II Atto 550 markiertes Konjugatmonomer **32a** und Peak III mit beiden Fluoreszenzfarbstoffen markierte DNA-mSTV-Hanteln **38** zugeordnet. Nicht gebundene biotinylierte Farbstoffe wurden bei der AF4 nicht detektiert, da diese bei der Fokussierung durch die Membran des Trennkanals gespült werden und dadurch nicht zum Detektor gelangen.

Im Fraktogramm eluierten zunächst die Fraktionen des Konjugatmonomers **32b** (····) nach ca. 15 min unter einer intensiven Emission bei $\lambda = 523 \text{ nm}$. Die Fraktionen von **32a** (----) eluierten darauf folgend nach ca. 16 min unter einer intensiven Emission bei $\lambda = 576 \text{ nm}$. Die Elution der Nanohantel **38** (—) lässt sich Fraktogramm in Peak III mit einem intensiven Signal beider Fluoreszenzfarbstoffe bei einer Elutionszeit von ca. 20 min gut erkennen.

Die Peakzuordnung anhand der Fluoreszenzfarbstoffe im Fraktogramm der Nanohantel **38** in *Abbildung 2.54* bestätigt die Peakzuordnung anhand der Elutionsreihenfolge im Fraktogramm der Nanohantel **38** *Abbildung 2.52*.

Die Fraktogramme in *Abbildung 2.54* zeigen die erfolgreiche Charakterisierung der Assemblierung von kovalenten DNA-mSTV-Hanteln **38** mittels aAF4. Folglich kann die Assemblierung der DNA-STV-Nanostrukturen alternativ zur ndPAGE-Analyse mittels aAF4 charakterisiert werden. Die im Folgenden beschriebenen drei supramolekularen Nanostrukturen **1**, **2** und **3** wurden mittels aAF4 charakterisiert.

2.2.3 Assemblierung der DNA-mSTV-Doppelhantel 1

Der schematische Aufbau der DNA-mSTV-Doppelhantel **1** mit den für die aF4 vorgesehenen Fluoreszenzfarbstoffen ist in *Abbildung 2.55* dargestellt. Die Doppelhantel **1** sollte aus dem Konjugatmonomer des Bikonjugats **33a** und zwei Äquivalenten der Konjugatmonomere des Monokonjugats **32b** assembliert werden.

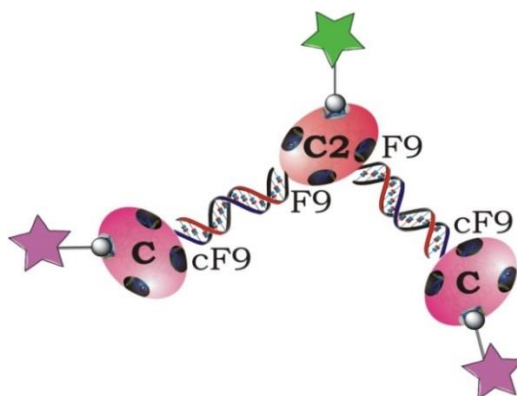


Abbildung 2.55: Schematische Darstellung der fluoreszenzmarkierten DNA-mSTV-Doppelhantel **1** aufgebaut aus **33a-Atto 488** und 2 eq **32b-Atto 633**.

Ähnlich der Assemblierung der Nanohantel **38** wurde das Konjugatmonomer **33a** mit zwei Äquivalenten biotinyliertem Atto 488 und das Konjugatmonomer **32b** mit zwei Äquivalenten biotinyliertem Atto 633 von ATTO-TEC (Siegen, D) für 30 min bei RT inkubiert. Danach wurden die fluoreszenzmarkierten Konjugatmonomere vereint und erneut für 30 min bei RT inkubiert.

Die erfolgreiche Assemblierung sollte mittels aAF4 und ndPAGE mit anschließender Geldokumentation am Fluoreszenzbildgerät charakterisiert werden. Dabei zeigte sich, dass die Doppelhantel **1** unter den gewählten Reaktionsbedingungen nicht assemblierte. Es assemblierte vorwiegend die DNA-mSTV-Nanohanteln **42** aus einem Äquivalenten **33a** und aus einem Äquivalenten **32b** (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Ursache für die unvollständige Assemblierung der Doppelhantel **1** war eine starke Hinderung der Hybridisierung eines zweiten Konjugatmonomers an die Nanohantel aus **33a** und **32b** infolge der hohen negativen Ladungsdichte an der DNA-mSTV-Nanohantel. Außerdem ließ sich eine erhebliche sterische Hinderung für die vollständige Assemblierung der Doppelhantel **1** erwarten.

Für eine erfolgreiche Assemblierung der DNA-mSTV-Doppelhantel **1** musste das Reaktionsgleichgewicht verschoben werden, so dass die Hybridisierung der Gesamtstruktur günstiger wurde. Dafür wurden zwei bei der Assemblierung von DNA-Origamis etablierte Methoden angewendet.^[64,195-196] Durch die Zugabe von Mg^{2+} bei der Nanostrukturassemblierung sollte die negative Ladung der Oligonucleotide ausgeglichen werden, so dass die Abstoßungskräfte zwischen den DNA-mSTV-Konjugaten reduziert wurden. Zusätzlich sollten mit einem Temperaturprogramm in einem PCR-Cycler bei der Assemblierung eine gleichmäßige Hybridisierung aller DNA-mSTV-Konjugate begünstigt werden.

Für die Assemblierung wurde das bisher verwendete PBS mit 12.5 mmol/L $MgCl_2$ ergänzt (PBS-Mg) oder alternativ TE-Mg verwendet. Mit beiden Puffern erfolgte die Assemblierung bei RT und bei zwei Temperaturprogrammen. Beim ersten Temperaturprogramm wurde die Reaktionslösung bei der Assemblierung für 5 min auf 40 °C erhitzt und dann mit 1 °C/min auf 20 °C abgekühlt. Das zweite Temperaturprogramm erhitzte die Reaktionslösung bei der Assemblierung für 5 min auf 60 °C und kühlte dann mit 1 °C/min auf 20 °C.

Die besten Assemblierungsbedingungen für die DNA-mSTV-Doppelhantel **1** wurden in PBS-Mg mit dem auf 60 °C erhitzenden Temperaturprogramm erzielt. Für die aAF4 wurden 20 pmol der assemblierten Doppelhantel **1** in den Analysekanal der AF4 injiziert. Das dabei erhaltene Fraktogramm ist in *Abbildung 2.56* dargestellt. Dabei wurde die Absorption bei $\lambda = 280$ nm und die Fluoreszenz bei den spezifischen Wellenlängen der Fluoreszenzfarbstoffe Atto 488 und Atto 633 detektiert.

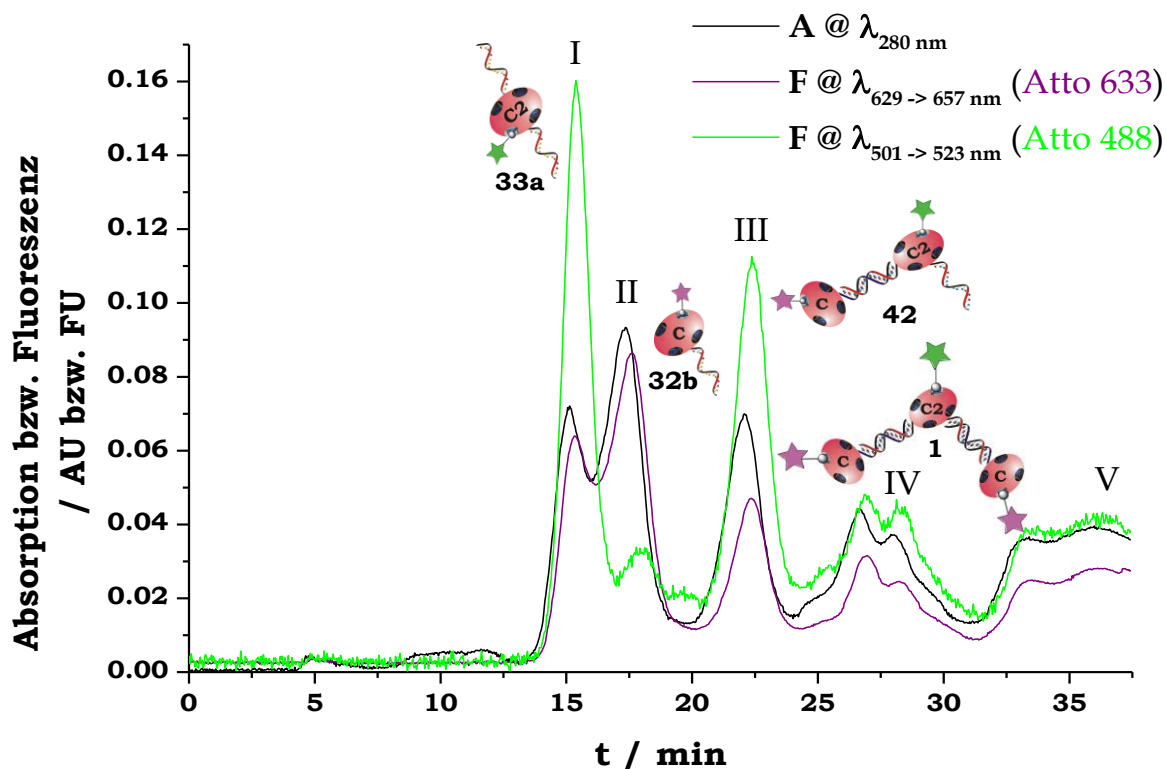


Abbildung 2.56: aAF4-Fraktogramm der DNA-mSTV-Doppelhantel **1** detektiert bei $\lambda_{Abs} = 280$ nm, $\lambda_{Abs} = 501$ nm mit $\lambda_{Em} = 523$ nm (Atto 488) und $\lambda_{Abs} = 629$ nm mit $\lambda_{Em} = 657$ nm (Atto 633); Peak I: **33a**, Peak II: **32b**, Peak III: Nanohantel **42**, Peak IV: Nanodoppelhantel **1** und Peak V aggregiertes Konjugat.

Im AF4-Fraktogramm in *Abbildung 2.56* lassen sich fünf Peaks erkennen, die anhand der Elutionsreihenfolge und den Fluoreszenzintensitäten der jeweiligen Farbstoffe zugeordnet wurden.

Dem Eluenten in Peak I wurden Atto 488-markiertem **33a** zugeordnet. Peak II wurde Atto 633-markiertem **32a** zugeordnet. Aus der aufaddierten Flächen unter Peak I und II ließ sich ein Anteil von $59.4\% \pm 3.2\%$ nicht hybridisierter Konjugatmonomere bei der Assemblierung der Doppelhantel **1** berechnen.

Peak III wurde anhand der Signale der Fluoreszenzfarbstoffe der Nanohantel **42** zugeordnet. Die Integration der Fläche unter Peak III ergab einen Anteil dieser DNA-mSTV-Hantel von $24.6\% \pm 2.3\%$.

Peak IV wurde der DNA-mSTV-Doppelhantel **1** zugeordnet. Die Assemblierung der Doppelhantel erfolgte trotz optimierter Bedingungen nur zu $16\% \pm 3.9\%$.

Peak V wurde teilweise aggregiertem DNA-mSTV zugeordnet, das als großes Knäuel mit daran gebundenen Fluoreszenzfarbstoffen eluierte.

Bei der ndPAGE-Charakterisierung und anschließender Geldokumentation mit dem Fluoreszenzbildgerät, der mittels pAF4 aufgereinigten DNA-mSTV-Doppelhanteln zeigte sich, dass die Detektionsgrenze des Fluoreszenzbildgeräts mit den bei der pAF4 bereitgestellten Proben der assemblierten Nanostrukturen nicht erreicht wurde. Die mittels pAF4 aufgereinigten und mit biotinylierten Fluoreszenzfarbstoffen markierten DNA-mSTV-Konjugatmonomere ließen sich als Banden bei der ndPAGE erkennen. Die Banden der hybridisierten Strukturen aus den Peaks I/II, III und IV der pAF4 der Doppelhantel **1** (siehe *Abbildung 2.56*) erreichten jedoch nicht die Detektionsgrenze des Fluoreszenzbildgeräts (siehe im Anhang unter *Abbildung 7.8*). Ursache dafür war die geringe zur Verfügung stehende Probemenge bei gleichzeitiger hoher Verdünnung in den Fraktionen der pAF4. Nach Umpuffern und Aufkonzentrieren war eine genauere Quantifizierung mit den geringen Stoffmenge der assemblierten Strukturen erschwert, so dass die Gele nicht mit genau definierten Stoffmengen beladen werden konnten.

Aus dem in *Abbildung 2.56* gezeigten AF4-Fraktogramm der kovalenten DNA-mSTV-Doppelhanteln ließ sich erkennen, dass die DNA-mSTV-Doppelhantel **1** erfolgreich zu $16\% \pm 3.9\%$ aus den fluoreszenzmarkierten Konjugatmonomeren assembliert wurde. Mittels pAF4 konnte keine ausreichende Menge an Doppelhanteln **1** isoliert werden, um die Struktur mit Hilfe von ndPAGE zu charakterisieren. Als Ursache für den großen Anteil nicht vollständig assemblierter Konjugate lassen sich elektrostatische Abstoßung und sterische Hinderung beim Hybridisieren am zentralen Konjugatmonomer **33a** vermuten.

2.2.4 Assemblierung der DNA-mSTV-Doppelhantel 2

Der schematische Aufbau einer fluoreszenzmarkierten DNA-mSTV-Doppelhantel **2** ist in Abbildung 2.57 dargestellt. Im Unterschied zum Design der Doppelhantel **1**, wurde die Doppelhantel **2** aus drei unterschiedlichen DNA-mSTV-Konjugatmonomeren assembliert. Dabei sollten zwei DNA-mSTV-Konjugate anhand von kovalent gebundenen Oligonucleotiden aneinander hybridisieren. Die Verbindung zum dritten DNA-mSTV-Konjugat sollte über ein biotinyliertes Oligonucleotid erfolgen, an welches das dritte DNA-mSTV-Konjugat mit einem kovalent gebundenen Oligonucleotid hybridisieren sollte. DNA-mSTV-Doppelhantel **2** sollte aus mit biotinyliertem und Cy3-markiertem F10 (bF10-Cy3) von Sigma-Aldrich **32a**, bAtto 488 markiertem **32d** und bAtto 633 markiertem **32b** assembliert werden.

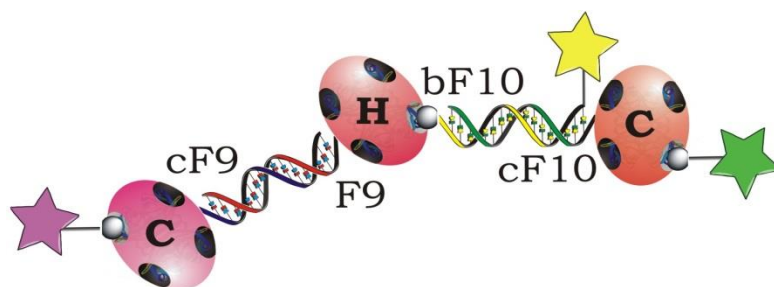


Abbildung 2.57: Schematische Darstellung der DNA-mSTV-Doppelhantel **2** aufgebaut aus **32a-bF10-Cy3**, **32d-Atto 488** und **32b-Atto 633**.

Zunächst wurde **32a** mit einem Äquivalent bF10-Cy3, **32d** mit zwei Äquivalenten bAtto 488 und **32b** mit zwei Äquivalenten bAtto 633 für 30 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Assemblierung analog zur Doppelhantel **1**. Dabei wurden erneut die unter 2.2.3 beschriebenen Assemblierungsbedingungen verwendet. Wie bei der Doppelhantel **1** wurden die größten Anteile vollständig assemblierter DNA-mSTV-Doppelhantel **2** in PBS-Mg und einem Temperaturprogramm erzielt, bei dem die Reaktionslösung bei der Assemblierung für 5 min auf 60 °C erhitzt wurde und anschließend mit 1 °C/min auf 20 °C abgekühlt wurde.

Für die Charakterisierung mittels aAF4 wurden 20 pmol der assemblierten DNA-mSTV-Doppelhantel **2** in die AF4 injiziert. Für das in *Abbildung 2.58* dargestellte Fraktogramm wurde die Absorption bei $\lambda = 280$ nm und die Fluoreszenz bei den spezifischen Wellenlängen der Fluoreszenzfarbstoffe Cy3, Atto 488 und Atto 633 detektiert.

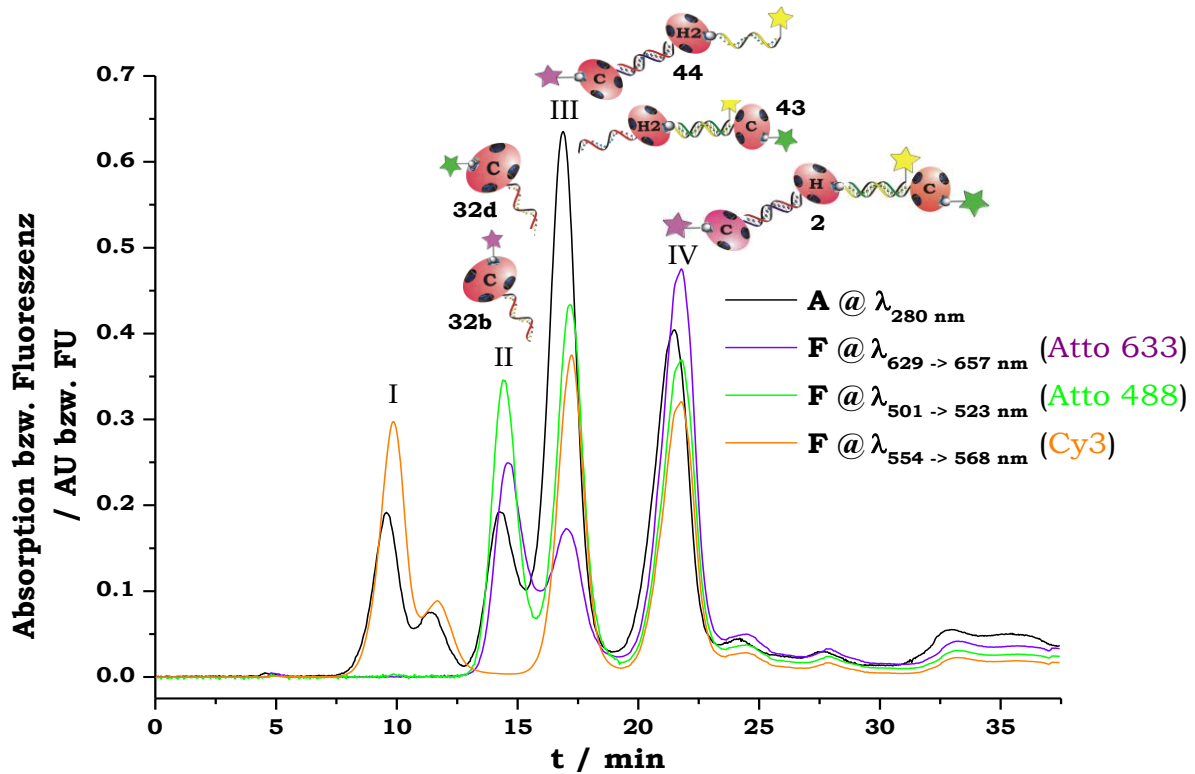


Abbildung 2.58: *a*AF4-Fraktogramm der DNA-mSTV-Doppelhantel **2** detektiert bei $\lambda_{Abs} = 280$ nm, $\lambda_{Abs} = 501$ nm mit $\lambda_{Em} = 523$ nm (**Atto 488**), $\lambda_{Abs} = 554$ nm mit $\lambda_{Em} = 568$ nm (**Cy3**) und $\lambda_{Abs} = 629$ nm mit $\lambda_{Em} = 657$ nm (**Atto 633**); Peak I: bF10-Cy3, Peak II: Monokonjugate **32b** und **32d**, Peak III: Nanohanteln **43** und **44** und Peak IV: der Nanodoppelhantel **2**.

Das AF4-Fraktogramm in *Abbildung 2.58* zeigt vier Peaks, die anhand der Elutionsreihenfolge und den Fluoreszenzintensitäten der jeweiligen Farbstoffe zugeordnet wurden.

Peak I wurden anhand der Elutionsreihenfolge und dem intensiven Fluoreszenzsignal im Emissionsbereich von Cy3 nicht-gebundenem Oligonucleotid bF10-Cy3 zugeordnet.

In Peak II eluierten nicht assemblierte Konjugatmonomere als DNA-mSTV-Konjugatbausteine mit kleinem hydrodynamischem Radius, wobei Fluoreszenzsignale im Emissionsbereich von Atto 488 und Atto 633 zu erkennen sind. Darum wurden den Eluenten in Peak I den Konjugatmonomeren **32b** und **32d** zugeordnet. Die Integration der Fläche unter Peak II ergab einen Anteil von $16.1\% \pm 4.2\%$ der nicht-hybridisierten DNA-mSTV-Monokonjugate.

Peak III wurden den aus den Konjugatbausteinen assemblierbaren Nanohanteln **43** (hybridisiert aus **32a**, bF10 und **32d**) und **44** (hybridisiert aus **32a**, bF10 und **32b**) zugeordnet. Daraus ließen sich $47.1\% \pm 2.8\%$ DNA-mSTV-Nanohanteln nach dem Assemblieren bestimmen.

Peak IV wurde anhand der Signale aller drei Fluoreszenzfarbstoffe als die DNA-mSTV-Doppelhantel **2** identifiziert. Die Integration der Fläche unter Peak IV ergab einen Anteil der Doppelhantel **2** von $38.2\% \pm 5.4\%$.

Die Fraktionen II, III und IV wurden in anschließenden pAF4-Läufen der Doppelhantel **2** gesammelt, umgepuffert, aufkonzentriert und quantifiziert. Erneut erwies sich die Quantifizierung wegen der geringen Probemengen und hohen Verdünnung bei der pAF4 als ungenau. Bei der folgenden ndPAGE-Analyse mit anschließender Geldokumentation mit dem Fluoreszenzbildgerät ließen sich, wie bei der Doppelhantel **1**, keine Banden von assemblierten Nanostrukturen erkennen (siehe im Anhang unter *Abbildung 7.8*).

Das in *Abbildung 2.58* gezeigte Fraktogramm ließ die erfolgreiche Assemblierung der DNA-mSTV-Doppelhantel **2** erkennen. Mit einer Ausbeute von $38.2\% \pm 5.4\%$ konnte diese supramolekulare Nanostruktur aus drei unterschiedlichen DNA-mSTV-Monokonjugaten assembliert werden. Diese Ausbeute war verglichen mit der Doppelhantel **1** mehr als doppelt so hoch. Eine mögliche Ursache für die größeren Anteile vollständig assemblierter Doppelhantel **2** war das Design von **2**, da die Verknüpfung zum dritten DNA-mSTV-Monokonjugat über die Hybridisierung an ein zuvor an das zentrale DNA-STV-Monokonjugat gebundene, biotinylierte Oligonucleotid erfolgte. Dieses führt möglicherweise zu einer geringeren elektrostatischen Abstoßung und sterischen Hinderung am zentralen Konjugatmonomer **32a**.

2.2.5 Assemblierung der DNA-mSTV-Y-Tripelhantel **3**

Der schematische Aufbau der fluoreszenzmarkierten DNA-mSTV-Y-Tripelhantel **3** ist in *Abbildung 2.59* dargestellt. Das Design der DNA-mSTV-Y-Tripelhantel unterschied sich von der Doppelhantel **2** in einem vierten, hybridisierten DNA-mSTV-Monokonjugat. Dafür wurde das zentrale Monokonjugat von **2** durch ein DNA-mSTV-Bikonjugat bei der Y-Tripelhantel **3** ersetzt.

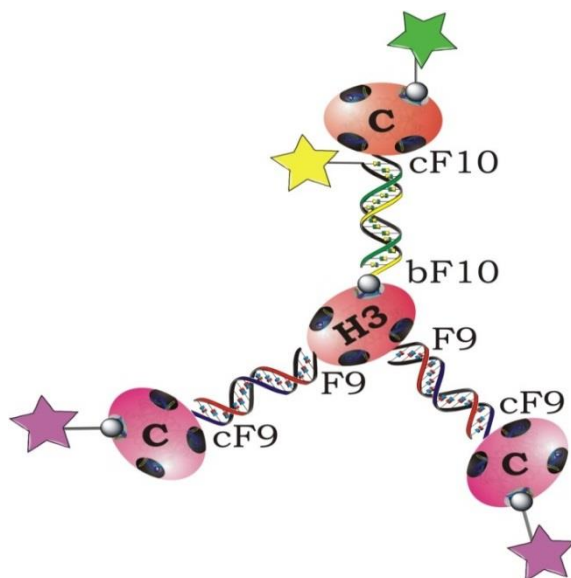


Abbildung 2.59: Schematische Darstellung der DNA-mSTV-Y-Tripelhantel **3** assembliert aus **33a-bF10-Cy3**, **32d-Atto 488** und 2 eq **32b-Atto 633**.

Für die Assemblierung der DNA-mSTV-Y-Tripelhantel **3** wurde zunächst das Bikonjugat **33a** mit einem Äquivalent bF10-Cy3 für 30 min bei RT inkubiert. Parallel wurden das DNA-mSTV-Monokonjugat **32d** mit zwei Äquivalenten bAtto 488 und zwei Äquivalente **32b** wurden mit vier Äquivalenten bAtto 633 für 30 min bei RT inkubiert. Dann erfolgte die Assemblierung analog zur DNA-mSTV-Doppelhantel **1**. Dabei wurden erneut die unter 2.2.3 beschriebenen Assemblierungsbedingungen verwendet. Wie bei der Doppelhantel **1** wurden die größten Anteile vollständig assemblierter DNA-mSTV-Y-Tripelhantel **3** in PBS-Mg und einem Temperaturprogramm erzielt, bei dem die Reaktionslösung bei der Assemblierung für 5 min auf 60 °C erhitzt wurde und anschließend mit 1 °C/min auf 20 °C abgekühlt wurde.

Für die Charakterisierung mittels aAF4 wurden 20 pmol der assemblierten DNA-mSTV-Y-Tripelhantel **3** in den Analysekanal der AF4 injiziert. Für das in *Abbildung 2.60* dargestellte Fraktogramm wurde die Absorption bei $\lambda = 280$ nm und die Fluoreszenz bei den spezifischen Wellenlängen der Fluoreszenzfarbstoffe Cy3, Atto 488 und Atto 633 detektiert.

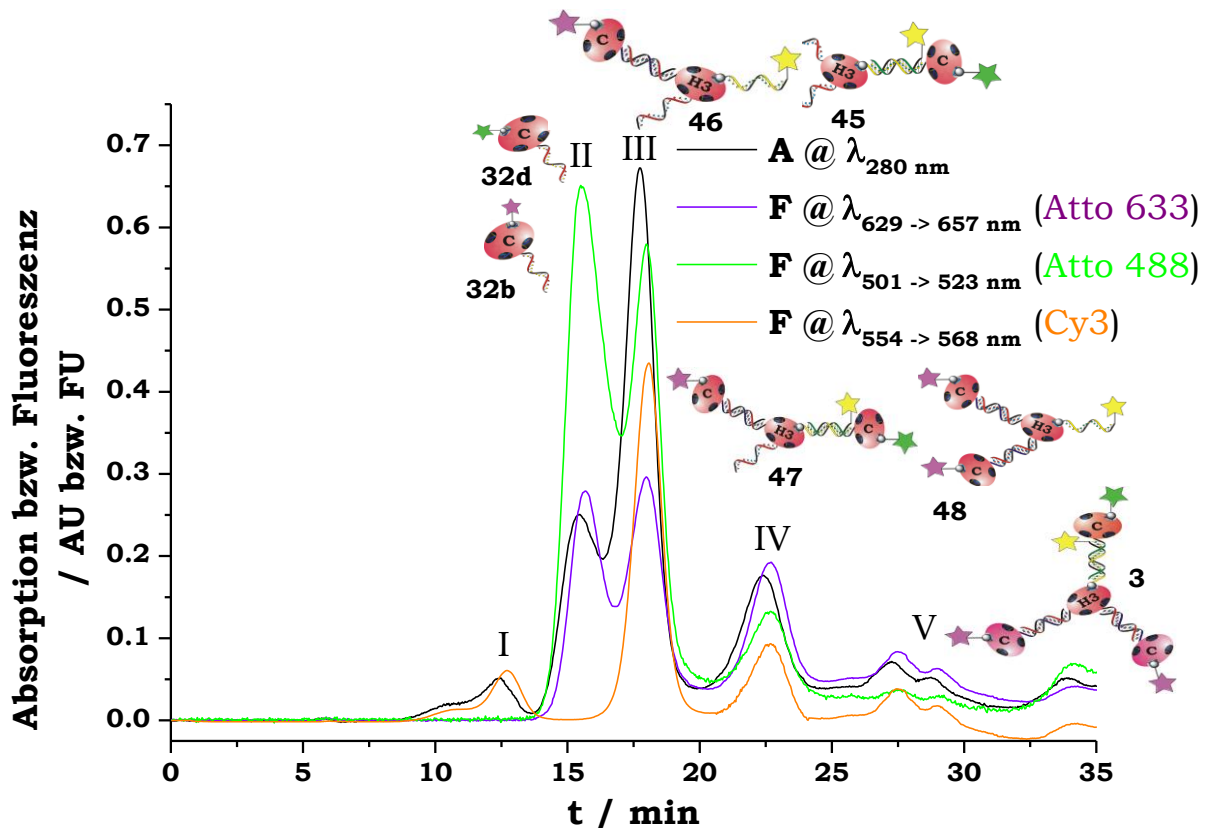


Abbildung 2.60: aAF4-Fraktogramm der DNA-mSTV-Y-Tripelhantel **3** detektiert bei $\lambda_{Abs} = 280$ nm, $\lambda_{Abs} = 501$ nm mit $\lambda_{Em} = 523$ nm (**Atto 488**), $\lambda_{Abs} = 554$ nm mit $\lambda_{Em} = 568$ nm (**Cy3**) und $\lambda_{Abs} = 629$ nm mit $\lambda_{Em} = 657$ nm (**Atto 633**); Peak I: bF10-Cy3, Peak II: Monokonjugate **32b** und **32d**, Peak III: Nanohanteln **45** und **46**, Peak IV: Nanodoppelhanteln **47** und **48** und Peak V: DNA-mSTV-Y-Tripelhantel **3**

Im Fraktogramm in *Abbildung 2.60* sind fünf Peaks zu erkennen. Deren Zuordnung anhand der Elutionsreihenfolge und der Intensität der drei verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte.

Peak I wurden anhand der Elutionsreihenfolge und dem Fluoreszenzsignal im Emissionsbereich von Cy3 nicht gebundenem bF10-Cy3 Oligonucleotid zugeordnet.

In Peak II eluierten nicht hybridisierte Konjugatmonomere als Nanostrukturbausteine mit dem kleinsten hydrodynamischem Radius, wobei Fluoreszenzsignale im Emissionsbereich von Atto 488 und Atto 633 zu erkennen sind. Darum wurden den Eluenten in Peak II Monokonjugat **32b** und **32d** zugeordnet. Die Integration der Fläche unter Peak II ergab einen Anteil von $20.1\% \pm 4.7\%$ der nicht hybridisierter DNA-mSTV-Monokonjugate.

Peak III wurde den aus den Konjugatbausteinen assemblierbaren Nanohanteln **45** und **46** zugeordnet. $53.7\% \pm 3.3\%$ der verwendeten Konjugate assemblierten zu DNA-mSTV-Nanohanteln.

Die Eluenten in Peak IV wurden anhand der Signale aller drei Fluoreszenzfarbstoffe und der Elutionsreihenfolge als DNA-mSTV-Doppelhantel **47** identifiziert. Ebenfalls ließ sich als weiterer Eluent in Peak IV die Nanodoppelhantel **48** vermuten, die einen zu **47** annähernd identischen hydrodynamischen Radius aufweist. Die Integration der Fläche unter Peak IV ergab einen Anteil der DNA-mSTV-Nanodoppelhanteln von $18.8\% \pm 4.2\%$.

Peak V wurde der vollständig assemblierten hybriden DNA-mSTV-Y-Tripelhantel **3** zugeordnet. Die Ausbeute für die Assemblierung von **3** lag bei $7.5\% \pm 5.1\%$.

Die Faktionen II, III, IV und V wurden in anschließenden pAF4-Läufen der DNA-mSTV-Y-Tripelhantel **3** gesammelt, umgepuffert, aufkonzentriert und quantifiziert. Erneut erwies sich die Quantifizierung wegen der geringen Probemengen als sehr ungenau. Bei der folgenden ndPAGE mit anschließender Geldokumentation mit dem Fluoreszenzbildgerät ließen sich, daher erneut keine Banden der DNA-mSTV-Y-Tripelhantel oder Teilstrukturen von **3** erkennen (Daten nicht gezeigt).

Das in *Abbildung 2.60* gezeigte aAF4-Fraktogramm ließ die erfolgreiche Assemblierung von $7.5\% \pm 5.1\%$ der hybriden DNA-mSTV-Y-Tripelhantel **3** aus den eingesetzten Konjugatbausteinen erkennen. Große Anteile der eingesetzten DNA-mSTV-Monokonjugate (**32b** und **32d**) und -Bikonjugate (**33a**) assemblierten zu hantelförmigen Nanostrukturen (**45** und **46**). Daraus wurde deutlich, dass die Assemblierung einer sterisch weniger anspruchsvollen Struktur gegenüber der DNA-mSTV-Y-Tripelhantel deutlich favorisiert wurde. Bei der Assemblierung von **3** ist im Vergleich zu den Nanodoppelhanteln **1** und **2** gesteigerte elektrostatische Abstoßung und sterische Hinderung am zentralen Konjugatmonomer zu erwarten, was sich als Ursache für die niedrigen Anteile vollständig assemblierter DNA-mSTV-Y-Tripelhantel vermuten lässt.

2.2.6 Einfluss von Furchen-Bindern auf die Nanostruktur Assemblierung

Die Ausbeuten von $16\% \pm 3.9\%$ bei der DNA-mSTV-Doppelhantel **1**, $38.2\% \pm 5.4\%$ DNA-mSTV-Doppelhantel **2** und $7.5\% \pm 5.1\%$ bei der DNA-mSTV-Y-Tripelhantel **3** sollten gesteigert werden. Durch Variation der Puffer und Temperaturprogramme im PCR-Cycler konnte der Anteil der vollständig assemblierten Nanostrukturen jedoch nicht weiter gesteigert werden.

Darum sollte die Hybridisierung zwischen den DNA-mSTV-Konjugaten stabilisiert werden und damit das Reaktionsgleichgewicht auf die Seite der vollständig assemblierten Strukturen verschoben werden.

Die Stabilisierung der Hybridisierung der Oligonucleotide in den supramolekularen DNA-mSTV-Nanostrukturen **1**, **2** und **3** sollte durch die zusätzliche Bindung von kleinen^[197] oder großen^[198] Furchenbindern^[199] gesteigert werden. Alternativ sollten die hybridisierten Oligonucleotiden mittels eines Furocumarins^[200-201] durch photochemische Addition kovalent verbunden werden.

Das unter *Abbildung 2.61* dargestellte, natürliche Furocumarin 8-Methoxy-Psoralen (8-MOP) wurde zur kovalenten Verknüpfung der hybridisierten Oligonucleotide in den DNA-mSTV-Nanostrukturen ausgewählt. Das 8-MOP reagiert in einer [2 + 2]-Cycloaddition zwischen Thyminen in der 5'-TA-3'-Sequenz und 5'-AT-3'-Sequenz eines dsOligonucleotids bei UV-Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 320-400 nm.^[202]

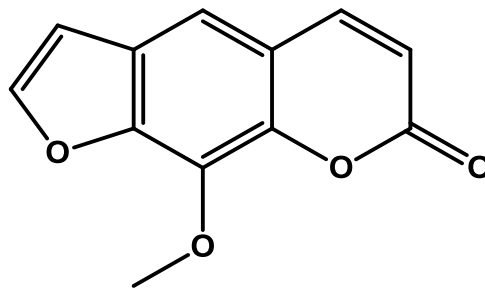


Abbildung 2.61: Struktur des Furocumarins 8-Methoxy-Psoralen (8-MOP).

Zur Etablierung der kovalenten, photochemische Verknüpfung von DNA-STV-Konjugaten wurde zunächst die DNA-mSTV-Hantel **38** (siehe 2.2.2) mittels 8-MOP bei einer Wellenlänge von 366 nm kovalent verknüpft. Bei der anschließenden ndPAGE-Charakterisierung zeigte sich, dass in Folge der UV-Bestrahlung mSTV denaturierte (Daten nicht gezeigt). Die dabei gebildeten Proteinaggregate konnten nicht oder nur als verschmierte Banden an der Oberkante des ndGels in die Gelmatrix wandern. Darum wurde die kovalente Verknüpfung der hybridisierten Oligonucleotide in den supramolekularen Nanostrukturen nicht weiter untersucht.

Alternativ sollte die Hybridisierung der Konjugatbausteine in den DNA-mSTV-Nanostrukturen **1**, **2** und **3** durch Furchenbinder stabilisiert werden. Furchenbinder können an der 1.2 nm breiten kleinen Furche oder an der 2.2 nm breiten großen Furche einer DNA-Doppelhelix binden. Höhere Bindeaffinitäten sind für Bindungen zur kleinen Furche mit Affinitäten von $K_a \approx 1 \cdot 10^7$ bis $K_a \approx 1 \cdot 10^9$ beschrieben.^[203] Basierend auf die höheren, erreichbaren Bindeaffinitäten wurden kleine Furchenbinder für die Steigerung der vollständigen Assemblierung der DNA-mSTV-Nanostrukturen ausgewählt. Kleine Furchenbinder sind planare, polyaromatische Moleküle, die in wässriger Lösung in einer halbmondförmigen Konformation vorliegen. Die Bindung zur kleinen Furche der Doppelhelix wird mittels hydrophoben und van der Waals-Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet. Besonders stabile Bindungen werden dabei zu A/T-reichen Oligonucleotidsequenzen ausgebildet.^[204] Die höchsten Bindeaffinitäten können mit sequenzspezifischen Bindern für die kleine Furche erreicht werden.^[205]

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Steigerung der vollständigen Assemblierung der supramolekularen DNA-mSTV-Nanostrukturen **1**, **2** und **3** F-Sequenz-Oligonucleotide verwendet für die keine spezifischen Furchenbinder zur Verfügung standen. Darum wurde im Folgenden für die unspezifische Stabilisierung der Hybridisierung in den supramolekularen DNA-mSTV Nanostrukturen der natürliche kleine Furchenbinder Netropsin und der synthetische kleine Furchenbinder Hoechst 33342 verwendet.

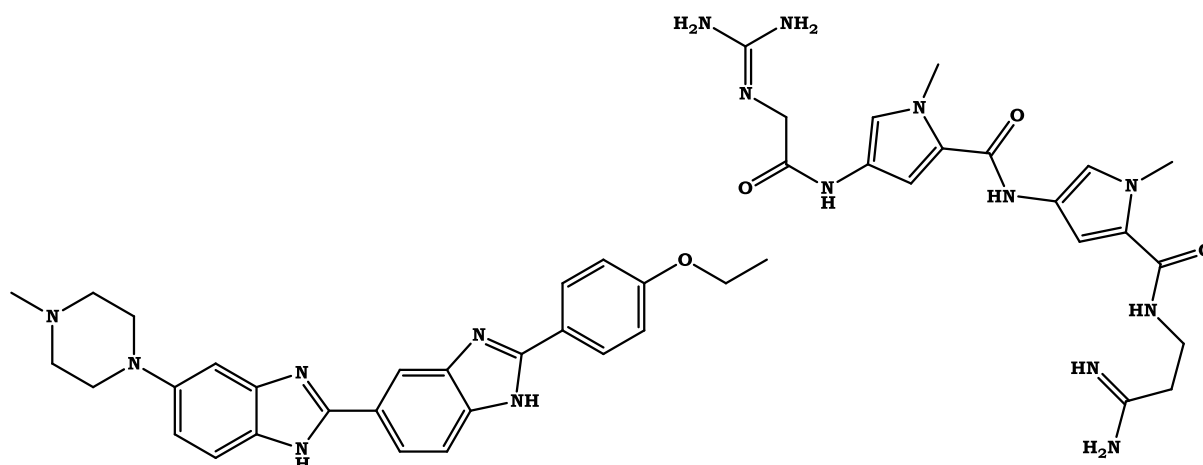


Abbildung 2.62: Strukturen von Hoechst 33342 (links) und Netropsin (rechts).

Als erstes wurde die Stabilisierung der Hybridisierung der Konjugatbausteine in der DNA-mSTV-Doppelhelix **2** untersucht. Die Veränderung der Anteile der Produkte der Assemblierung (siehe *Abbildung 2.58*) wurde mittels aAF4 charakterisiert. Dafür wurden die Doppelhelixen analog zu 2.2.4 assembliert. Nach der Assemblierung wurden der Nanostrukturlösung acht Äquivalente in DMF gelöstes Hoechst 33342 oder in PBS gelöstes Netropsin zugegeben und weitere 30 min bei RT inkubiert.

Der Einfluss von Hoechst 33342 auf die Assemblierung der DNA-mSTV-Doppelhantel **2** ist im AF4-Fraktogramm in *Abbildung 2.63* gezeigt.

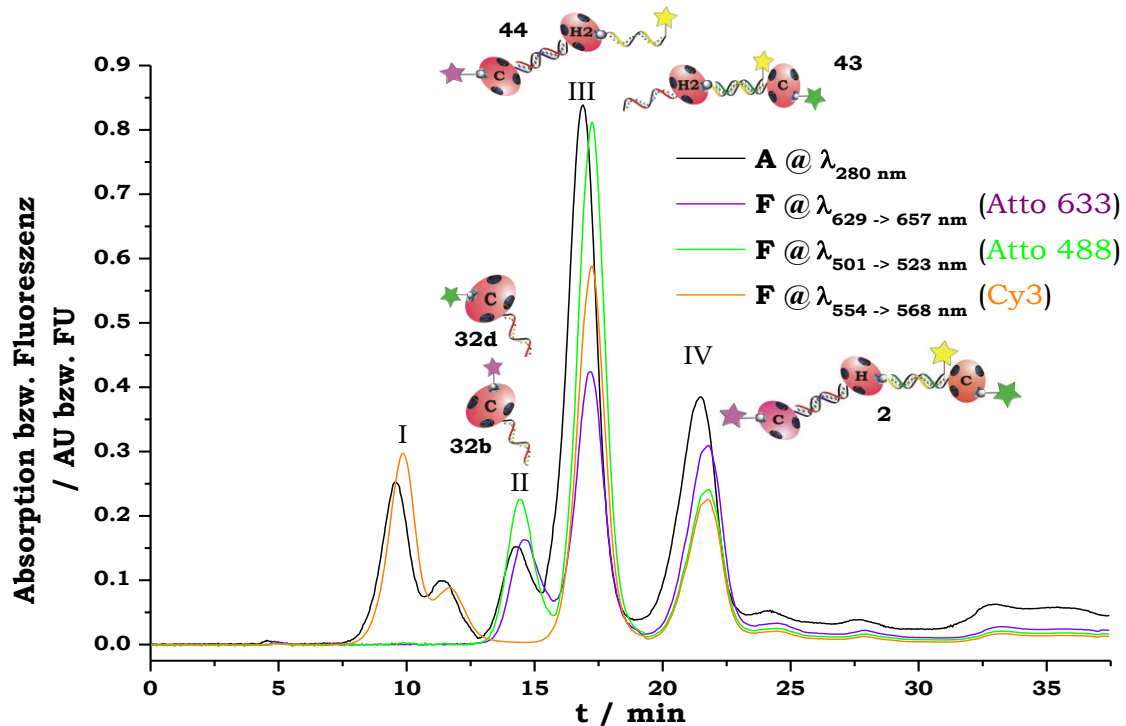


Abbildung 2.63: *aAF4*-Fraktogramm der DNA-mSTV-Doppelhantel **2** nach Inkubation mit Hoechst 33342; detektiert bei $\lambda_{Abs} = 280$ nm, $\lambda_{Abs} = 501$ nm mit $\lambda_{Em} = 523$ nm (**Atto 488**), $\lambda_{Abs} = 554$ nm mit $\lambda_{Em} = 568$ nm (**Cy3**) und $\lambda_{Abs} = 629$ nm mit $\lambda_{Em} = 657$ nm (**Atto 633**); Peak I: bF10-Cy3, Peak I: bF10-Cy3, Peak II: Monokonjugate **32b** und **32d**, Peak III: Nanohanteln **43** und **44** und Peak IV: der Nanodoppelhantel **2**.

Im Fraktogramm in *Abbildung 2.63* lassen sich vier Peaks erkennen, deren Zuordnung analog zum Fraktogramm der DNA-mSTV-Doppelhantel **2** in *Abbildung 2.58* erfolgte.

Peak I wurde nicht gebundenem bF10-Cy3 Oligonucleotid zugeordnet.

Den Eluenten in Peak II wurde die Monokonjugate **32b** und **32d** zugeordnet. Die Integration der Fläche unter Peak II ergab einen Anteil von $5.8\% \pm 3.1\%$ der nicht-hybridisierten DNA-mSTV-Konjugatmonomere.

Peak III wurde den Nanohanteln **43** und **44** zugeordnet. Daraus ließ sich ein Anteil von $76.3\% \pm 5.4\%$ der DNA-mSTV-Nanohanteln nach dem Assemblieren bestimmen.

Peak IV wurde als Nanodoppelhantel **2** identifiziert. Die Integration der Fläche unter Peak IV ergab einen Anteil der DNA-mSTV-Nanodoppelhantel von $17.9\% \pm 4.3\%$.

Das in *Abbildung 2.63* gezeigte AF4-Fraktogramm ließ erneut die erfolgreiche Assemblierung der DNA-mSTV-Doppelhantel **2** erkennen. Im Vergleich zur Abwesenheit von Höchst 33342 sanken die Anteile der Doppelhantel **2** in den Fraktionen der *aAF4* von $38.2\% \pm 5.4\%$ auf $17.9\% \pm 4.3\%$. Der Anteil der nicht

hybridisierten Monokonjugate **32b** und **32d** in den Fraktionen der aAF4 sank zudem unter Verwendung von Höchst 33342 von $16.1\% \pm 4.2\%$ auf $5.8\% \pm 3.1\%$. Folglich ließ sich im Vergleich zur Abwesenheit von Höchst 33342 ein Anstieg der Anteile von DNA-mSTV-Hanteln **43** und **44** in den Fraktionen der aAF4 von $47.1\% \pm 2.8\%$ auf $76.3\% \pm 5.4\%$ beobachten. Es wurde jedoch auch deutlich, dass die Verwendung von Hoechst 33342 nicht zur Assemblierung größerer Anteile der vollständigen assemblierten Nanodoppelhantel **2** führte. Der kleine Furchenbinder stabilisierte die Hybridisierung der Oligonucleotide also hauptsächlich in den teilassemblierten DNA-mSTV-Hanteln, was sich an der Abnahme der Anteile nicht-hybridisierter Konjugate und der Nanodoppelhantel **2** erkennen ließ. Das Reaktionsgleichgewicht wurde nicht zur Seite der DNA-mSTV-Nanodoppelhantel verschoben, sondern die thermodynamisch günstigsten Nanostrukturen wurden zusätzlich stabilisiert und damit in ihrer Assemblierung begünstigt. Hoechst 33342 stabilisierte zwar die Hybridisierung von einem DNA-mSTV-Konjugat zu einem zweiten DNA-mSTV-Konjugat, jedoch blieb die Bindung eines dritten DNA-mSTV-Konjugats weiterhin vermutlich durch elektrostatische Abstoßungen und sterische Hinderungen gehemmt. Das thermodynamische Gleichgewicht wurde somit zu den teilassemblierten DNA-mSTV-Hanteln verschoben.

Bei der Verwendung des zweiten kleinen Furchenbinders Netropsin ließ sich ein ähnliches, jedoch weniger ausgeprägtes Phänomen bei der aAF4 erkennen wie es bei Hoechst 33342 beschrieben wurde (Daten nicht gezeigt). Das thermodynamische Gleichgewicht wurde von Netropsin ebenfalls zu den teilassemblierten DNA-mSTV-Hanteln **43** und **44** verschoben.

Da die Anteile der vollständig assemblierten DNA-mSTV-Nanodoppelhantel **2** mittels Furchenbinder nicht gesteigert werden konnten, wurde die Verwendung von Furchenbindern bei den Nanostrukturen **1** und **3** nicht weiter untersucht.

2.2.7 Assemblierung der Y-DNA-Motiv-DNA-mSTV-Nanostruktur **49**

Für die Y-DNA-Motiv-DNA-mSTV-Nanostrukturen **49** wurde ein alternatives Design für die Assemblierung gewählt. Wie in *Abbildung 2.64* dargestellt, sollten zunächst, wie von Li *at al.*^[155] beschrieben, drei Oligonucleotide zum Y-DNA-Motiv **50** assembliert werden. Dann sollte an die drei überhängenden F9-Oligonucleotidsequenzen von **50** das Monokonjugat **32b** hybridisiert werden. Die Assemblierung der Nanostruktur **49** sollte zunächst mittels ndPAGE analysiert werden und nach erfolgreichem Aufbau der Gesamtstruktur mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM) charakterisiert werden. Die vollständige Nomenklaturtabelle ist in *Kapitel 8* abgebildet.

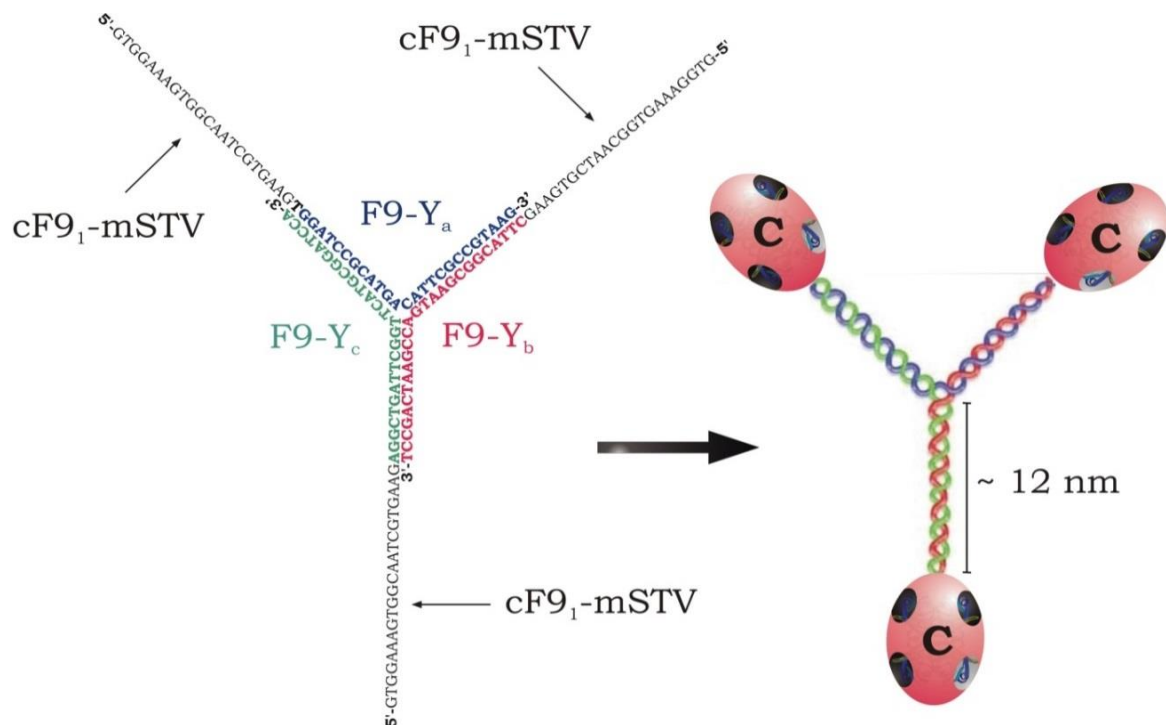


Abbildung 2.64: Schematische Darstellung einer Y-DNA-Motiv-DNA-mSTV-Nanostruktur **49** assembliert aus einem Y-DNA-Motiv **50** aus den Oligonucleotiden **F9-Y_a**, **F9-Y_b** und **F9-Y_c** (links), an dessen 22 Basenpaaren-langen, überhängenden die Konjugatmonomere **32b** hybridisiert wurde (rechts).

Die von Li *at al.*^[155] beschriebenen Sequenzen für das Y-DNA-Motiv wurden jeweils am 5'-Ende um die F9-Sequenz ergänzt und kommerziell erworben. Zunächst wurde die Reinheit der Oligonucleotide mittels denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese (dPAGE) in einem 15% Harnstoffgel analysiert (siehe *Abbildung 7.9* im Anhang). Die Oligonucleotidreinheit erschien für die folgende Assemblierung des Y-DNA-Motiv **50** ausreichend. Die Oligonucleotide F9-Y_a, F9-Y_b und F9-Y_c wurden quantifiziert und im nächsten Schritt wurde die Hybridisierung der einzelnen Arme des Y-DNA-Motivs F9-Y_a, F9-Y_b und F9-Y_c mittels ndPAGE in einem 6% TBE-Gel analysiert (Daten nicht gezeigt).

Für die ndPAGE-Charakterisierung des Y-DNA-Motiv-DNA-mSTV-Nanostrukturen **49** wurden DNA und DNA-mSTV-Nanostrukturen nach der Tabelle in *Abbildung 2.65* assembliert. Dafür wurden zunächst die F9-Y_a-, F9-Y_b- und F9-Y_c-Oligonucleotide in TE-Mg vereint und auf 95 °C erhitzt. Die Oligonucleotidlösung wurde dann für 30 min in einem Eisbad gekühlt. Danach wurden zu den assemblierten DNA-Motiven die komplementären F9-mSTV-Monokonjugate **32b** und als Kontrolle in Spur 9 nicht komplementäres **32a** gegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Dann wurde jeweils 1.0 pmol der Proben in die Taschen des in *Abbildung 2.65* gezeigten 6% TBE-Gels geladen.

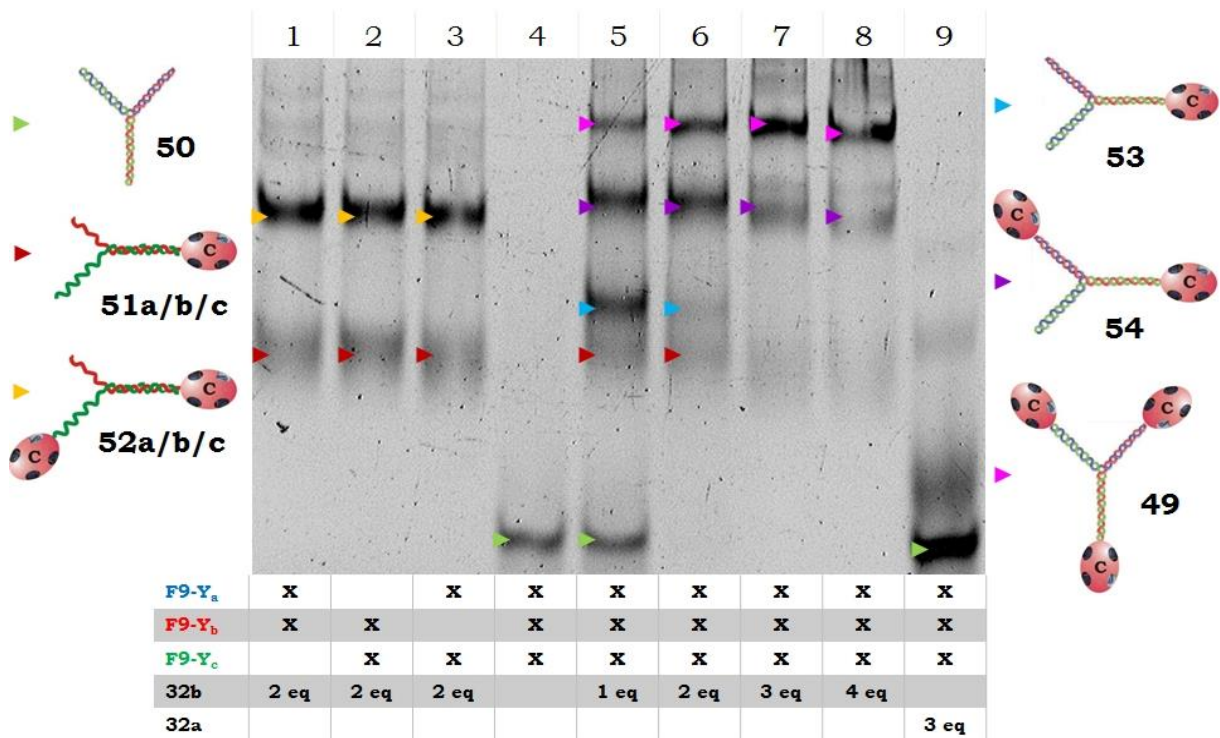


Abbildung 2.65: 6% ndPAGE in TBE-Mg von der Y-DNA-Motiv-DNA-mSTV Nanostruktur **49** mit anschließender Sybr Gold Färbung; **Spur 1:** **F9-Y_a** + **F9-Y_b** + 2 eq **32b**, **Spur 2:** **F9-Y_b** + **F9-Y_c** + 2 eq **32b**, **Spur 3:** **F9-Y_a** + **F9-Y_c** + 2 eq **32b**, **Spur 4:** **F9-Y_a** + **F9-Y_b** + **F9-Y_c** **Spur 5:** **F9-Y_a** + **F9-Y_b** + **F9-Y_c** + 1 eq **32b**, **Spur 6:** **F9-Y_a** + **F9-Y_b** + **F9-Y_c** + 2 eq **32b**, **Spur 7:** **F9-Y_a** + **F9-Y_b** + **F9-Y_c** + 3 eq **32b**, **Spur 8:** **F9-Y_a** + **F9-Y_b** + **F9-Y_c** + 4 eq **32b** und **Spur 9:** **F9-Y_a** + **F9-Y_b** + **F9-Y_c** + 3 eq **32a**.

Bei dem in *Abbildung 2.65* gezeigten ndPAGE-Analyse lässt sich der Aufbau des Y-DNA Motivs aus F9-Y_a, F9-Y_b und F9-Y_c und die Hybridisierung von bis zu drei cF9-mSTV-Monokonjugaten gut erkennen.

In Spur 1 lassen sich zwei Banden erkennen. Der elektrophoretisch mobileren Bande (▶) wurde die assemblierten Nanostruktur **51a** aus den Armen des Y-DNA-Motivs F9-Y_a und F9-Y_b sowie einem daran hybridisierten DNA-mSTV-Monokonjugat **32b** zugeordnet. Der Hauptbande (►) wurde die Nanostruktur **52a** aus hybridisierten F9-Y_a und F9-Y_b und zwei daran assemblierten **32b** zugeordnet.

Die Zuordnung in den Spuren 2 und 3 erfolgte analog zu Spur 1, wobei die Nanostrukturen sich in der Oligonucleotidsequenz des Y-DNA-Motivs unterschieden. In Spur 2 wurden die Banden **51c** (▶) und **52c** (►) und in Spur 3 **51b** (▶) und **52b** (►) zugeordnet.

In Spur 4 ist eine Bande (►) zu erkennen, der aufgrund der hohen Mobilität in Folge des kleinen m/z-Verhältnisses, das vollständig assemblierten Y-DNA-Motiv **50** zugeordnet wurde. Ein vorhergehendes Gel (Daten nicht gezeigt) zur Kontrolle der Hybridisierung der Arme des Y-DNA-Motivs F9-Y_a, F9-Y_b und F9-Y_c zeigte, dass Fragmente von **50** eine höhere Mobilität im Gel aufwiesen und darum unter den Bedingungen, des in *Abbildung 2.65* gezeigten Gels, aus dem Gel gelaufen waren. Diese Elektrophoresebedingungen mussten jedoch zur hinreichenden Auftrennung von **49** und **51** bis **54** gewählt werden.

In Spur 5 lassen sich fünf Banden erkennen. Der elektrophoretisch mobilsten Bande (▶) wurde analog zur Spur 4 **50** zugeordnet. Der nächste Bande (►) wurde analog zu den Spuren 1 bis 3 Nanostruktur **51a/b/c** aus zwei Armen des Y-DNA-Motivs und einem daran hybridisierten DNA-mSTV-Monokonjugat **32b** zugeordnet. Der darauf folgenden Bande (►) wurde die Nanostruktur **53** zugeordnet, welche sich aus dem vollständig assemblierten Y-DNA-Motiv mit einem daran hybridisierten **32b** aufbaut. Der nächsten Bande (►) wurde die Nanostruktur **54** aufgebaut aus **50** und zwei daran hybridisierten **32b** zugeordnet. Der Bande mit geringster elektrophoretischer Mobilität (►) wurde die vollständig assemblierte Y-DNA-Motiv-DNA-mSTV-Nanostruktur **49** zugeordnet. **49** zeigte bei der ndPAGE aufgrund des größten hydrodynamischen Volumens die niedrigste Mobilität in der Gelmatrix.

Spur 6 wurde mit identischen Probenstandteilen wie Spur 5 beladen. Im Gegensatz zu Spur 5 wurden hier zwei Äquivalente der DNA-mSTV-Monokonjugate **32b** eingesetzt. Als Folge der Verdopplung der Konjugatmenge bei der Assemblierung mit dem Y-DNA-Motiv **50** lässt sich in der Spur 6 keine Bande von **50** (▶) ohne daran hybridisierter DNA-mSTV-Konjugate erkennen. Alle weiteren Banden wurden analog zur Spur 5 zugeordnet. Infolge der gesteigerte Konjugatmenge wurden zu großen Anteilen Nanostrukturen **54** (►) mit zwei hybridisierten **32b** und vollständig assemblierte **49** (►) gebildet, wohingegen die Anteile von **51a/b/c** (►) und **53** (►) sanken.

In Spur 7 wurde das Y-DNA-Motiv **50** vor der ndPAGE mit stöchiometrischen Mengen DNA-mSTV-Monokonjugat **32b** inkubiert. Die Bandenzuordnung erfolgte erneut analog zu den Spuren 5 und 6. Infolge der stöchiometrisch gleichen Anteile **32b** zu den komplementären Bindungsstellen an **50** assemblierten große Anteile der Konjugatbausteine zur Y-DNA-Motiv-DNA-mSTV-Nanostruktur **49** (►). Zusätzlich lässt sich die Bande von **54** (►) erkennen, wo zwei DNA-mSTV-Konjugate an **50** hybridisierten. Daraus wird deutlich, dass nicht alle Konjugatbausteine vollständig zu **49** assemblierten. Leichte Fehler bei der Quantifizierung könnten zu diesen Ungenauigkeiten in der Stöchiometrie geführt haben.

In Spur 8 wurde das Y-DNA-Motiv **50** mit einem Überschuss von vier Äquivalenten **32b** vor der ndPAGE inkubiert. Analog zu Spur 7 lassen sich die Bande von **54** (►) und **49** (►) zuordnen. Es wird deutlich, dass ein Überschuss komplementärer DNA-mSTV-Konjugate nicht zur vollständigen Assemblierung von **49** führt.

In Spur 9 wurde als Kontrolle das Y-DNA-Motiv **50** mit drei Äquivalenten nicht komplementärem DNA-mSTV-Monokonjugat **32a** vor der ndPAGE inkubiert. Es lässt sich die Bande (▶) des Y-DNA-Motivs **50** zuordnen. Aus dieser Negativkontrolle wird deutlich, dass nicht komplementäre DNA-mSTV-Konjugate nicht an **50** binden.

Die in *Abbildung 2.65* gezeigte ndPAGE-Analyse zeigt deutlich die erfolgreiche Assemblierung der Y-DNA-Motiv-DNA-mSTV-Nanostruktur **49** (►). Bei der

Inkubation des Y-DNA-Motivs **50** mit drei Äquivalenten komplementären DNA-mSTV-Konjugat hybridisierten $89\% \pm 9\%$ der Konjugatbausteine. $11\% \pm 7\%$ der Konjugatbausteine hybridisierten zur teilassemblierten Nanostruktur **54**. Die großen Anteile des vollständig assemblierten **49** erlaubten die weitere Charakterisierung der Nanostruktur mittels AFM-Messungen.

Für die Charakterisierung von Y-DNA-Motiv-DNA-mSTV-Nanostruktur **49** mittels AFM wurden $5.0 \mu\text{L}$ 500 nmol/L **49** in TE-Mg auf eine unmittelbar vorher aktivierte Glimmer-Oberfläche gegeben und für 1 h in einer Feuchtkammer bei RT inkubiert. Danach wurde das Glimmer-Plättchen zehn Mal mit $100 \mu\text{L}$ H_2O gespült. Die AFM-Bilder von auf der Glimmer-Oberfläche adsorbierten **49** an Luft, sind in *Abbildung 2.66* dargestellt.

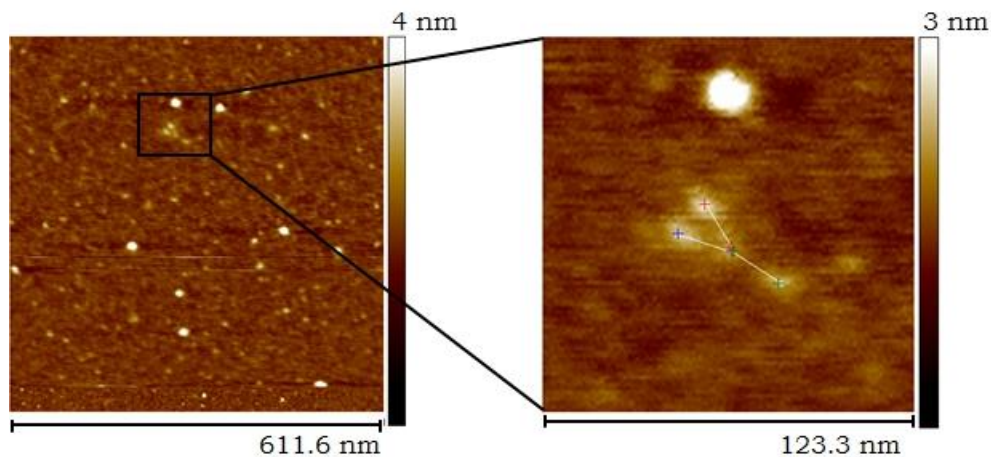


Abbildung 2.66: AFM-Bild der assemblierten und an Glimmer adsorbiert Y-DNA-Motiv-DNA-mSTV-Nanostruktur **49** an Luft, aufgenommen von Frau Dr. Meyer. Im rechten AFM-Bild wurde der Abstand zwischen den erhöhten Punkten (+, + und +) gemessen, die das Y-DNA-Motiv aufspannen. Dabei wurden Abstände von 16 bis 18 nm zwischen den Punkten bestimmt. Für den Abstand zwischen den cF9-mSTV-Konjugaten **32b** in der Y-DNA-Motiv-DNA-mSTV-Nanostruktur wurde ein theoretischer Abstand von ca. 15 nm berechnet ($26 \text{ bp} \cdot 0.34 \text{ nm} + 2.5 \text{ nm}$ Linker). Damit entspricht der gemessene Abstand von 16 bis 18 nm von den Proteinmittelpunkten (+, + und +) zum Mittelpunkt der Nanostruktur **49** den theoretisch berechneten Werten.

Ein Beispiel für eine bei der AFM aufgenommene Y-DNA-Motiv-DNA-mSTV-Nanostruktur ist rechts in *Abbildung 2.66* gezeigt. Dabei wurden Abstände von 16 bis 18 nm zwischen den erhöhten Punkten (+, + und +) gemessen, die das Y-DNA-Motiv aufspannen. Die gemessenen Abstände sind somit gut vereinbar mit einem theoretisch berechneten Abstand von ca. 15 nm. Bei der AFM-Charakterisierung ließen sich nur sehr vereinzelt die Nanostruktur **49** auf der Glimmer-Oberfläche erkennen. Ursache dafür waren die empirisch aufwendig zu bestimmenden Bedingungen zum Immobilisieren der Nanostruktur auf der Glimmer-Oberfläche. Dafür mussten in wiederholten Messungen die optimale Stoffmenge von **49** und der Zeitraum für die Absorption auf der Glimmer-Oberfläche in Verbindung mit einer optimierten Anzahl von Waschrufen experimentell ermittelt werden. Aus Zeitmangel

konnten die AFM-Bedingungen nicht weiter optimiert werden, so dass keine AFM-Bilder mit eindeutigen Y-DNA-Motiv-DNA-mSTV-Nanostrukturen aufgenommen wurden.

2.2.8 Assemblierung der Nanostruktur 4 auf Basis von trivalentem STV

Als weitere Nanostruktur aus DNA-STV-Bausteinen sollte trivalentes STV mit drei dazu komplementären, fluoreszenzmarkierten DNA-mSTV-Monokonjugaten zu **4** assembliert werde. Wie in *Abbildung 2.67* dargestellt sollte das zentrale trivalente STV mittels eines fluoreszenzmarkierten, biotinylierten Oligonucleotid markiert werden. Die daran gebundenen DNA-mSTV-Monokonjugate sollten mit individuellen biotinylierten Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden.

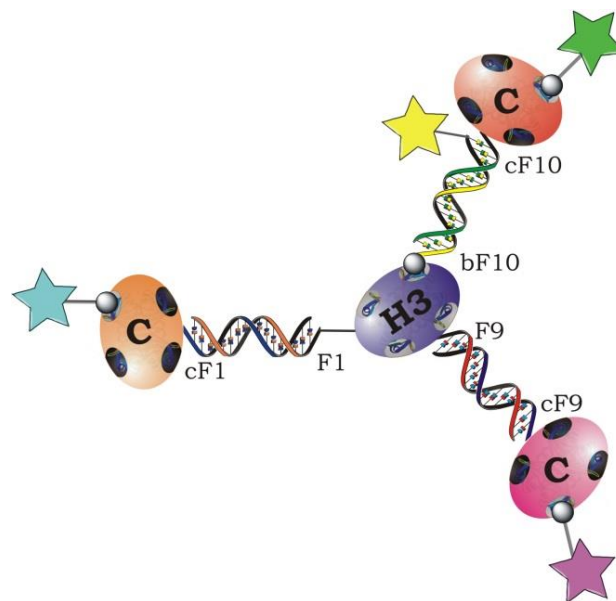


Abbildung 2.67: Schematische Darstellung der Nanostruktur **4** auf Basis von trivalentem STV assembliert aus trivalentem STV **56-Cy3**, **32b-Atto 633**, **32c-Atto 390** und **32d-Atto 488**.

Zunächst sollte wie in *Abbildung 2.68* gezeigt, trivalentes STV **56** dargestellt werden. Dafür sollte in drei Schritten jeweils ein Oligonucleotid (aF1, tF9 und bF10) an STV-TCH gebunden werden. Der erste Schritt entsprach der DNA-STV-TCH-Konjugatsynthese (siehe 2.1.1.3) mit Amino-modifiziertem F1 (aF1). Dabei sollte F1-STV-TCH-Monokonjugat **18** dargestellt werden. Nach der folgenden Anionenaustauschchromatographie sollte **18** und Thiol-modifiziertes F9 (tF9) mittels SM(PEG)₄ zum bivalenten STV **55** konjugiert werden. Nach anschließender Anionenaustauschchromatographie und Abtrennung von Konjugatdimeren mittels pAF4 sollte an **55** biotinyliertes und Cy3-markiertes F10 (bF10-Cy3) über die hochspezifische Biotin-STV-Wechselwirkung gebunden werden. Nach einer abschließenden Anionenaustauschchromatographie sollte das nun dargestellte trivalente STV **56** charakterisiert und die erfolgreiche Hybridisierung der fluoreszenzmarkierten DNA-mSTV-Konjugatmonomere **32b-Atto 633**, **32c-Atto 390** und **32d-Atto 488** an **56** mittels ndPAGE nachgewiesen werden.

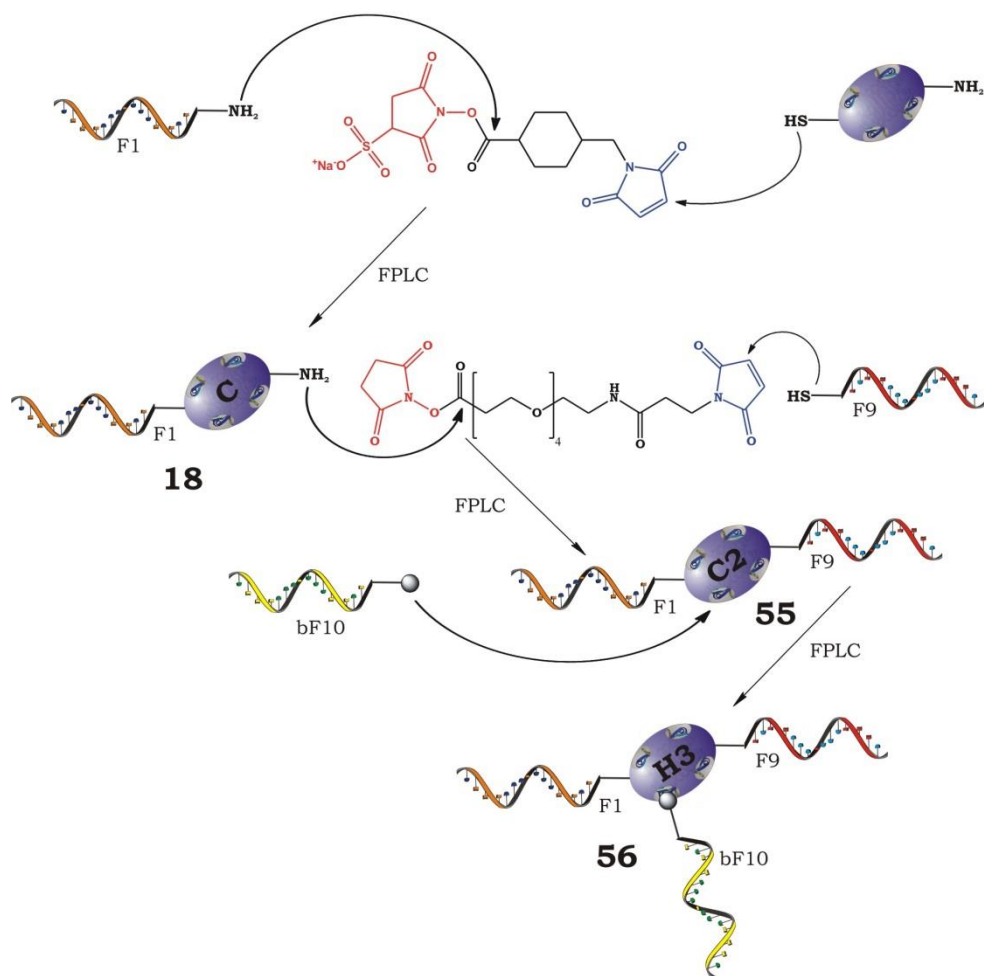


Abbildung 2.68: Schematische Darstellung der schrittweisen Synthese von trivalentem STV **56**. **1. Schritt:** Konjugatsynthese von **18** aus STV-TCH mit sSMCC verknüpft mit aF1. **2. Schritt:** Konjugatsynthese von **55** aus **18** mit SM(PEG)₄ verknüpft mit tF9 **3. Schritt:** Assemblieren von **56** aus **55** und bF10.

Der erste Schritt zur Darstellung von trivalentem STV **56**, die Konjugatsynthese, Aufreinigung und Charakterisierung von **18** entsprach dem in Kapitel 2.1.1.3 bei der DNA-STV-TCH-Konjugatsynthese beschriebenen Vorgehen.

Der zweite Schritt folgte der Konjugatsynthesevorschrift von SM(PEG)₄ verknüpften mSTV-DNA-Konjugaten. Dabei wurden 8.5 nmol **18** in 485 µL PBS mit 0.625 g SM(PEG)₄ in 15 µL DMF derivatisiert. Parallel wurden 10 nmol tF9 mit DTT reduziert. Das mit dem Crosslinker derivatisierte **18** und das aktivierte Oligonucleotid wurden dann über NAP-Säulen aufgereinigt und anschließend für die Konjugation über 16 h bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Rohprodukte der Konjugatsynthese des bivalenten STV aufkonzentriert, umgepuffert und in die FPLC injiziert. Das Anionenaustauschchromatogramm der Aufreinigung von **55** ist in *Abbildung 2.69* dargestellt.

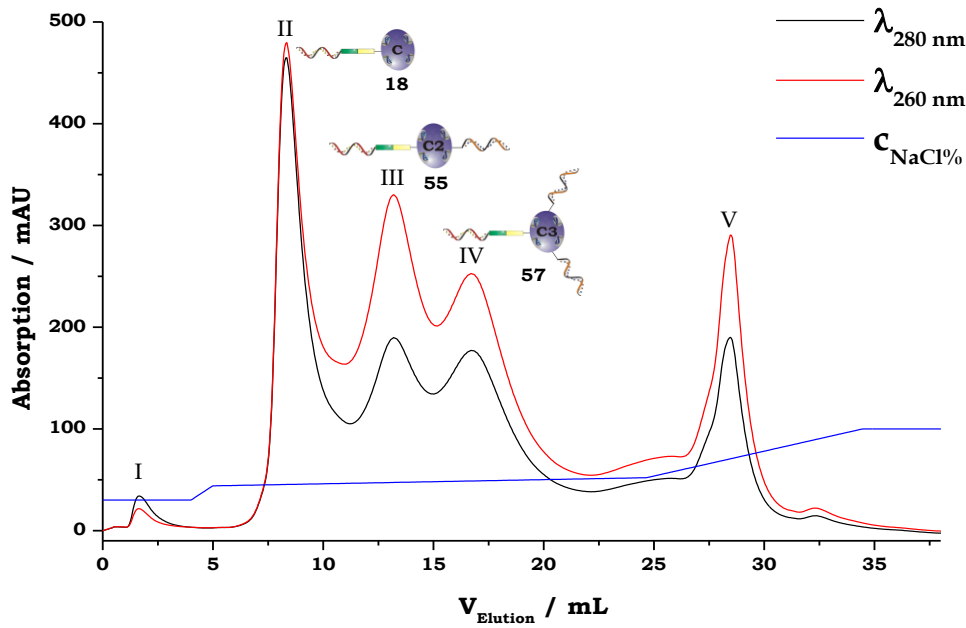


Abbildung 2.69: Repräsentatives Anionenaustauschchromatogramm der Konjugataufreinigung von bivalentem STV **55**. Peak I) freies STV-TCH, Peak II) **18** Peak III) **55**, Peak IV) **57** und Peak V) nicht-konjugiertes tF9.

Abbildung 2.69 zeigt das Anionenaustauschchromatogramm der Konjugatsynthese von bivalentem STV **55**. Es lassen sich fünf Peaks erkennen, die anhand der Elutionsreihenfolge und ihres A_{260}/A_{280} -Verhältnis zugeordnet wurden.

Peak I wurde freiem STV-TCH zugeordnet, welches zu kleinen Anteilen durch den Zerfall von **18** (siehe dazu Diskussion von *Abbildung 2.13*) entstanden war.

Peak II wurde nicht mit tF9 konjugiertem **18** zugeordnet. Der charakteristischen A_{260}/A_{280} -Wert von ≈ 1 bestätigt die Zuordnung von Peak II zu einem DNA-STV-Monokonjugat.

Peak III wurde bivalentem STV **55** zugeordnet. Der A_{260}/A_{280} -Wert von > 1 lässt die Elution eines DNA-STV-Konjugats mit mehr als einem gebundenem Oligonucleotid vermuten.

Peak IV wurde dem DNA-STV-Trikonjugat **57** zugeordnet, welches aus STV-TCH mit einem daran gebundenem F1- und zwei F9-Oligonucleotiden aufgebaut ist. Die Peaktrennung zwischen Peak III und Peak IV war unzureichend. Durch die Wahl eines langsamer ansteigenden NaCl-Gradienten oder der pH-Variation der flüssigen Phase ließ sich die Peaktrennung nicht steigern. Ursache dafür war die geringe Differenz im m/z -Verhältnisses zwischen dem Bi- (**55**) und Trikonjugat (**57**). Eine ähnlich geringe Peaktrennung zwischen Bi- und Trikonjugat konnte beispielsweise auch bei der Konjugatsynthese von DNA-mSTV beobachtet werden (siehe *Abbildung 2.17*).

Peak V wurde nicht-konjugiertem tF9 zugeordnet. Bei vergleichbaren FPLC-Läufen (siehe *Abbildung 2.12*) eluierte das ungebundene Oligonucleotid bei einer ähnlichen NaCl-Konzentration.

Die Fraktionen unter den Peaks III und IV wurden jeweils gesammelt, umgepuffert, aufkonzentriert und quantifiziert. Dabei ließen sich isolierte Ausbeuten von $17.1\% \pm 4.8\%$ für das bivalente STV **55** und $32.7\% \pm 5.4\%$ für **57** bestimmen. Die Ausbeute von **55** war signifikant geringer, weil nur Fraktionen aus dem Zentrum von Peak III vereint wurden, um die Anteile von Verunreinigungen durch **18** und **57** möglichst gering zu halten.

Die Charakterisierung des bivalenten STV **55** erfolgte mittels ndPAGE. Dabei sollte primär die Hybridisierung mit komplementären DNA-STV-Konjugaten untersucht werden. Für die ndPAGE wurden jeweils 2.0 pmol der Konjugate **18**, **55** und **57** in das Gel geladen. Zur Kontrolle der Hybridisierung mit komplementären Konjugaten wurde 2.0 pmol **18** mit einem Äquivalenten cF1-nSTV-Monokonjugat (**5d**) und Jeweils 2.0 pmol **55** und **57** wurden je mit einem Äquivalenten cF9-nSTV-Monokonjugat (**5b**), **5d** und vereinter **5b** und **5d** in PBS-Mg für 30 min bei RT inkubiert. Dann wurden alle Probenlösungen mit 6x Orange DNA Loading Dye gemischt und in die Taschen eines 7.5% ndGels geladen. Abweichend zum ndPAGE-Standardprotokoll wurde der Laufpuffer für das in *Abbildung 2.70* gezeigte Gel um 12.5 mmol/L Magnesiumacetat ergänzt und die Laufzeit bei 150 V auf 90 min verlängert.

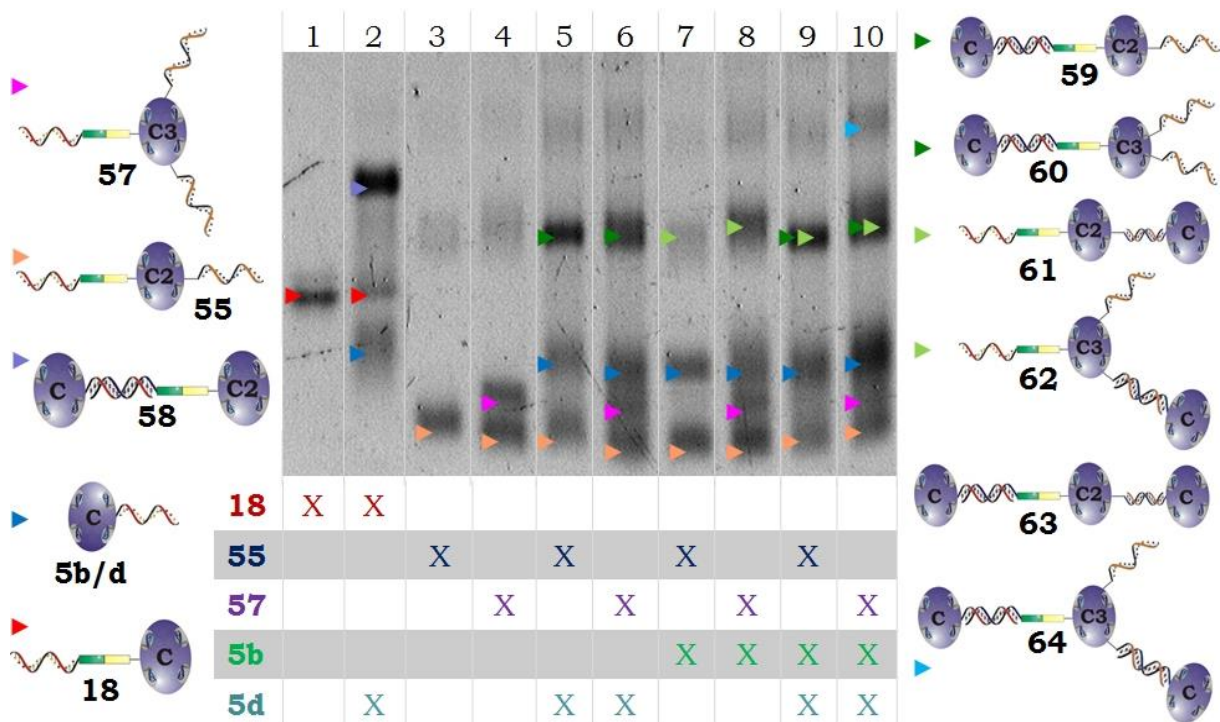


Abbildung 2.70: 7.5% ndPAGE von F1-STV-TCH-Monokonjugat **18** und den Bi- und Trikonjugaten **55** und **57** mit anschließender Sybr Gold Färbung; **Spur 1:** **18**, **Spur 2:** **18** + cF1-nSTV-Monokonjugat **5d**, **Spur 3:** **55**, **Spur 6:** **57**, **Spur 7:** **55** + **5d**, **Spur 8:** **57** + **5d**, **Spur 9:** **55** + cF9-nSTV-Monokonjugat **5b**, **Spur 10:** **57** + **5b**, **Spur 11:** **55** + **5b** + **5d** und **Spur 11:** **57** + **5b** + **5d**.

Bei der in *Abbildung 2.70* gezeigten ndPAGE von F1-STV-TCH-Monokonjugat **18** und den Bi- und Trikonjugaten **55** und **57** erfolgte eine Peakzuordnung nach der in Kapitel 2.1.1.2 aufgestellten und in *Abbildung 2.10* dargestellten Annahme und anhand des elektrophoretischen Verhaltens der DNA-STV-Modellkonjugate aus *Abbildung 2.6*. Danach führt die kovalente Bindung eines Oligonucleotids über die den C-terminalen Cysteinrest von STV-TCH zu einem Anstieg der elektrophoretischen Mobilität. Werden weitere Oligonucleotide an **18** gebunden sinkt die Mobilität mit jeder weiteren Oligonucleotidbindung.

In Spur 1 ist eine Bande (▶) zu erkennen, der F1-STV-TCH-Monokonjugat **18** zugeordnet wurden.

In Spur 2 wurde das F1-STV-TCH-Monokonjugat vor der ndPAGE mit einem komplementären cF1-nSTV-Monokonjugat **5d** inkubiert. Infolge dessen lassen sich die Banden der Monokonjugate **5d** (▶) und **18** (▶) zuordnen. Es lässt sich vermuten, dass die höhere elektrophoretische Mobilität von **5d** gegenüber **18** durch die Derivatisierung des nSTV von **5d** verursacht wird. Schon bei dem Vergleich der Mobilität von nSTV und nSTV-sSMCC (siehe *Abbildung 2.38*) ließ sich beobachten, dass die Derivatisierung mit Crosslinker zu einer Steigerung der elektrophoretischen Mobilität führte. Der wenigsten mobilen Hauptbande in Spur 2 wurde die Nanodoppelhantel **58** hybridisiert aus **18** und **5d** zugeordnet.

In Spur 3 ist eine Bande (▶) zu erkennen, der das DNA-STV-TCH-Bikonjugat **55** zugeordnet wurde. Hieraus lässt sich erkennen, dass **55** erfolgreich dargestellt und trotz der mäßigen Peaktrennung bei der FPLC in *Abbildung 2.69* erfolgreich aufgereinigt wurde. Im Vergleich zur Bande von **18** zeigt die Bande von **55** eine erhebliche Steigerung der elektrophoretischen Mobilität. Mögliche Ursachen für diese Mobilitätssteigerung ist die Derivatisierung von **18** mit SM(PEG)₄ und der Anstieg des m/z-Verhältnisses bei geringerer Steigerung des hydrodynamischen Volumens (siehe Diskussion zu *Abbildung 2.14*) infolge der Bindung eines zweiten Oligonucleotids.

In Spur 4 sind zwei Banden zuerkennen, von denen der elektrophoretisch mobileren Bande (▶) dem DNA-STV-TCH-Bikonjugat **55** und der anderen Bande (▶) das DNA-STV-TCH-Trikonjugat **57** zugeordnet wurde. **57** konnte nur unvollständig von **55** getrennt werden. Im FPLC-Chromatogramm in *Abbildung 2.69* lässt sich erkennen, dass zwischen den Bi- und Trikonjugaten keine ausreichende Peaktrennung erreicht wurde. Die starke Verunreinigung von **55** in **57** erklärt die hohe Ausbeute des Trikonjugats im Vergleich zum Bikonjugat, da bei der Quantifizierung von **57** große Anteile von **55** mitbestimmt wurden.

In Spur 5 wurden zuvor miteinander inkubierte DNA-STV-TCH-Bikonjugat und cF1-nSTV-Monokonjugat **5d** aufgetragen, deren Banden (▶) **55** und (▶) **5d** analog zu den Spuren 3 und 2 zugeordnet wurden. Der Bande (▶) mit niedrigster elektrophoretischer Mobilität wurde der Nanohantel **59** zugeordnet, deren hydrodynamisches Volumen die Passierfähigkeit durch das Gel im Vergleich zu **55** und **5d** deutlich senkte. Analog zu den Konjugaten **18** und **55** lässt sich bei der Nanohantel **59** eine höhere Mobilität als bei **58** beobachten.

In Spur 6 wurde analog zur Spur 5 **55** durch das Trikonjugat **57** ersetzt. Erneut ließen sich die Banden der Konjugate **55** (▶), **57** (▶) und **5d** (▶) analog zu den vorherigen Spuren zuordnen. Der vierten Bande (▶) wurden infolge der Verunreinigung durch **55** die Nanohantel **59** und **60**, welche aus **5d** und **57** hybridisierte, zugeordnet

In Spur 7 wurde das Bikonjugat **55** vor der ndPAGE mit einem komplementären cF9-nSTV-Monokonjugat **5b** inkubiert. Analog zu Spur 5 wurden die Banden den Konjugaten **55** (▶) und **5b** (▶) zugeordnet. Eine dritte Bande (▶) ist in Spur 7 nur schwach zu erkennen. Dieser Bande wurde die Nanohantel **61** zugeordnet, die aus **55** und **5b** aufgebaut ist. Im Vergleich zur Nanohantel **59** assemblierte **61** zu nur sehr geringen Anteilen aus den Konjugatbausteinen. Eine mögliche Ursache für die geringere Hybridisierungseffizienz von **61** ist die schlechtere Zugänglichkeit des F9-Oligonucleotids an **55** im Vergleich zum über den C-Terminus gebundenen F1-Oligonucleotid.

Spur 8 wurde mit den zuvor miteinander inkubierten Trikonjugat **57** und cF9-nSTV-Monokonjugat **5b** beladen. Die Bandenzuordnung erfolgte analog zu Spur 6 und 7. Im Vergleich zu Spur 7 ließ sich eine deutlich intensivere Bande (▶) einer Nanohantel erkennen. Dieser wurde **62** hybridisiert aus **57** und **5b** zugeordnet. Es wird deutlich, dass die Assemblierung einer Nanohantel über das F9-Oligonucleotid mit **57** zu größeren Anteilen erfolgt als bei **55**.

In Spur 9 wurde das Bikonjugat **55** vor der ndPAGE mit komplementären cF9-nSTV-Monokonjugat **5b** und cF1-nSTV-Monokonjugat **5d** inkubiert. In der Spur lassen sich die Banden der Konjugate **55** (▶) von **5b/d** (▶) von Nanohanteln **59** und **61** zuordnen. Das Fehlen einer weiteren elektrophoretisch weniger mobilen Bande zeigte, dass die Nanodoppelhantel **63** nicht assembliert ist. Diese Beobachtung unterstützt die in Spur 7 aufgestellte Vermutung, dass an das F9-Oligonucleotid von **55** kaum komplementäres **5b** hybridisiert.

Spur 10 wurde mit den zuvor miteinander inkubierten Trikonjugat **57** und Monokonjugaten **5b** und **5d** beladen. Es lassen sich Banden analog zu Spur 9 erkennen. Zusätzlich konnte die Bande (▶) der Nanodoppelhantel **64** zugeordnet werden. Wie schon in Spur 8 beobachtet hybridisiert an **57 5b** zu größeren Anteilen erfolgreich, so dass **64** im Gegensatz zu **63** zu geringen Anteilen assemblierte.

Bei der ndPAGE-Analyse der Hybridisierung von komplementären DNA-STV-Monokonjugaten an **55** und **57** in *Abbildung 2.70* wurde die erfolgreiche Assemblierung der Nanohanteln **58** bis **62** gezeigt. Jedoch hybridisierte das cF9-nSTV-Monokonjugat zu sehr niedrigen Anteilen an **55**. Die Assemblierung der Nanodoppelhanteln **62** konnte zu nur geringen Anteilen und von **61** konnte nicht gezeigt werden. Wie schon bei den Nanostrukturen **1**, **2** und **3** ließ sich als Ursache für die abfallende Hybridisierungseffizienz bei den zunehmend komplexeren DNA-STV-Nanostrukturen sterische Hinderung und statische Abstoßung vermuten.

In einer zweiten ndPAGE-Analyse sollte die Biotin-Bindeeigenschaften des Bikonjugats **55** und des Trikonjugats **57** untersucht werden. Dafür wurden jeweils 2.0 pmol **55** und **57** und zur Charakterisierung der Biotin-Bindeeigenschaften **55** und **57**, welche zuvor mit einem bzw. vier Äquivalenten bF10-Cy3 inkubiert wurden, mit 6x Orange DNA Loading Dye gemischt. Dann wurden die Konjugatproben in die Geltaschen des in *Abbildung 2.71* gezeigten 7.5% ndGel geladen.

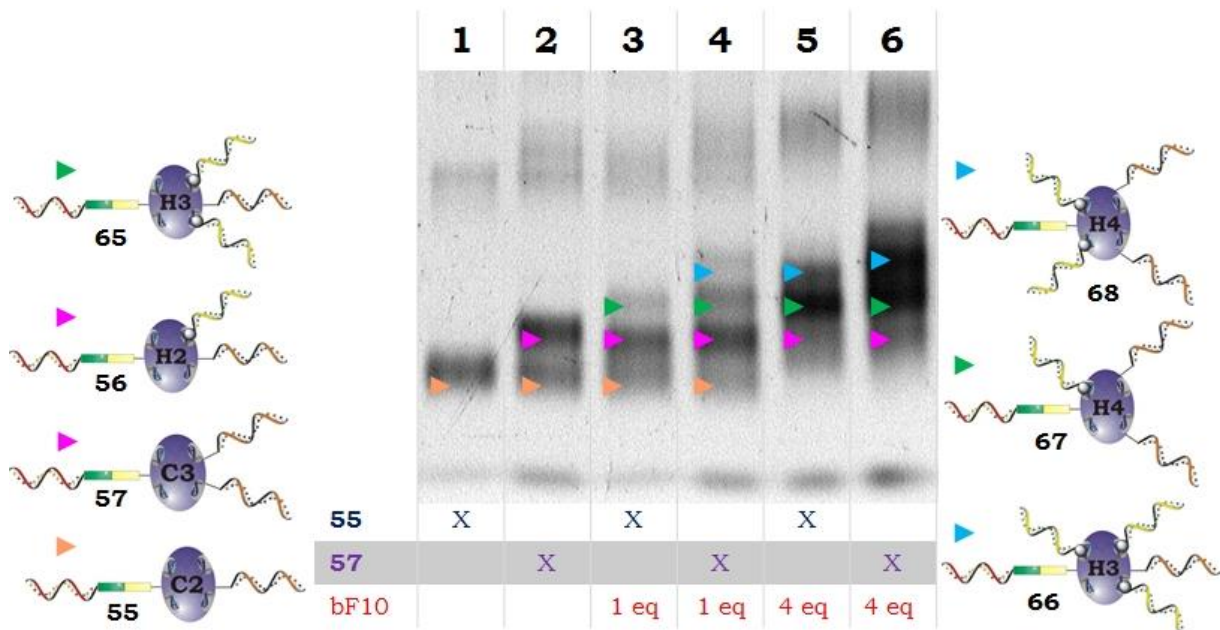


Abbildung 2.71: 7.5% ndPAGE von Bikonjugat **55** und Trikonjugat **57** mit anschließender Sybr Gold Färbung; **Spur 1:** **55**, **Spur 2:** **57**, **Spur 3:** **55** + bF10, **Spur 4:** **57** + bF10, **Spur 5:** **55** + 4 eq bF10 und **Spur 6:** **57** + 4 eq bF10.

Bei der ndPAGE-Analyse der Biotin-Bindeeigenschaften von **55** und **57** in *Abbildung 2.71* lassen sich die veränderte elektrophoretische Mobilität der Bi- und Trikonjugats infolge der Bindung von bF10 erkennen. Die Bandenzuordnung erfolge anhand der sinkenden elektrophoretischen Mobilität bei der Bindung einer steigenden Anzahl von bF10-Oligonucleotiden.

In Spur 1 ist eine Bande (▶) zu erkennen, der analog zur Spur 1 in *Abbildung 2.70* das Bikonjugat **55** zugeordnet wurde.

In Spur 2 lassen sich zwei Banden erkennen, diesen wurden analog zum vorherigen Gel einer intensiven Verunreinigung von **55** (▶) und das Trikonjugat **57** (▶) zugeordnet.

In Spur 3 wurde zuvor mit einem Äquivalenten bF10 inkubiertes Bikonjugat **55** geladen. Infolge der Bindung von bF10 an **55** sind zwei zusätzliche Banden erkennen. Diese Banden wurden Trivalentem STV **56** (▶) und dem Tetrakonjugat **65** (▶) aufgebaut aus den Bindung von zwei bDNA an **55** zugeordnet.

Spur 4 wurde mit vor der ndPAGE mit einem Äquivalenten bF10 inkubiertem Trikonjugat **57** beladen. Aufgrund der Verunreinigung mit **55** (siehe Spur 2) ist eine

eindeutige Bandenzuordnung nicht möglich, da sich die Banden aus zwei unterschiedlichen Konjugaten zusammensetzen. Darum wurde die Bandenzuordnung aus Spur 3 übernommen. Ergänzend dazu lassen sich das Tetrakonjugat **67** (▶) und das Pentakonjugat **68** (▶) aus der Bindung von einem bzw. zwei bDNA an **57** zuordnen.

In Spur 5 wurden im Vergleich zu Spur 3 die vierfache Menge bF10 mit dem Bikonjugat **55** inkubiert. Infolge des Überschusses an bDNA verschiebt sich die Verteilung der Konjugate zu **65** (▶). Zusätzlich lässt sich eine weniger mobile Bande erkennen, der das Pentakonjugat **66** (▶) zugeordnet wurde. In **66** binden drei bF10 an **55**.

In Spur 6 wurde analog zu Spur 5 der Anteil von bF10 bei der Inkubation mit dem Trikonjugat **57** vervierfacht. Bei einer analogen Bandenzuordnung zu Spur 4 und 5 verschiebt sich die Verteilung der Konjugate auf **65** (▶) und **68** (▶).

Zusätzlich lassen sich im Gel in allen Spuren Banden von verschiedenen Konjugatdimeren erkennen. Die elektrophoretische Mobilität dieser Banden ist verglichen mit den zuvor beschriebenen Konjugatmonomerbanden (von **56** und **65** bis **68**) geringer und sinkt analog zu den Monomerbanden infolge der Bindung weiterer biotinylierter Oligonucleotide. Ebenfalls kann analog zu den Monomeren eine Intensitätssteigerung bei den Dimerbanden infolge der Oligonucleotidbindung beobachtet werden. Ursache für die Konjugatdimere war die fehlende pAF4 nach der Konjugatsynthese des Bikonjugats **55** und des Trikonjugats **57**, da die geringen Produktmengen eine weitere Aufreinigung mittels pAF4 nicht ermöglichten.

Die in *Abbildung 2.71* dargestellte ndPAGE-Analyse nach der Inkubation mit biotinylierten Oligonucleotid von **55** und **57** zeigte die erfolgreiche Bindung von biotinylierten Oligonucleotiden an das Bi- und Trikonjugat. Bei der Inkubation mit einem Überschuss bDNA binden **55** und **57** bevorzugt zwei weitere Oligonucleotide. Ein ähnliches Biotin-Bindevverhalten ließ sich bei der Charakterisierung der Bindung von biotinylierten Oligonucleotiden an das STV-TCH-Konjugat **18** (siehe im Anhang unter *Abbildung 7.7*) beobachten. Wobei **18** infolge der Zugabe von vier Äquivalenten bDNA zu großen Anteilen Tetra- **21** und Pentakonjugat **22** ausbildete. Hieraus zeigt sich, dass über einen C-terminalen Cysteinrest gebundene DNA-STV-Konjugate bis zu vier weitere Oligonucleotide mittels kovalenter Verknüpfung und oder über die Biotin-STV-Wechselwirkung binden können. Dieser Befund ist ein Hinweis darauf, dass die unvollständige Assemblierung der Zielstrukture **1-4** nicht durch statische Abstoßung verursacht wird.

Zusammenfassend zeigten die ndPAGE-Charakterisierungen von **55** und **57** für die weitere Assemblierung der Nanostruktur **4**, dass komplementäre DNA-STV-Konjugate und biotinylierte Oligonucleotide erfolgreich an **55** und **57** banden. Es ließ sich die Bindung von bis zu drei weiteren bDNA an **55** und bis zu zwei weiteren bDNA an **57** erkennen. Die Hybridisierung von mehr als einem komplementären DNA-STV-Konjugat wurde jedoch nur in geringen Anteilen an das Trikonjugat **57**

beobachtet. Bei dem Bikonjugat **55** wurde eine sehr unvollständige Assemblierung mit cF9-STV-Konjugat beobachtet (siehe Nanohantel **61** und Nanodoppelhantel **63**). Diese Beobachtung zeigt ein erhebliches Hindernis für die Assemblierung des Zielkonstrukts **4** auf.

Es muss bei der ndPAGE-Charakterisierung Bikonjugats **55** und des Trikonjugats **57** in *Abbildung 2.70* und *Abbildung 2.71* deutlich darauf hingewiesen werden, dass alle Zuordnungen aufgrund der Vielzahl von Banden, die zum Teil auch durch nicht exakte stöchiometrische Zusammensetzung der Assemblierungsreaktionen verursacht sein könnten, mit einem Unsicherheitsfaktor verbunden sind.

Bei der in *Abbildung 2.71* gezeigten ndPAGE-Charakterisierung von **55**, konnte das schematisch in *Abbildung 2.68* gezeigte trivalente-STV **56** beobachtet werden. Im nächsten Schritt sollte versucht werden, **56** mittels Anionenaustauschchromatographie aufzureinigen und damit als Produkt zu isolieren.

Im Folgenden soll das bereits bei der ndPAGE nachgewiesene trivalente STV **56** mittels Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt werden.

Hierfür wurden zunächst 0.75 nmol der Bikonjugats **55** mit 1.5 nmol bF10-Cy3 für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Konjugatlösung umgepuffert, aufkonzentriert und in die FPLC injiziert. Das Anionenaustauschchromatogramm der Aufreinigung von trivalentem STV **56** ist in *Abbildung 2.72* gezeigt. Zur leichteren Zuordnung der Peaks im FPLC-Chromatogramm wurde zusätzlich die Absorption bei $\lambda = 550$ nm (spezifisch für Cy3) detektiert.

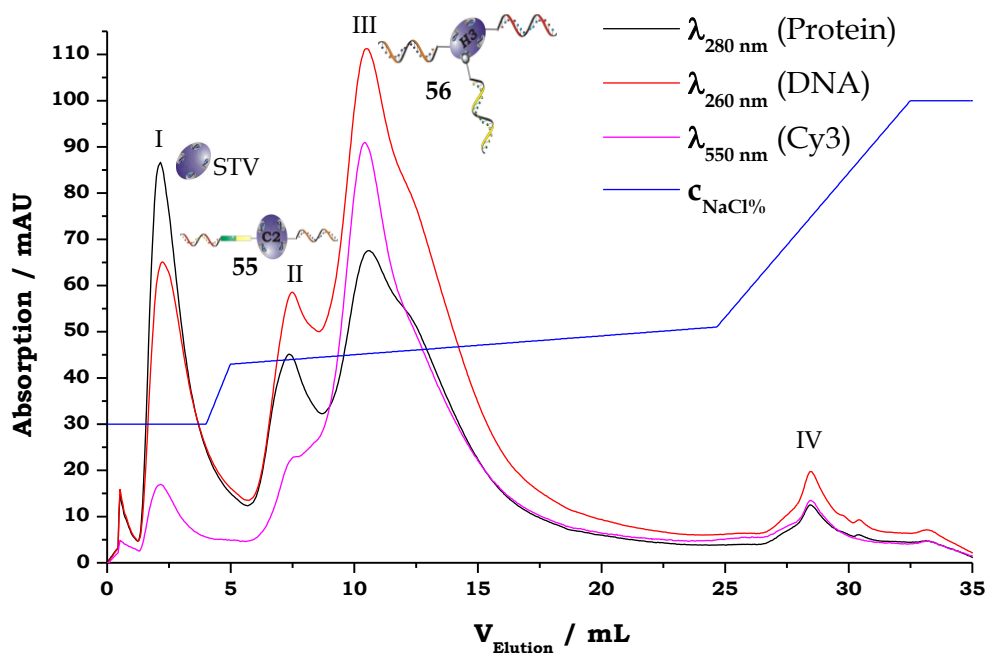


Abbildung 2.72: repräsentative Anionenaustauschchromatographie von Bikonjugat **55** inkubiert mit bF10-Cy3; I) freies STV, II) **55**, III) trivalentes STV **56** und IV) freies bF10-Cy3.

Im in *Abbildung 2.72* gezeigten FPLC-Chromatogramm lässt sich eine unzureichende Peaktrennung erkennen. Die Peakzuordnung erfolgte anhand der A_{260}/A_{280} -Verhältnisse und der spezifischen Absorption des eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffes Cy3.

Peak I wurde anhand des A_{260}/A_{280} -Wertes von < 1 freiem STV-TCH zugeordnet. Durch die Lagerung während der Synthese und Charakterisierung der Zwischenprodukte der Synthese von trivalentem STV wurde die Konjugate teilweise aufgespalten (siehe *Abbildung 2.13*).

Peak II wurde dem Bikonjugat **55** zugeordnet.

In Peak III lässt sich die spezifische Absorption von Cy3 erkennen, was die erfolgreich Bindung des bF10-Cy3-Oligonucleitids zeigt. Zudem weist die Schulter in Peak III auf die Elution von zwei unterschiedlichen Konjugaten mit ähnlichem m/z -Verhältnis hin. Darum wurde Peak III trivalentem STV **56** und dem Tetrakonjugat **65** (siehe *Abbildung 2.65*) zugeordnet.

Peak IV wurde nicht gebundenen Oligonucleotiden zugeordnet.

Es wurde annähernd keine Bandentrennung zwischen Konjugaten mit drei und vier gebundenen Oligonucleotiden erzielt, da der Unterschied im m/z -Verhältnis dieser beiden Eluenten zu gering war. Da zunächst die Elution von **56** zu erwarten war, wurden nach der Anionenaustauschchromatographie die Fraktionen unter der linken Hälfte von Peak III gesammelt für die weitere Charakterisierung umgepuffert, aufkonzentriert und anhand der spezifischen Absorption von Cy3 quantifiziert.

Die Cy3-markierten Konjugaten adsorbierten an der Polyethersulfon-Membran der verwendeten Vivaspin Ultrafiltrationseinheit (siehe im Anhang unter *Abbildung 7.10*). Darum wurde für das Umpuffern und Aufkonzentrieren Ultrafiltrationseinheiten (Vivaspin 15R) mit einer Membran aus regenerierter Zellulose (RC) verwendet. Es wurde für die Konjugate **56** eine isolierte Ausbeute von $12\% \pm 7\%$ bestimmt.

In der folgenden ndPAGE-Analyse soll die Assemblierung der Nanostruktur **4** durch sukzessives Hybridisieren der DNA-mSTV-Monokonjugate **32b**, **32c** und **32d** an das trivalente STV **56** gezeigt werden.

Dafür wurden jeweils 2.0 pmol **56**, **32d** und **56** inkubiert mit je einem, je zwei und mit allen Nanostrukturbausteinen (**32b**, **32c** und **32d**) in PBS-Mg mit 6x Orange DNA Loading Dye gemischt und in die Geltaschen geladen. Für das in *Abbildung 2.73* gezeigte 6% ndGel wurde über 120 min eine Spannung von 100 V bei 4 °C in TBE-Mg gewählt. Wegen des erwarteten größeren hydrodynamischen Volumens der assemblierten Nanostrukturen wurde ein niedrigerer Acrylamidgehalt als bei den Standardgelen gewählt, damit alle Probestandteile in die Gelmatrix wandern konnten. Zusätzlich wurde ein Mg-Ionen-enthaltender Laufpuffer gewählt, um die Stabilität der Nanostrukturen bei der Elektrophorese zu steigern.

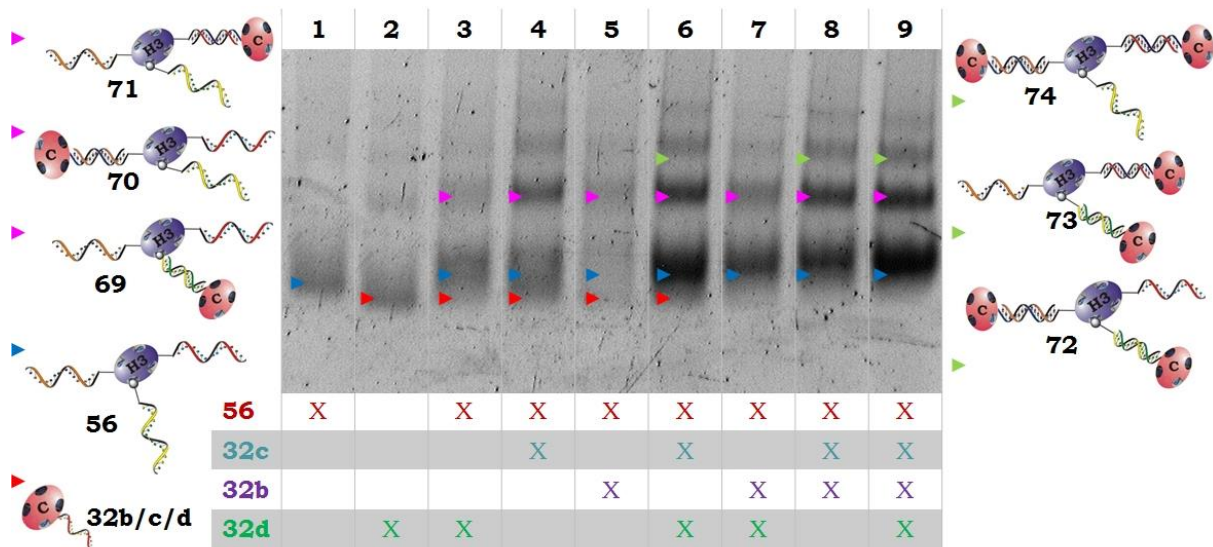


Abbildung 2.73: 6% ndPAGE von trivalentem STV **56** mit den DNA-mSTV-Monokongugaten **32b/c/d** und anschließender Sybr Gold Färbung; **Spur 1:** **56**, **Spur 2:** **32d**, **Spur 3:** **56 + 32d**, **Spur 4:** **56 + 32c**, **Spur 5:** **56 + 32b**, **Spur 6:** **56 + 32c + 32d**, **Spur 7:** **56 + 32b + 32d**, **Spur 8:** **56 + 32c + 32b** und **Spur 9:** **56 + 32b + 32c + 32d**.

Bei dem in *Abbildung 2.73* gezeigten Gel führte der vergleichsweise niedrige Acrylamidgehalt und die Mg-Ionen im Laufpuffer zu einem deutlichen Verlust an Schärfe der Gelbanden. Besonders die Kontrollbanden der Monokongugate (Spur 1 und 2) sind wenig intensiv und verschmiert im Vergleich zu diesen Banden unter den Standardelektrophoresebedingungen (siehe zum Vergleich *Abbildung 2.14*)

In Spur 1 lässt sich eine Bande (▶) erkennen, der trivalentes STV **56** zugeordnet wurde.

Bei der zweiten Kontrolle der elektrophoretische Mobilität von Monokongugaten in Spur 2 ist eine einzelnen Bande (▶) zu erkennen, der das SM(PEG)₄ verknüpfte cF10-mSTV-Monokongugat **32d** zugeordnet wurde.

Spur 3 wurde mit zuvor miteinander inkubierten trivalentem STV **56** und cF10-mSTV-Monokongugat **32d** beladen. Die beiden elektrophoretisch mobileren Banden wurden analog zu Spur 1 und 2 **32d** (▶) und **56** (▶) zugeordnet. Der dritten Bande (▶) wurde der aus **32d** und **56** hybridisierten Nanohantel **69** zugeordnet, deren Mobilität im Gel infolge des gesteigerten hydrodynamischen Volumens gesunken ist.

Die Bandenzuordnung in der mit dem cF1-mSTV-Monokongugat **32c** und **56** beladenen Spur 4 erfolgte analog zu Spur 3. Der am wenigsten mobilen Bande (▶) wurde die Nanohantel **70** zugeordnet, die aus **32c** und **56** aufgebaut wird. Im Vergleich zu den Nanohanteln **69** (Spur 3) und **71** (Spur 5) ist die Bande von **70** intensivster angefärbt, was darauf hindeutet, dass die Nanohanteln **70** zu größeren Anteilen aus den Konjugatbausteinen assemblierte. Eine mögliche Ursache dafür war eine geringere sterische Hinderung bei der Hybridisierung von **32c** an **56** infolge der besser zugänglichen F1-Oligonucleotids gebunden am C-Terminus von

STV-TCH. Diese Vermutung wurde durch das Bindeverhalten des F1-nSTV-Monokonjugats **5d** an das Bikonjugat **55** in *Abbildung 2.70* bestätigt.

Die Bandenzuordnung in der mit dem cF9-mSTV-Monokonjugat **32b** und **56** beladenen Spur 5 erfolgte analog zu den Spuren 3 und 4. Der am wenigsten mobilen Bande (▶) wurde die aus **32b** und **56** aufgebaute Nanohantel **71**.

In Spur 6 wurden die zuvor miteinander inkubierten cF1- bzw. cF10-mSTV-Monokonjugate **32c**, **32d** und trivalentes STV **56** geladen. Es lassen sich vier Banden erkennen, von denen die drei elektrophoretisch mobileren Banden analog den vorherigen Spuren **32c/32d** (▶), **56** (▶) und den beiden Nanohanteln **69/70** (▶) zugeordnet wurden. Der vierte Bande (▶) wurde die Nanodoppelhantel **72** aufgebaut aus **32c**, **32d** und **56** zugeordnet.

Die Bandenzuordnung in der mit dem cF9- bzw. cF10-mSTV-Monokonjugate **32b**, **32d** und **56** beladenen Spur 7 erfolgte analog zu Spuren 6. Die Bande der Nanodoppelhantel **73** ist in Spur 7 nicht zu erkennen. Eine möglich Ursache dafür das hier nicht verwendete cF1-mSTV-Monokonjugat **32c**, welches bei den Hybridisierungsexperimente die höchsten Bindeaffinitäten zum trivalenten STV zeigte. Ohne die Möglichkeit eine der Bindungen in der Nanodoppelhantel über das C-terminal gebundene F1-Oligo-nucleotid am trivalenten STV aufzubauen bildet sich keine Nanodoppelhantel.

Die Bandenzuordnung in der mit dem **32b**, **32c** und **56** beladenen Spur 8 erfolgte analog zu Spuren 6 und 7. Hier ist erneut eine vierte Bande (▶) zu erkennen, der die aus **32b**, **32c** und **56** aufgebaute Nanodoppelhantel **74** zugeordnet wurde.

Spur 9 wurde mit allen Bausteinen zur Assemblierung des Zielkonstruktes **4** beladen. Die Bandentrennung und -zuordnung entsprach den Banden 6 bis 8. Es ließ sich keine Bande der Nanostruktur **4** erkennen, für die eine geringere elektrophoretische Mobilität als die Bande der Nanodoppelhanteln (▶) **72** bis **74** erwartet wurde.

Die in *Abbildung 2.73* gezeigte ndPAGE-Charakterisierung der Nanostruktur **4** auf Basis von trivalentem STV **56** zeigte, dass an **56** die komplementären DNA-mSTV-Monokonjugate **32b**, **32c** und **32d** einzeln hybridisierten und dadurch die Nanohanteln (▶) **69** bis **71** entstanden. Dabei hybridisierten die Konjugate **32b** und **56** zu deutlich geringen Anteilen zur Nanohantel als **56** mit den beiden anderen Monokonjugaten. Die Hybridisierung von zwei komplementären DNA-mSTV-Konjugaten an **56** zu einer Nanodoppelhantel (▶) wurde nur zu geringen Anteilen bei der Assemblierung von **72** und **74** beobachtet. Die Assemblierung einer Nanodoppelhantel erfolgte nur unter Beteiligung des C-terminal verknüpften Oligonucleotids am trivalenten STV. Es muss erneut deutlich darauf hingewiesen werden, dass die Bandenzuordnungen aufgrund der Vielzahl möglicher gebildeter Nanostrukturen und Konjugatspezies mit einem Unsicherheitsfaktor verbunden sind.

Die Assemblierung der vollständigen Nanostruktur **4** aus vier DNA-STV-Konjugatbausteinen ließ sich bei der ndPAGE nicht erkennen. Daraus wurde deutlich, dass die Gesamtstruktur nicht assemblierte, obwohl die separate Bindung der Monokonjugate **32b**, **32c** und **32d** an das trivalente STV **56** erfolgreich gezeigt wurde.

Es lässt sich vermuten, dass die Ursachen für die unvollständige Assemblierung der Nanostruktur **4** auf Basis von trivalentem STV erneut elektrostatische Abstoßung und sterische Abschirmung sind. Diese Vermutung wird durch die beobachtete, höhere Hybridisierungseffizienz des C-terminal gebundenen F1-Oligonucleotid von **55** und **56** bestätigt, das im Vergleich zu den proteinoberflächen-, bzw. Biotinbindetasche-gebundenen F9- und F10-Oligonucleotiden sterisch besser zugänglich war.

2.3 DNA-mSTV-Hanteln **75** und **77** mit längeren DNA-Abstandshaltern

Mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) sollte ein 255 Basenpaar (bp) -langes, bis-biotinyliertes DNA-Fragment (b_2255) und ein 486 bp langes, bis-biotinyliertes DNA-Fragment (b_2486) hergestellt werden. Diese sollten dann in präparativen Agarosegelen aufgereinigt werden und mit mSTV, wie schematisch in *Abbildung 2.74* dargestellt, zu den DNA-mSTV-Hanteln **75** (mit b_2255) und **77** (mit b_2486) mit längeren DNA-Abstandshaltern assembliert zu werden. Die Charakterisierung sollte mittels ndPAGE und AFM erfolgen.

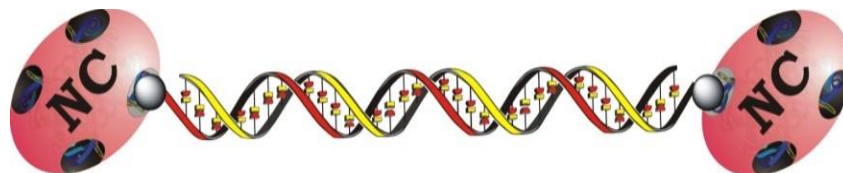


Abbildung 2.74: Schematische Darstellung der DNA-mSTV-Hanteln mit längeren DNA-Abstandshaltern aus einem 256 oder 486 bp langen DNA-Fragment und zwei daran gebundene mSTV. Die Beschriftung auf dem abgebildeten mSTV kürzt nicht kovalente (NC) DNA-STV-Bindung ab.

Die PCR zur Darstellung der bis-biotinylierten dsOligonucleotide folgte dem PCR-Protokoll in Kapitel 4.11 mit dem Templat pUC19, den biotinylierten Primern S255 und A255 für b_2255 bzw. den biotinylierten Primern S486 und A486 für b_2486 nach Niemeyer *et al.*^[49-50,206] Die PCR-Produkte wurden danach mittels Agarose Gelelektrophorese charakterisiert (siehe im Anhang unter *Abbildung 7.11*).

Dann wurden die PCR-Produkte mit einem „Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) Kit“ aufgereinigt, in PBS umgepuffert, aufkonzentriert und quantifiziert.

Die erfolgreiche Aufreinigung der DNA-Fragmente b_2255 und b_2486 wurde erneut mit Agarose Gelelektrophorese charakterisiert (siehe im Anhang unter *Abbildung 7.12*).

Zu den erfolgreich aufgereinigten DNA-Fragmenten b₂255 und b₂486 wurden jeweils vier Äquivalente mSTV in PBS gegeben und für eine Stunde bei RT inkubiert. Die erfolgreiche Assemblierung der DNA-mSTV-Hanteln **75** und **77** mit längeren DNA-Abstandshaltern wurde mittels ndPAGE charakterisiert.

Dafür wurden jeweils 0.5 pmol der Rohprodukte von **75** und **77** mit 6x Orange DNA Loading Dye gemischt und in ein 8.5% ndGel geladen (siehe im Anhang unter *Abbildung 7.13*). Die erfolgreiche Assemblierung der DNA-mSTV-Hanteln ließ sich bei der ndPAGE-Analyse erkennen, doch war eine weitere Abtrennung von ungebundenen DNA-Fragmente b₂255 und b₂486 und Nanostrukturen aufgebaut aus einem DNA-Fragment mit nur einem gebundenen mSTV **76** (mit b₂255) und **78** (mit b₂486) notwendig.

Dafür wurden die assemblierten, nicht kovalenten DNA-mSTV-Hanteln mittels präparativer Agarose Gelelektrophorese aufgereinigt. Dabei wurden die Bande der vollständig assemblierten DNA-mSTV-Hanteln **75** und **77** aus dem Gel isoliert, zerkleinert und anschließend wurden die Nanohanteln mit einem „Montage Gel-Extraktion Kit“ aus der Gelmatrix zentrifugiert.

Nach der Aufreinigung wurden DNA-mSTV-Hanteln **75** und **77** in PBS aufgenommen, aufkonzentriert und quantifiziert. Analog zur ndPAGE der unmittelbar assemblierten nicht kovalenten DNA-mSTV-Hanteln wurden die aufgereinigten **75** und **77** charakterisiert. Ein repräsentatives ndGel der aufgereinigten, DNA-mSTV-Hanteln mit längeren DNA-Abstandshaltern ist in *Abbildung 2.75* gezeigt.

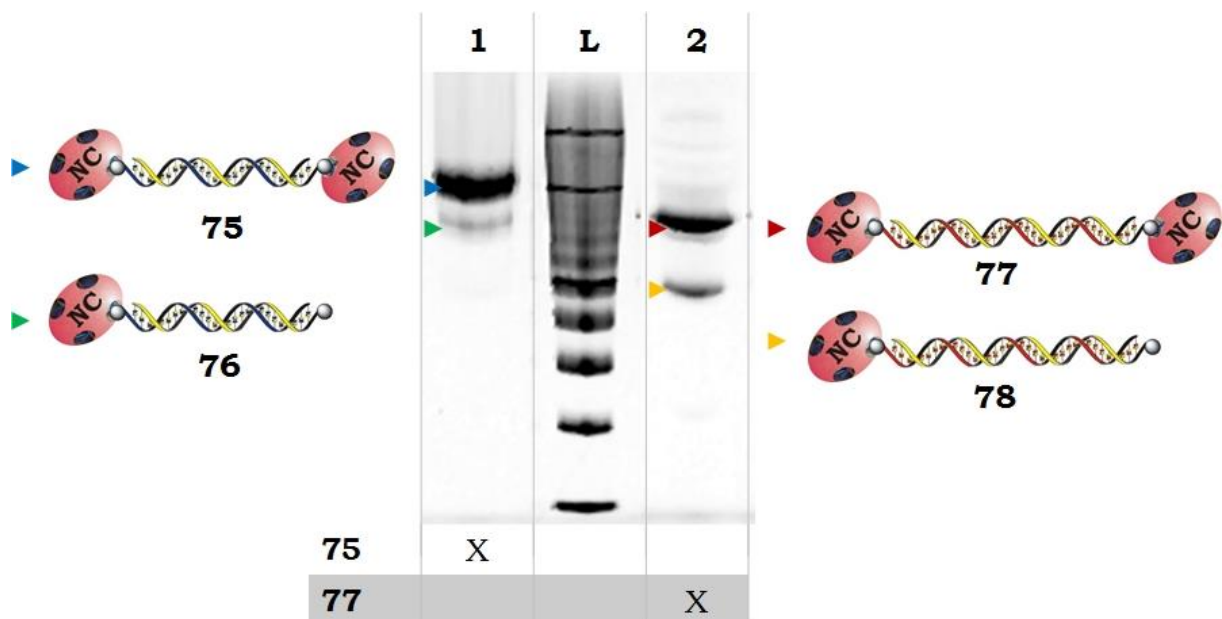


Abbildung 2.75: 8.5% ndPAGE DNA-mSTV-Hanteln mit längeren DNA-Abstandshaltern nach der Aufreinigung durch präparativer Agarose Gelelektrophorese und anschließendem Anfärben mit Sybr Gold; **Spur 1:** DNA-mSTV-Hantel **75**, **Spur L:** 100 bp-Ladder und **Spur 2:** DNA-mSTV-Hantel **77**.

Bei dem in *Abbildung 2.75* gezeigten ndPAGE-Analyse der DNA-mSTV-Hanteln mit längeren DNA-Abstandshaltern lassen sich in den beiden Spuren jeweils eine intensive wenige mobile und eine weitere Bande erkennen. Bei die Nanostrukturen **76** und **78** aufgebaut aus einem DNA-Fragment mit nur einem gebundenen mSTV wurde eine höhere elektrophoretische Mobilität als für die DNA-mSTV-Hanteln **75** und **77** erwartet. Die unvollständig aufgebauten Strukturen können die Gelmatrix aufgrund des geringeren hydrodynamischen Volumens schneller passieren.

Auf Basis dieser Hypothese für die Bandenzuordnung wurde in Spur 1 der elektrophoretisch mobileren Bande (▶) **76** und der Hauptbande (▶) die DNA-mSTV-Hanteln mit längeren DNA-Abstandshalter **75** zugeordnet. Analog dazu wurden den Banden in Spur 2 **78** (▶) und die vollständig assemblierte Nanohantel **77** (▶) zugeordnet. Aufgrund des längeren DNA-Fragments in **77** und **78** und damit verbundenem größeren hydrodynamischen Volumen wurde für **75** und **76** eine höhere elektrophoretische Mobilität beobachtet.

Bei der ndPAGE-charakterisierung der nicht DNA-mSTV-Hanteln mit längeren Abstandshaltern **75** und **77** ließ sich die erfolgreiche Assemblierung der gewünschten, supramolekularen Nanostrukturen (▶ und ▶) erkennen. In geringen Anteilen enthielt die Nanostrukturlösung die teilassemblierten **76** und **78**. Ursache dafür war nicht vollständige Abtrennung der teilassemblierten Nanostrukturen bei der präparativen Agarose Gelelektrophorese oder der Verlust eines mSTV von **75** oder **77** bei der weiteren Aufreinigung und Charakterisierung mittels ndPAGE.

Für die Charakterisierung der nicht DNA-mSTV-Hanteln mit längeren Abstandshaltern mittels AFM wurden jeweils 5.0 μL 250 nmol/L **75** und **77** in TE-Mg auf eine unmittelbar vorher aktivierte Glimmer-Oberfläche gegeben und für 1 h in einer Feuchtkammer bei RT inkubiert. Danach wurde das Glimmer-Plättchen zehn Mal mit 100 μL H_2O gespült. Repräsentative AFM-Bilder, der auf der Glimmer-Oberfläche adsorbierten **75** und **77** an Luft sind in *Abbildung 2.76* und *Abbildung 2.77* dargestellt.

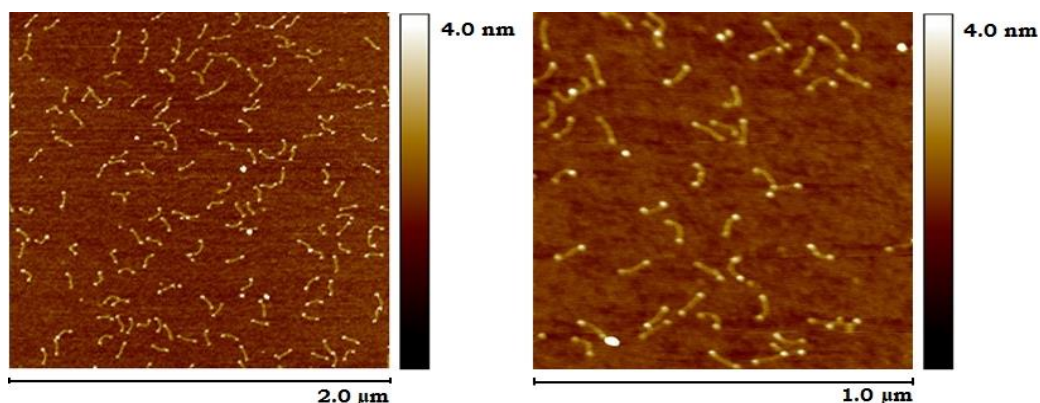


Abbildung 2.76: Repräsentative AFM Bilder der an Glimmer adsorbiert **75** (aus b_2255 -DNA-Fragment) an Luft. Für das mSTV wurde eine durchschnittliche Höhe von $0.61 \text{ nm} \pm 0.25 \text{ nm}$ aus 7677 Partikeln bestimmt.

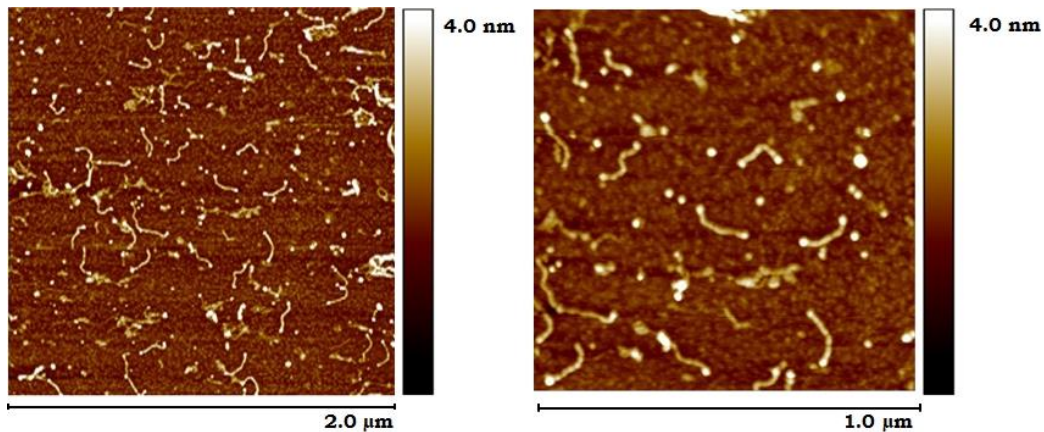


Abbildung 2.77: Repräsentative AFM Bilder der an Glimmer adsorbierten **77** (aus b_2486 -DNA-Fragment) an Luft. Für das mSTV wurde eine durchschnittliche Höhe von $0.84 \text{ nm} \pm 0.3 \text{ nm}$ aus 13697 Partikeln bestimmt.

Die AFM Bilder beider DNA-mSTV-Hanteln mit längeren DNA-Abstandshaltern zeigen deutlich die erfolgreiche Assemblierung der hantelförmigen, supramolekularen Nanostruktur.

Für das mSTV in **75** (aus b_2255 -DNA-Fragment) wurde eine durchschnittliche Höhe von $0.61 \text{ nm} \pm 0.25 \text{ nm}$ aus 7677 Partikeln bestimmt. Bei **75** (aus b_2486 -DNA-Fragment) wurde eine durchschnittliche Höhe von $0.84 \text{ nm} \pm 0.3 \text{ nm}$ aus 13697 Partikeln ermittelt. In der Literatur wurde bei AFM unter vergleichbaren Bedingungen bei nSTV eine Höhe von $0.6 \text{ nm} \pm 0.1 \text{ nm}$ gemessen.^[207]

Bei der AFM wurde bei **75** ein durchschnittlicher Abstand zwischen den mSTV in der Nanohantel von $88.65 \text{ nm} \pm 11.91 \text{ nm}$ bestimmt. Damit wurde ein mit der theoretisch berechneten Länge des b_2255 -DNA-Fragment von 86.7 nm ($0.34 \text{ nm} \cdot 255 \text{ bp}$) vergleichbarer Abstand für den „Hantelgriff“ gemessen. Für **77** wurde ein durchschnittlicher Abstand zwischen den mSTV in der Nanohantel von $167.36 \text{ nm} \pm 13.31 \text{ nm}$ experimentell bestimmt, was ebenfalls gut mit der theoretisch berechneten Länge des b_2486 -DNA-Fragments von 165.24 nm korreliert.

Die Charakterisierung der DNA-mSTV-Hanteln mit längeren DNA-Abstandshaltern mittels ndPAGE und AFM zeigte die erfolgreiche Assemblierung von **75** und **77**. Anschließend wurden die DNA-mSTV-Hanteln an den SMD-Projektpartner an der Ruhr-Universität Bochum (RUB: Arbeitskreis von Prof. Havenith) für „Scanning Near Field Infrared Microscopy“ (SNIM)^[156-157] gesendet. Wie in *Abbildung 2.78* gezeigt wurden an der RUB von A. Halang die DNA-mSTV-Hanteln **75** und **77** erfolgreich auf einer ultraflachen Au-Oberfläche immobilisiert und erneut mittels AFM charakterisiert.^[208] Dafür wurden von Projektpartnern in Genua (Fondazione Istituto Italiano di Tecnologia) hergestellte AFM-Cantilever verwendet, auf deren Spitze ein Nanokegel aus Gold auskristallisiert wurde (mit einem 10 nm Durchmesser).^[209]

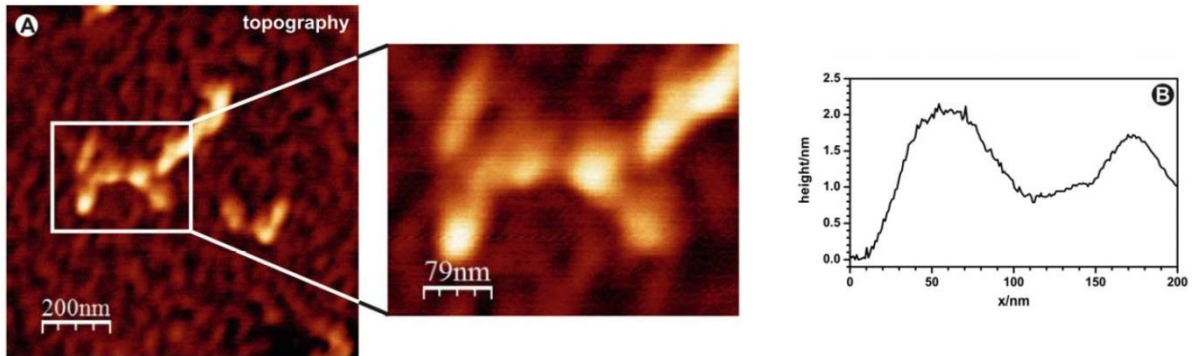


Abbildung 2.78: AFM Bilder der auf einer Au-Oberfläche adsorbierten DNA-mSTV-Hantel **75** (aus b_2255 -DNA-Fragment) an Luft aufgenommen an der RUB von A. Halang (A). Dabei bestimmtes Höhenprofil der angewinkelten DNA-mSTV-Hantel **75**.^[208]

In einem weiteren Schritt wurden die DNA-mSTV-Hanteln **75** an der RUB auf die zuvor beschriebenen AFM-Cantilever mit Nanogoldkegel adsorbiert. Dann wurden mit den Nanohantel-adsorbierten AFM-Spitzen an einer APTS-beschichteten Glimmer-Oberfläche Kraft-Distanz Kurven gemessen. Dabei wurden Kräfteffekte über eine Distanz von 70 nm gemessen. Diese Befunde wurden dann wie in *Abbildung 2.79* gezeigt mit Kraft-Distanz Kurven von nicht beschichteten Cantilevern verglichen, bei denen Kräfteffekte lediglich über eine Distanz von 20 nm gemessen wurden. Der signifikante Unterschied der Kraft-Distanz Kurven zeigte die erfolgreiche Beschichtung der AFM-Cantilever mit den DNA-mSTV-Hanteln **75**.

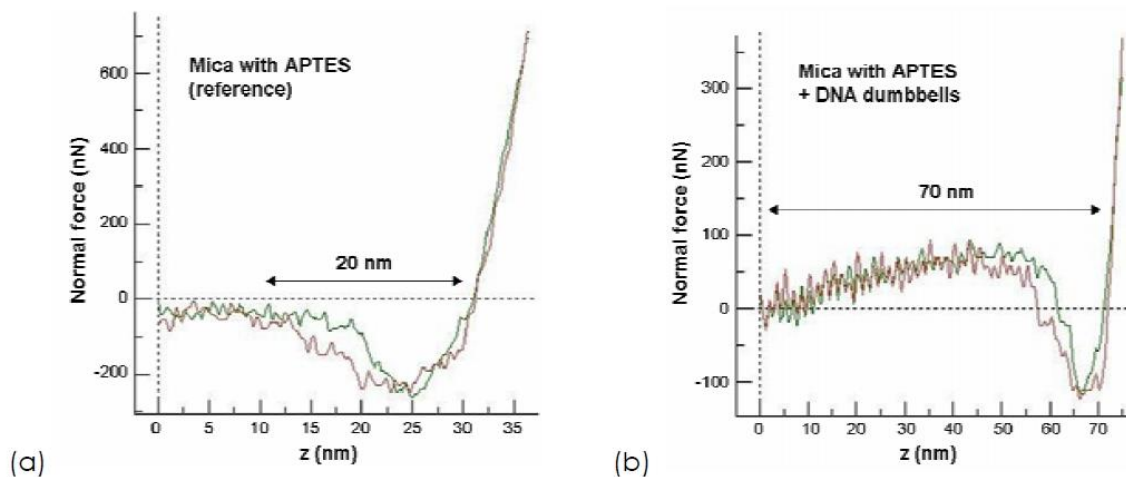


Abbildung 2.79: Kraft-Distanz Kurven der Referenz von APTS beschichteten Glimmer mit einem nicht beschichteten Cantilever (a) und von APTS beschichteten Glimmer mit einer Nanohantel **75**-adsorbierten AFM-Cantilever, wobei ein Kräfteffekt über eine 50 nm weitere Distanz als bei der Referenz gemessen werden konnte (b).^[208]

2.4 DNA-Fluoreszenzprotein Konjugate

Bei der Konjugatsynthese sollten die zwei Fluoreszenzproteine (FP)^[210] monovalentes, rotes Fluoreszenzprotein von *Discosoma* (mDsRed)^[212] und grünes Fluoreszenzprotein der 2. Generation (EGFP)^[213] mittels des heterobispezifischen Crosslinkers sSMCC kovalent mit einem kurzkettigen Oligonucleotid verknüpft werden. Die DNA-FP-Konjugatsynthese sollte sich an den etablierten Synthesevorschriften von Lapiene *et al.*^[79] und Kukolka *et al.*^[95,211] orientieren. Sie war vergleichbar mit der Synthesestrategie von DNA-STV-SH (siehe 2.1.1.2). Wie in *Abbildung 2.80* dargestellt, sollte das Amin-modifizierte Oligonucleotid mit sSMCC derivatisiert werden. Dann sollte das sSMCC modifizierte Oligonucleotid über das Maleinsäureimid an eine C-terminal eingeführte Thiol-Gruppe von mDsRed bzw. EGFP kovalent gebunden werden.

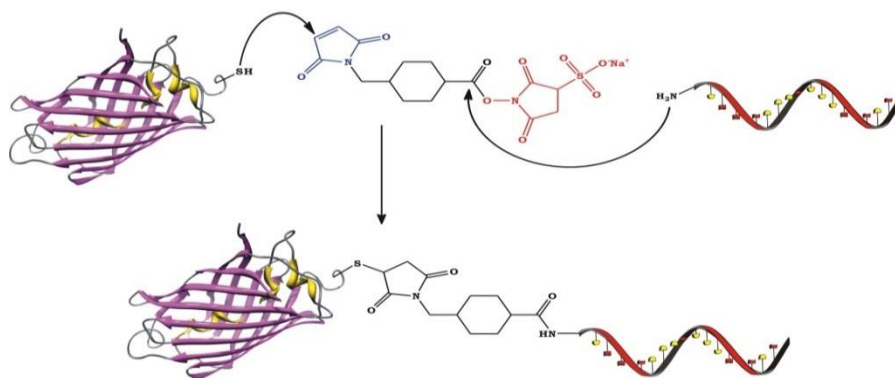


Abbildung 2.80: Schematische Darstellung der DNA-FP-Konjugatsynthese mit sSMCC.

2.4.1 DNA-FP-Konjugatsynthese

In mDsRed und EGFP wurden ein N-terminaler His₆-Tag und ein C-terminaler Cysteinrest rekombinant eingefügt,^[214] wodurch eine Thiol-Gruppe für folgende Konjugatsynthesen in die FP eingeführt wurde. Beide Fluoreszenzproteine wurden von A. Arndt exprimiert, aufgereinigt und in 20% Glycol bei -80 °C gelagert.

Im Folgenden wird die DNA-FP-Konjugatsynthese am Beispiel der Konjugation von aF9 mit EGFP zu **79a** beschrieben. 15 nmol EGFP in PB wurden mit 60 µmol DTT inkubiert, um Disulfidbrücken zwischen C-terminalen Cysteinresten zu reduzieren. Die Reduktion der Disulfidbrücke ist für die Konjugatsynthese zwingend notwendig, jedoch besteht in diesem Schritt das Risiko der Proteindenaturierung, da beider verwendeten FP jeweils zwei interne Disulfidbrücken enthalten, deren Aufbrechen die Proteinstruktur destabilisiert. 10 nmol Amino-modifiziertes F9 (aF9) in H₂O wurden mit 2 mg sSMCC in DMSO derivatisiert. Nach anschließender Reinigung über NAP Säulen wurden das aktivierte FP und sSMCC-derivatisiertes F9 vereint und im Dunkeln bei RT für 1.5 h inkubiert. Danach wurde die Konjugatlösung umgepuffert, aufkonzentriert und mittels Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt. Das zugehörige FPLC-Chromatogramm ist in *Abbildung 2.81* gezeigt.

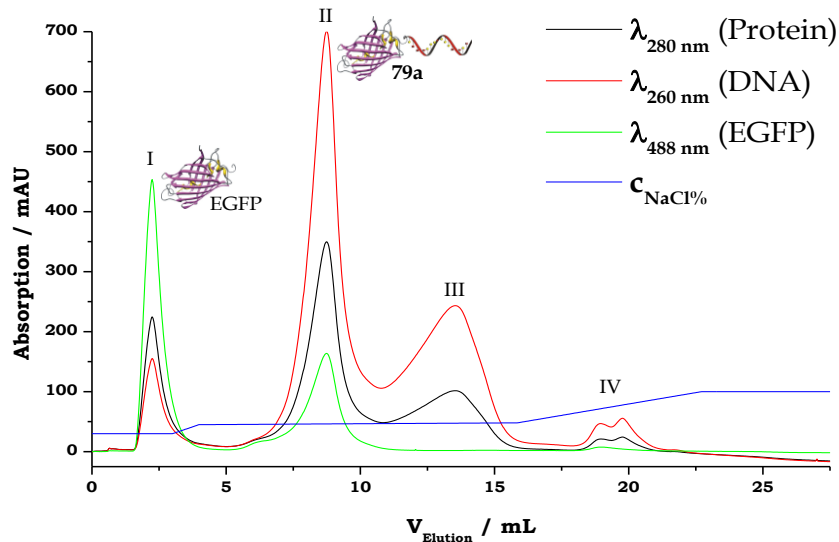


Abbildung 2.81: Repräsentatives Anionenaustauschchromatogramm der F9-EGFP-Konjugatsynthese von **79a**; I) nicht konjugiertes EGFP, II) **79a**, III) denaturiertes EGFP mit zwei oder mehr daran gebundenen F9-Oligonucleotiden und IV) freies F9.

Im Chromatogramm in *Abbildung 2.81* erfolgte die Peakzuordnung anhand der Elutionsreihenfolge und der spezifischen Absorption von EGFP bei $\lambda = 488 \text{ nm}$.

Peak I wurde anhand des größten m/z -Verhältnisses, einer proteintypischem A_{260}/A_{280} -Wert von < 1 und der intensiven Absorption bei $\lambda = 488 \text{ nm}$ nicht konjugiertem EGFP zugeordnet.

Der Eluent in Peak II wurde dem DNA-FP-Konjugat **79a** zugeordnet. Durch den um Faktor fünf größeren Extinktionseffizienten (ϵ) von F9 im Vergleich zu EGFP wurde im Peak des DNA-FP-Konjugats **79a** ein deutlicher Anstieg des A_{260}/A_{280} -Wertes verglichen zum Peak des nicht konjugierten FP beobachtet. Ursache dafür ist eine intensivere Absorption der Oligonucleotide in **79a** im Vergleich zur Absorption der Aminosäuren im freien EGFP.

In Peak III ist die spezifische Absorption von EGFP nicht zu erkennen. Verglichen mit der Anionenaustauschchromatographie von DNA-STV-Konjugaten eluierten bei einem zu Peak III vergleichbaren Salzgradienten DNA-STV-Konjugate mit zwei oder drei kovalent gebundenen Oligonucleotiden, so dass auf Basis des m/z -Verhältnisses und der Absorption bei 488 nm Peak III denaturiertem EGFP mit zwei oder drei kovalent gebundenen F9-Oligonucleotiden zugeordnet wurde. Es erscheint als eine plausible Hypothese, dass weitere kovalente Bindung von F9-Oligonucleotiden zum denaturierten EGFP ausgebildet wurden. Bei den gewählten Reduktionsbedingungen für die C-terminalen Cysteinreste (DTT bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ für 16 h) können proteininterne Disulfidbrücke von DTT reduziert werden, wobei die Proteinstruktur destabilisiert wird. Die dabei entstandenen freien Thiol-Gruppen können dann mit dem sSMCC-F9 reagieren. Dadurch eluiert bei der FPLC in Peak III denaturiertes und in Folge der Entfaltung nicht fluoreszentes EGFP mit zwei oder drei gebundenen Oligonucleotiden.

Peak IV wurde nicht konjugiertem F9 zugeordnet.

Die Fraktionen des DNA-FP-Konjugats **79a** wurden nach der FPLC vereint, umgepuffert, aufkonzentriert, quantifiziert und in Aliquoten mit 20% Glycerol bei -80 °C gelagert. Es wurde eine isolierte Ausbeute für die DNA-EGFP-Konjugatsynthese von $17.1\% \pm 5.2\%$ erreicht.

Bei der DNA-FP-Konjugatsynthese von **80a** aus mDsRed und aF9 (im Anhang unter *Abbildung 7.14* dargestellt) wurde eine isolierte Ausbeute von $17.2\% \pm 6.8\%$ erzielt.

2.4.2 Charakterisierung der DNA-FP-Konjugate und daraus assemblierter, fluoreszenter Nanohanteln

Anschließend wurden die DNA-FP-Konjugate **79a** (aus EGFP und aF9), **79b** (aus EGFP und acF9), **80a** (aus mDsRed und aF9) und **80b** (aus mDsRed und acF9) mittels ndPAGE charakterisiert. Ergänzend sollte die Hybridisierung von kovalenten DNA-FP-Konjugaten zu den fluoreszenten Nanohanteln **81** (aufgebaut aus **79a** und **79b**) und **82** (aufgebaut aus **80a** und **80b**) untersucht werden. Die fluoreszenten Nanohanteln sollten im Rahmen des SMD-Projektes an das „Consiglio Nazionale delle Ricerche“ (CNR-INFM-TASC) in Triest gesendet werde. Am CNR-INFM-TASC sollte die fluoreszenten Nanohanteln als Modelstruktur beim „Tip Enhanced Fluorescence Mapping“ (TEFM)^[158] verwendet werden.

Für die ndPAGE wurden jeweils 2 pmol der Konjugate **79a**, **79b**, **80a**, **80b**, EGFP, mDsRed und die Nanohanteln **81** sowie **82** mit 6x Orange DNA Loading Dye gemischt und in die Taschen eines 8.5% ndGel geladen. Ein repräsentatives, mit Silber angefärbtes (Silberfärbung färbt auch die Banden nicht DNA-konjugierter FP) 8.5% ndGel ist in *Abbildung 2.82* gezeigt.

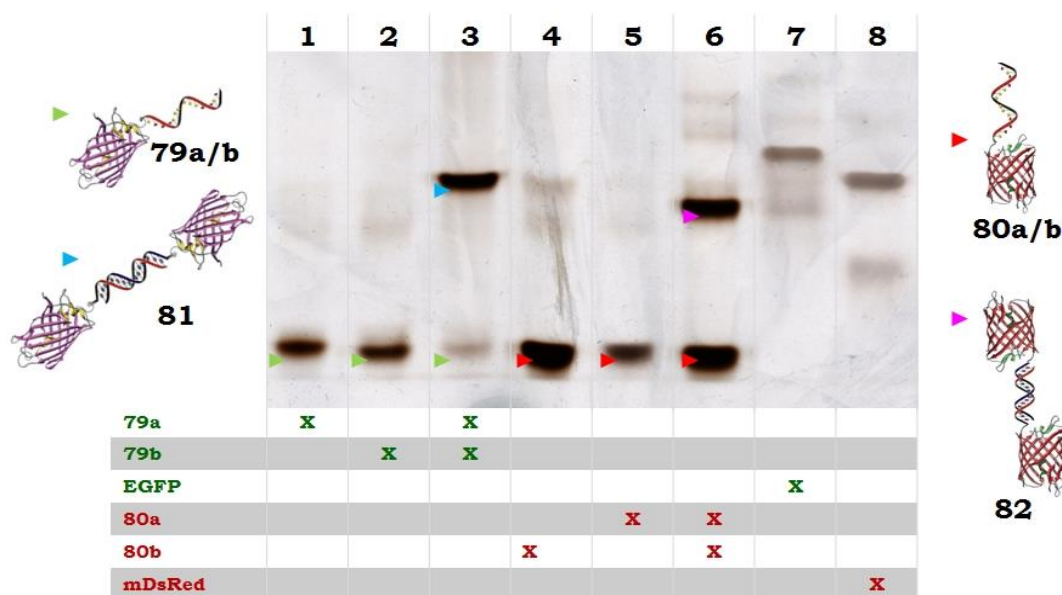


Abbildung 2.82: 8.5% ndPAGE von DNA-EGFP-Konjugaten und DNA-mDsRed-Konjugaten nach Färbung mit Silber; **Spur 1:** **79a**, **Spur 2:** **79b**, **Spur 3:** Nanohantel **81**, **Spur 4:** **80b**, **Spur 5:** **80a**, **Spur 6:** Nanohantel **82**, **Spur 7:** EGFP und **Spur 8:** mDsRed.

Bei der in *Abbildung 2.82* gezeigten ndPAGE-Charakterisierung der DNA-EGFP- **79a/b** und DNA-mDsRed-Konjugaten **80a/b** folgte die Bandenzuordnung der Annahme, dass DNA-FP-Konjugate eine höhere elektrophoretische Mobilität besitzen als aus komplementären DNA-FP-Konjugaten hybridisierte, fluoreszente Nanohanteln. Ursache dafür ist das größere hydrodynamische Volumen der Nanohanteln im Vergleich zu den DNA-FP-Konjugaten bei einem gleichbleibenden m/z-Verhältnis.

Den Banden (▶) in den Spur 1 und 2 wurden die DNA-EGFP-Konjugate **79a** und **79b** zugeordnet.

In Spur 3 lassen sich zwei Banden erkennen. Der elektrophoretisch mobileren Bande (▶) **79a** und **79b** zugeordnet. Der Hauptbande (▶) wurde die fluoreszente Nanohantel **81** zugeordnet.

Den Banden (▶) in den Spur 4 und 5 wurden die DNA-mDsRed-Konjugate **80a** und **80b** zugeordnet.

In Spur 6 lassen sich analog zu Spur 4 zwei Banden erkennen, von denen der mobileren Bande (▶) **80a** und **80b** zugeordnet wurden. Der weniger mobile Bande (▶) wurde die fluoreszente Nanohantel **82** zugeordnet. Eine mögliche Ursache für die große Menge verbliebener DNA-mDsRed-Konjugate war eine unpassende Stöchiometrie bei der Assemblierung der fluoreszenten Nanohantel. Diese Vermutung wird durch die überladenen Bande von **80b** in Spur 4 bestätigt.

Den Banden in den Spuren 7 und 8 wurde EGFP und mDsRed zugeordnet.

Die ndPAGE-Charakterisierung der DNA-EGFP-Konjugate und DNA-mDsRed-Konjugaten zeigt die erfolgreiche DNA-FP-Konjugatsynthese von **79a**, **79b**, **80a** und **80b**. Zudem lässt sich die erfolgreiche Assemblierung der DNA-FP-Konjugate zu den fluoreszenten Nanohanteln **81** und **82** deutlich erkennen.

Vier unterschiedliche Typen von fluoreszenten Nanohanteln **81**, **82** und Nanohanteln zusammengesetzt aus **79a** und **80b**, bzw. **79b** und **80a** wurden an das CNR-INFM-TASC gesendet. Dort wurden die fluoreszenten Nanohanteln von Dr. Nicolas Marquestaut mittels AFM charakterisiert.

Die Lösungen der fluoreszenten Nanohanteln wurden für die AFM-Messungen auf 200 pmol/L verdünnt und eine Stunde auf einem Mg²⁺-funktionalisierten Objektträger inkubiert. Dann wurde die Oberfläche einmal mit TE gespült und die AFM Bilder in TE aufgenommen. In *Abbildung 2.83* ist ein repräsentatives AFM-Bild von **81** auf einer für 3 h mit Mg²⁺-funktionalisierten Glasoberfläche gezeigt.

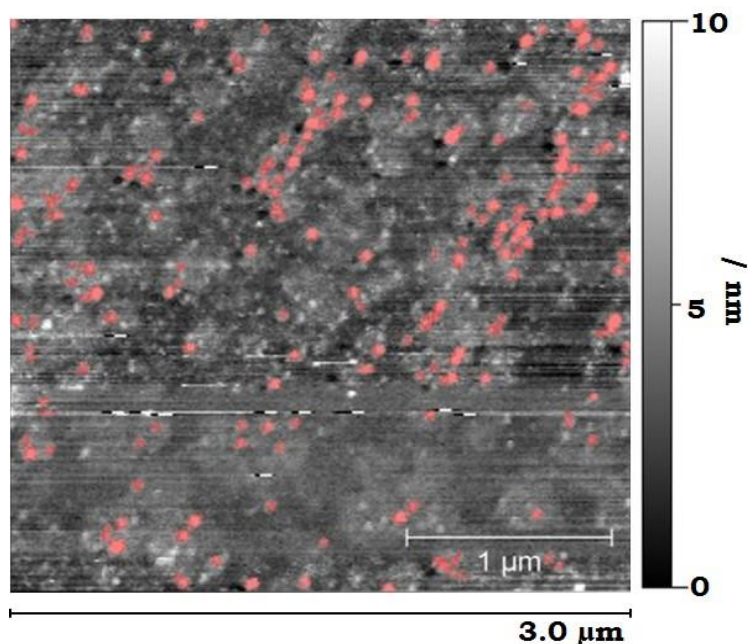


Abbildung 2.83: AFM-Aufnahme der fluoreszenten Nanohantel **81** auf einem Mg^{2+} -funktionalisierten Glasobjektträger bei einer Partikeldichte von 16 fluoreszenten Nanohanteln pro μm^2 , mit einer durchschnittlichen Höhenverteilung auf $3 \times 3 \mu m^2$ von 6 nm.

In dem in *Abbildung 2.83* gezeigten AFM-Bild der fluoreszenten Nanohantel **81** wurde EGFP rot angefärbt. Die FP lassen sich auf der Glasoberfläche gut erkennen. Ein Teil der Fluoreszenzproteine lag dabei in der charakteristischen Anordnung als Nanohantel vor. Jedoch waren große Anteile der fluoreszenten Nanohanteln zerfallen. Ursache für den Zerfall der DNA-FP-Nanohanteln war die geringe Lagerstabilität der DNA-FP-Lonjugate bei $4^\circ C$. Während des Transports und der Optimierung der AFM-Bedingungen war aus diesem Grund eine Vielzahl der fluoreszenten Nanohanteln zerfallen.

2.5 Nanopartikel-Protein Hybride als Plattform für SERRS

Im Rahmen des SMD-Projekts sollten Nanopartikel-Protein Hybride **85** als Plattform für die oberflächenverstärkte Resonanz-Raman-Spektroskopie (SERRS)^[159-161] assembliert werden. Raman-Streuung von Molekülen besitzt einen sehr kleinen Streuquerschnitt (ca. 10^{-30} cm^2),^[215] so dass eine relative hohe Konzentration der Molekülen benötigt wird, um ein detektierbares Signal zu erhalten. Aus diesem Grund sind Raman-Spektren einzelner Moleküle so nicht möglich. Wenn sich das Molekül aber nahe einer metallischen Oberfläche (vor allem Ag) befindet, kann das Raman-Signal erheblich verstärkt werden.^[216] Dadurch können bei der SERRS einzelne Moleküle detektiert werden. Mit dem Schwerpunkt der Detektion von einzelnen und wenigen Molekülen im SMD-Projekt sollte das Nanopartikel-Protein Hybrid **85** als Modellsystem für die SERRS-Detektion von FP-funktionalisierten Goldnanopartikeln (Au-NP) verwendet werden.

Das Design sah den Aufbau des Nanopartikel-Protein Hybriden **85** aus mit zwei Oligonucleotiden funktionalisierten Au-NP, mit Oligonucleotid funktionalisierten Silbernanopartikeln (Ag-NP) und einem DNA-FP vor. In *Abbildung 2.84* ist die Assemblierung von **85** in zwei Schritten schematisch dargestellt. Der erste Schritt bestand aus der DNA-Bifunktionalisierung der Au-NP mit den Oligonucleotiden A12 und cA24 (a), der DNA-Funktionalisierung der Ag-NP mit den Oligonucleotid B12 (b) und der DNA-FP-Konjugatsynthese (c) von **79c** aus EGFP und aA24. Im zweiten Schritt sollten die DNA-bifunktionalisierten Au-NP (**84**) und die DNA-funktionalisierten Ag-NP (**83**) über das verbrückendes Oligonucleotid cA12cB12 und das DNA-FP-Konjugat **79c** mit dem komplementären Oligonucleotid von **84** assembliert werden. Das Design für die Nanopartikel-Protein Hybriden **85** entsprach folglich einem mittels DDI hybridisiertem dispersen Aggregat. Die Auswahl der Oligonucleotid-sequenzen erfolgte nach Hazarika *et al.*^[77]

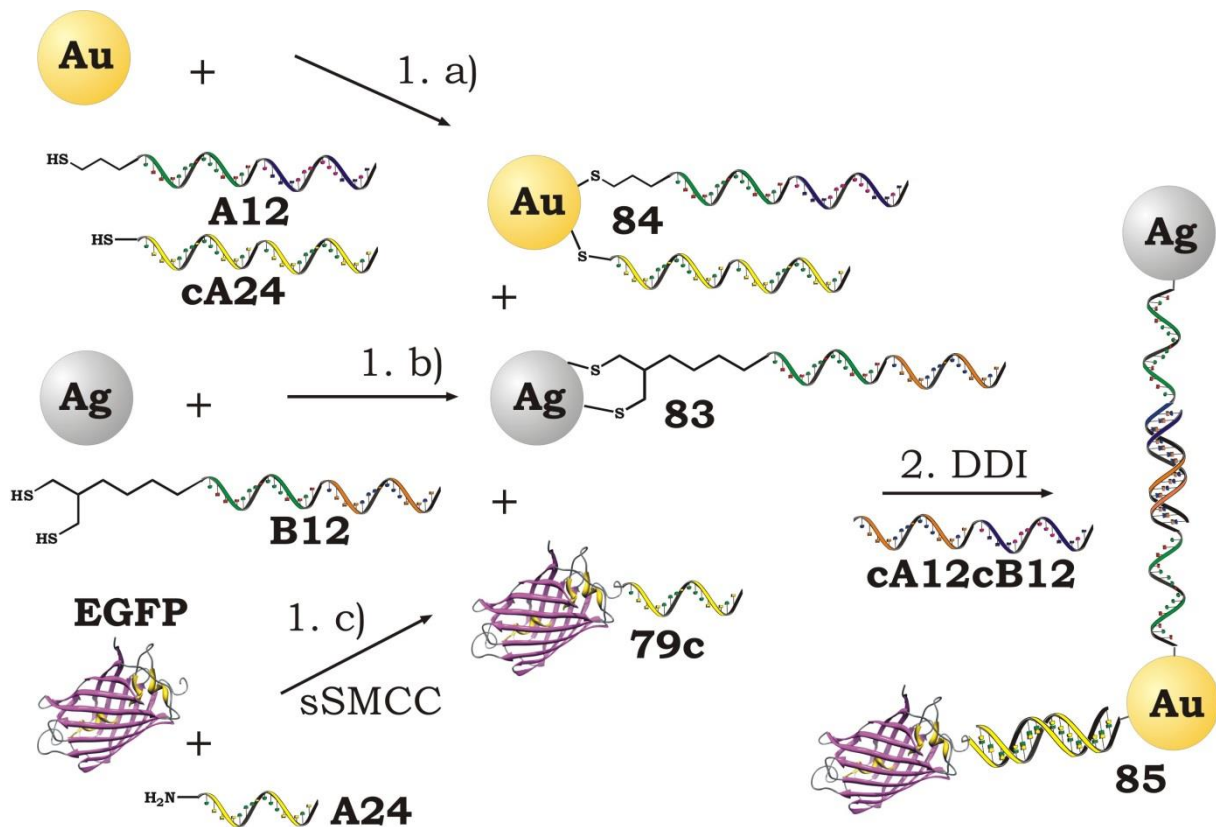


Abbildung 2.84: Schematische Darstellung der Assemblierung des Nanopartikel-Protein Hybriden **85** als Plattform für SERRS aus DNA-FP-Konjugaten (**79c**), DNA-bifunktionalisierten Au-NP (**84**), DNA-funktionalisierten Ag-NP (**83**) und dem verbrückenden Oligonucleotid: cA12cB12.

Die DNA-Funktionalisierung der Au-NP **84** ist im folgenden Kapitel beschrieben. Die DNA-funktionalisierten Ag-NP^[161,217] wurden von Projektpartnern an der University of Strathclyde (Glasgow, UK) und dem Karlsruher Institut für Technologie (KIT, D) bereitgestellt. Die DNA-FP-Konjugatsynthese von **79c** erfolgte analog zu Kapitel 2.4.1. Eine vollständige Nomenklaturtabelle ist in Kapitel 8 dargestellt.

2.5.1 Funktionalisierung von Au-NP

Goldnanopartikel mit einem Durchmesser von 23 nm (Au-NP₂₃) wurden, nach der 1951 von Turkevitch *et al.*^[218] erstmals publizierten und 1973 von Frens^[219] erweiterten Citrat-Reduktionsmethode zur Synthese von Citrat-stabilisierten Au-NP von Jens Reiber hergestellt.

Die Au-NP₂₃ waren in H₂O und Citrat-Lösung lagerstabil. Durch Zugabe von salzhaltigem Puffer fielen die Au-NP₂₃ in Form von schwarzen, unlöslichen Aggregaten aus. Ursache dafür war die Neutralisation der Ladungsabschirmung der NP durch die Salz-Ionen. Das Aggregieren der nicht funktionalisierten Au-NP₂₃ im Vergleich zu DNA-funktionalisierten wurde im Folgenden zur Kontrolle der erfolgreichen Oligonucleotid-Funktionalisierung verwendet. Die Quantifizierung der Au-NP₂₃ erfolgte mittels UV/Vis-Spektroskopie bei einem Absorptionsmaximum der Au-NP₂₃ bei $\lambda = 525$ nm und einem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{\text{Au-NP}} = 1330000$ L/mol·cm.^[220] Im Säulendiagramm in *Abbildung 2.85* sind die auf die Ausgangsmengen normierten Anteile an nicht funktionalisierten Au-NP₂₃ in Lösung bei steigender NaCl-Konzentration dargestellt.

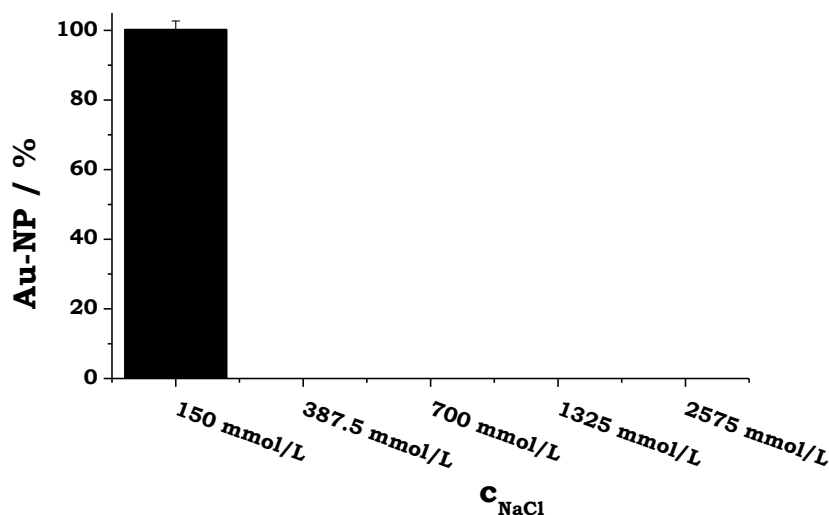
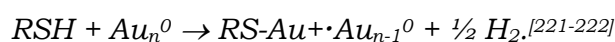


Abbildung 2.85: Säulendiagramm mit auf die Ausgangsmengen (100%) normierten Anteilen nicht funktionalisierter Au-NP₂₃ in Lösung bei steigendem NaCl-Gehalt.

Wie in *Abbildung 2.85* gezeigt, fielen die nicht funktionalisierten Au-NP₂₃ bei einer NaCl-Konzentration über 150 mmol/L vollständig aus. Daran zeigte sich die limitierte Stabilität der Citrat-stabilisierten Au-NP₂₃ gegenüber Salz-Ionen. Analoge Experimente mit den DNA-funktionalisierten Au-NP₂₃ sind bei den folgenden Funktionalisierungsmethoden abgebildet und zeigen den Einfluss der DNA-Funktionalisierung auf die Stabilität der Au-NP₂₃ gegenüber Salz-Ionen.

Thiol-modifizierte Oligonucleotide sollten auf der Gold-Oberfläche der Au-NP₂₃, wie schematisch unter a) in *Abbildung 2.84* gezeigt nach folgender Reaktion von Alkylthiolen mit Gold kovalent gebunden werden:



Dabei liegt die Bindungsstärke der Au-S-Bindung in einem Bereich von 40 bis 50 kcal/mol.^[222] In der Literatur wurden die ersten Oligonucleotid-funktionalisierten Au-NP 1996 von Mirkin *et al.*^[223] beschrieben. Die Kombination der hochspezifischen Bindungseigenschaften von DNA mit den einzigartigen optischen Eigenschaften von Au-NP wurde darauf folgend ständig weiterentwickelt.^[78,224]

2.5.1.1 Citrat-stabilisierte Funktionalisierung

Der erste Ansatz folgte einer von Mirkin *et al.*^[223] zuerst beschriebene Strategie. Dabei wurden die Citrat-stabilisierten Au-NP₂₃ unmittelbar mit Thiol-modifizierten Oligonucleotiden tcA24 und tA12 inkubiert. Anschließend wurde die NaCl-Konzentration auf 150 mmol/L gesteigert. Dabei sollte die Ladung des DNA-Phosphatrückgrats mittels der Na⁺-Ionen ausgeglichen werden und dadurch die elektrostatische Abstoßung der Oligonucleotide auf der Au-Oberfläche reduziert werden. In Folge der geringeren Abstoßung der Oligonucleotide in Gegenwart von Na⁺ sollte eine höhere DNA-Beladungsdichte auf den Au-NP₂₃ erreicht werden. Anschließend wurden die DNA-funktionalisierten Au-NP₂₃ **84** mittels Zentrifugation ausgefällt. Der farblose Überstand wurde abgenommen und **84** wurden in TETBS resuspendiert. Nach dreimaliger Wiederholung der Reinigung mittels Zentrifugation wurde das Pellet mit den DNA-funktionalisierten Au-NP **84** in TETBS 300 (Puffer mit 300 mmol/L NaCl) resuspendiert und im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

In *Abbildung 2.86* ist die Stabilität von **84** bei steigender NaCl-Konzentration gezeigt.

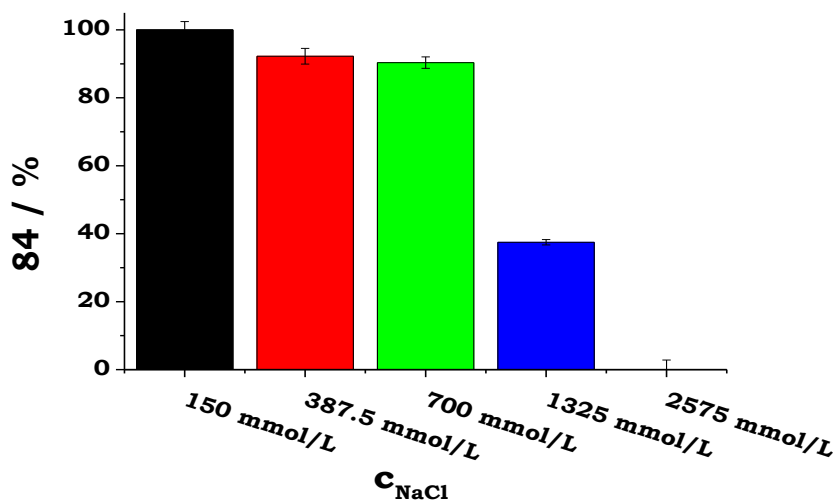


Abbildung 2.86: Säulendiagramm mit auf die Ausgangsmengen (100%) normierten Anteilen von DNA-bifunktionalisierten Au-NP **84** aus Citrat-stabilisierten NP bei ansteigender NaCl-Konzentration.

An der in *Abbildung 2.86* gezeigten deutlich gesteigerten Stabilität der DNA-funktionalisierten Au-NP **84** im Vergleich zur Stabilität nicht funktionalisierter Au-NP (siehe *Abbildung 2.85*) ließ sich erkennen, dass **84** erfolgreich DNA-funktionalisiert wurde.

2.5.1.2 BSPP-stabilisierte Funktionalisierung

Alternativ zur unmittelbaren Funktionalisierung der Au-NP₂₃ mit thiol-modifizierten Oligonucleotiden wurde das chelatisierende Citrat durch das in *Abbildung 2.87* gezeigte Bis(p-sulfonatophenyl)phenylphosphin (BSPP) ausgetauscht. Bei dieser zuerst von Zhao *et al.*^[225] beschriebenen Methode, bestand der Vorteil in der deutlich gesteigerten Stabilisierung der NP gegenüber hohen NaCl-Gradienten infolge der Chelatisierung mit BSPP. Dadurch konnte bei der Inkubation mit den Thiol-modifizierten Oligonucleotiden tcA24 und tA12 eine höhere Salzkonzentration gewählt werden, so dass infolge eines gesteigerten Ladungsausgleichs des DNA-Phosphatrückgrats eine höhere Beladungsdichte bei der DNA-Funktionalisierung von **84** erreicht werden sollte.

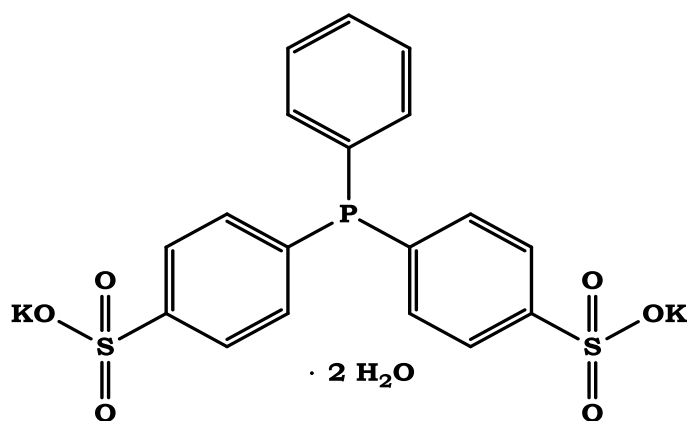


Abbildung 2.87: Strukturformel von Bis(p-sulfonatophenyl)phenylphosphin (BSPP).

Es wurde zu den Citrat-stabilisierten Au-NP₂₃ ein 8000facher Überschuss BSPP gegeben. Nach Inkubation über 16 h bei RT wurde die negative Ladung der BSPP-Stabilisierung durch die Zugabe von NaCl gesenkt, um die Au-NP₂₃ anschließend mittels Zentrifugation auszufällen. Dann wurde der Citrat und BSPP enthaltene Überstand über den ausgefällten Au-NP₂₃ abgenommen. Danach wurden die BSPP-stabilisierten Au-NP₂₃ in 12.5 μ mol BSPP in H₂O resuspendiert. Anschließend wurden die von Citrat abgetrennten, BSPP-stabilisierten Au-NP₂₃ quantifiziert und dann analog zur Citrat-stabilisierten Funktionalisierung mit den Thiol-modifizierten und DTT aktivierten Oligonucleotiden tcA24 (1500 eq) und tA12 (3000 eq) funktionalisiert. Die stöchiometrischen Stoffmengenverhältnisse bei der DNA-Funktionalisierung der Au-NP₂₃ wurden nach empirischen Messreihen bei der anschließenden Charakterisierung der DNA-funktionalisierten Au-NP **84** gewählt. Bei Ansätzen mit einem stöchiometrischen Verhältnis der Oligonucleotide tcA24:tA12 von 1:1 konnte die erfolgreiche Funktionalisierung mit tA12 nicht nachgewiesen werden. Darum wurden anschließend unterschiedliche stöchiometrische Verteilung der Oligonucleotide tcA24 und tA12 bei der DNA-Funktionalisierung gewählt und die dabei funktionalisierten Au-NP **84** charakterisiert. Bei der Wahl des stöchiometrischen Verhältnis tcA24:tA12 von 1:2 erwies sich die Funktionalisierung mit beiden Oligonucleotiden als erfolgreich.

Darum wurde werden im Protokoll zur DNA-Funktionalisierung die Au-NP₂₃ die Oligonucleotide in einem Verhältnis tcA24:tA12 von 1:2 eingesetzt. Danach wurden die DNA-funktionalisierten Au-NP **84** in drei Schritten in einer steigenden NaCl-Konzentration inkubiert. Der NaCl-Gehalt wurde in 24 h-Inkubationsschritten von 0 mol/L auf 75 mmol/L, auf 150 mmol/L und zuletzt auf 225 mmol/L gesteigert. Danach wurden die DNA-funktionalisierten, BSPP stabilisierten Au-NP **84** analog zur Citrat stabilisierten Funktionalisierung aufgereinigt.

In *Abbildung 2.88* ist die Stabilität, der DNA-funktionalisierten, BSPP stabilisierten Au-NP **84** bei steigender NaCl-Konzentration gezeigt.

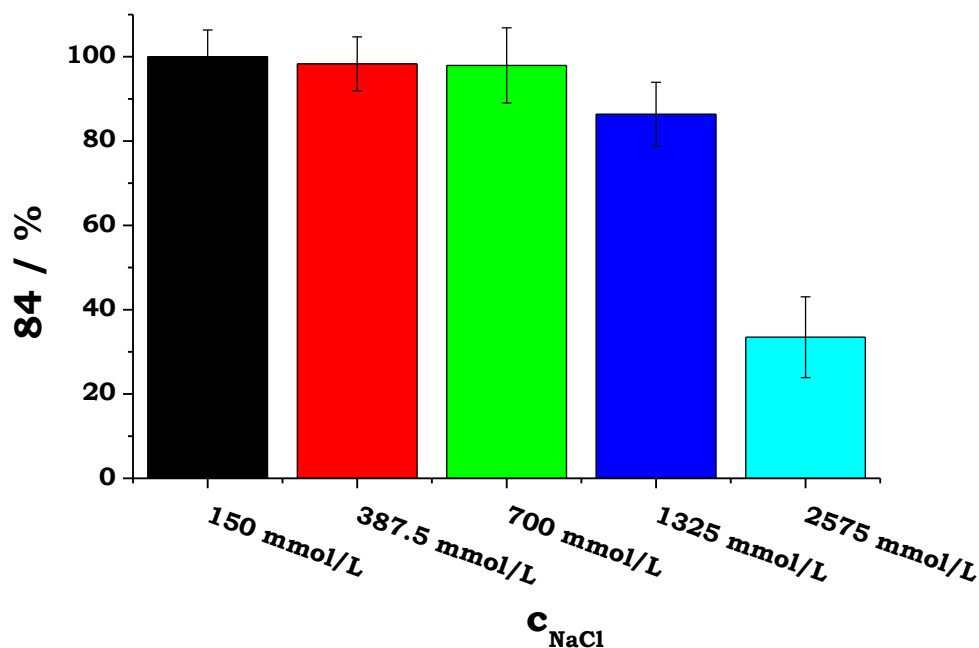


Abbildung 2.88: Säulendiagramm mit auf die Ausgangsmengen (100%) normierten Anteilen von DNA-bifunktionalisierten, BSPP stabilisierten Au-NP **84** bei ansteigender NaCl-Konzentration.

In *Abbildung 2.88* lässt sich erkennen, dass die mittels der BSPP-stabilisierten Funktionalisierung präparierten **84** bei den höchsten gewählten NaCl-Konzentration (1.325 mol/L und 2.575 mol/L) stabiler waren als die mittels Citrat-stabilisierter Funktionalisierung präparierten DNA-funktionalisierten Au-NP. Daraus ließ sich erkennen, dass die BSPP stabilisierte Funktionalisierung zu einer höheren Oberflächenbeschichtung der Au-NP₂₃ mit den Thiol-modifizierten Oligonucleotiden cA24 und A12 führte.

Darum wurden sämtliche im Folgenden verwendeten DNA-funktionalisierten Au-NP₂₃ mit der BSPP stabilisierte Funktionalisierung präpariert.

2.5.2 Aggregationsverhalten der funktionalisierten NP

Die Assemblierung der in *Abbildung 2.84* gezeigten Nanopartikel-Protein Hybride sollte mittels der folgenden Analysetechniken charakterisiert und die Assemblierung der Teilstrukturen und des vollständigen Nanopartikel-Protein Hybrides nachgewiesen werden:

- Bestimmung der Rotverschiebung der Oberflächenplasmonen Bande ($\Delta\lambda_{\text{Red}}$) im UV/Vis-Absorptionsspektrum in Folge der NP-Aggregation
- Schmelzkurven der NP-Aggregate, bestimmt bei den Absorptionsmaxima der Au-NP₂₃ und der Oligonucleotide
- Agarose-Gelelektrophorese
- Dynamische Lichtstreuung (DLS)
- Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Nach ersten Experimenten zur Assemblierung von Teilstrukturen und der vollständigen Nanopartikel-Protein Hybride **85** zeigte sich, dass die DNA-funktionalisierten Ag-NP **83** in dem für die Hybridisierung verwendeten TETBS oder TETBS 300 nicht stabil waren. Die DNA-funktionalisierten Ag-NP fielen in Gegenwart der Salz-Ionen als unlösliche Aggregate aus und standen darum für die Assemblierung des Nanopartikel-Protein Hybrides nicht mehr zur Verfügung. Für die Assemblierung musste jedoch ein salzhaltiger Puffer gewählt werden, um die elektrostatische Abstoßung zwischen den DNA-funktionalisierten NP zu minimieren und dadurch die Hybridisierungs-Rate zu Aggregaten zu steigern.^[226-227]

Darum sollten von den Projektpartnern DNA-funktionalisierte Ag-NP **83** bereitgestellt werden, die bei 150 mmol/L NaCl lagerstabil waren, indem die Oligonucleotid-Beladungsdichte gesteigert werden sollte oder alternativ kleinere Ag-NP verwendet werden sollten.

Parallel sollte die Assemblierung der Nanopartikel-Protein Hybride weiter durch Ersatz der Ag-NP **83** durch mit einer identischen Oligonucleotidsequenzen funktionalisierten Au-NP₂₃ (**86**) charakterisiert werden. Die Assemblierung von Teilstrukturen und der vollständigen Nanopartikel-Protein Hybride erfolgte somit zunächst aus den DNA-funktionalisierten Au-NP **84**, **86**, dem DNA-FP-Konjugat **79c** und dem verbrückenden Oligonucleotid cA12cB12.

2.5.2.1 Rotverschiebung der Oberflächenplasmonen Bande

Die optischen Eigenschaften von Au-NP hängen von ihrer Größe und dem Abstand der Partikel in polymeren Aggregaten ab.^[228] Die Lösung von monodispersen Au-NP ist rot. Ursache dafür sind die Oberflächenplasmonen Banden der Au-NP, welche zu einem intensiven Extinktionskoeffizienten der Partikel führt. Ist der Abstand der Au-NP zueinander größer als der durchschnittliche Durchmesser der Partikel, wirken die Au-NP rot. Wird der Abstand der Nanopartikel zueinander durch Aggregation (z. B. durch Hybridisieren

von DNA-funktionalisierten Au-NP) auf Werte unterhalb des Partikeldurchmessers reduziert, wechselt die Farbe nach dunkelviolett.^[229-230] Ursache dafür ist die Rotverschiebung der Oberflächenplasmonen Bande ($\Delta\lambda_{\text{Red}}$) in Folge der Nanopartikelaggregation.

Durch dieses optische Phänomen von Au-NP kann die Assemblierung von Au-NP zu einem dispersen Aggregat, wie dem in *Abbildung 2.84* gezeigten Nanopartikel-Protein Hybrid, durch Bestimmung der $\Delta\lambda_{\text{Red}}$ im UV/Vis-Absorptionsspektrum verfolgt werden. Als Folge der Assemblierung zu einem dispersen NP-Aggregat wird eine $\Delta\lambda_{\text{Red}}$ erwartet, die mit einer Verbreiterung des Absorptionspeaks einhergeht. In *Abbildung 2.89* ist die $\Delta\lambda_{\text{Red}}$ bei der Assemblierung der DNA-funktionalisierten Au-NP **84** und **86** über das verbrückende Oligonucleotid cA12cB12 zu dem dispersen Aggregat **87** dargestellt.

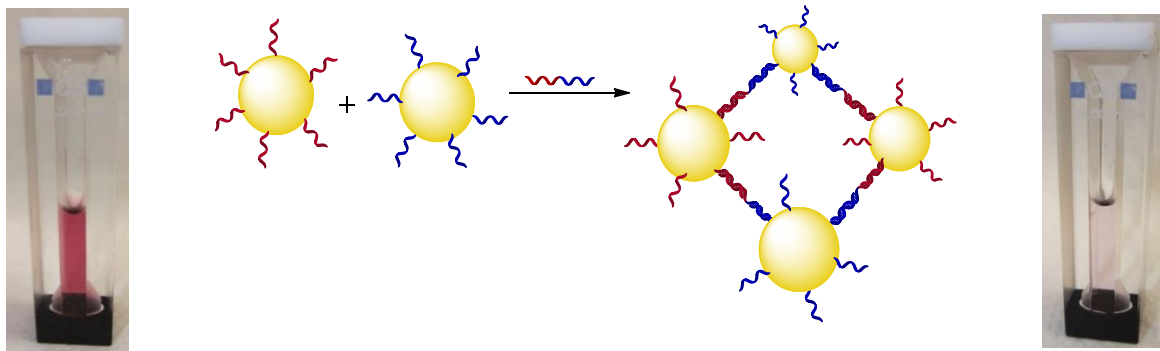


Abbildung 2.89: Schematische Darstellung und Fotos der $\Delta\lambda_{\text{Red}}$ bei der Assemblierung von monodispersen, DNA-funktionalisierten Au-NP **84** und **86** (links) über ein verlinkendes Oligonucleotid zu einem dispersen Aggregat **87** (rechts).

Bei der Bestimmung der maximalen $\Delta\lambda_{\text{Red}}$ bei der Assemblierung **84** und **86** über das verbrückende Oligonucleotid cA12cB12 zu dem dispersen Aggregat **87**, sollte das optimale Verhältnis von DNA-funktionalisierten Au-NP₂₃ zu verbrückende Oligonucleotid ermittelt werden.

Im Folgenden ist die Bestimmung von $\Delta\lambda_{\text{Red}}$ Assemblierung von **87** beschrieben. Dafür wurden zu neun Proben mit 30 fmol **84** und **86** in 30 μL TETBS 300 0 fmol, 37.5 fmol, 75 fmol, 150 fmol, 300 fmol, 600 fmol, 1200 fmol, 2400 fmol oder 4800 fmol cA12cB12 in 10 μL TETBS 300 gegeben und für 16 h bei RT inkubiert. Dann wurde die Absorption der neun Proben in einer 30 μL -Quarz-Küvette am UV/Vis-Spektrometer ein einem Bereich von $\lambda = 400$ nm bis $\lambda = 800$ nm gemessen. Die dabei aufgenommenen Absorptionsspektren sind im Anhang unter *Abbildung 7.15* abgebildet. Die daraus nach der in *Abbildung 4.2* beschriebenen Methode bestimmten $\Delta\lambda_{\text{Red}}$ sind in *Abbildung 2.90* gezeigt.

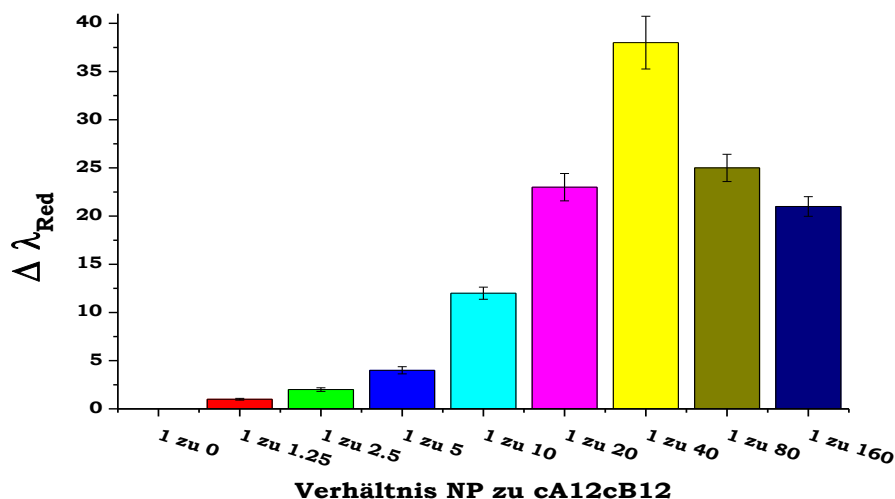


Abbildung 2.90: Säulendiagramm zum Vergleich der $\Delta \lambda_{\text{Red}}$ bei der Assemblierung von **87**.

An den in *Abbildung 2.90* gezeigten $\Delta \lambda_{\text{Red}}$ bei der Assemblierung von **87** aus den DNA-funktionalisierten Au-NP **84** und **86** mit unterschiedlichen Äquivalenten cA12cB12 lässt sich erkennen, dass bei der Verwendung von 40 eq cA12cB12 die intensivste Rotverschiebung der Oberflächenplasmonen Bande erreicht wurde.

Damit entsprach dieser Befund literaturbeschriebenen Ergebnissen, bei denen in ähnlichen Reihen die optimalen stöchiometrischen Verhältnisse für die Assemblierung eines dispersen Aggregats aus DNA-funktionalisierten Au-NP mittels eines verbrückenden Oligonucleotids bestimmt wurden. Dabei wurden bei Au-NP identischer Größe und leicht abweichenden Schritten bei dem stöchiometrischen Verhältnis der DNA-funktionalisierten Au-NP zu dem verbrückenden Oligonucleotid die intensivste $\Delta \lambda_{\text{Red}}$ bei 30 Äquivalenten verbrückendem Oligonucleotid beschrieben.^[220]

An der in *Abbildung 2.90* beobachteten $\Delta \lambda_{\text{Red}}$ ließ sich die erfolgreiche Assemblierung des dispersen Au-NP-Aggregates **87** erkennen.

Nach dem aus *Abbildung 2.90* bestimmten optimale stöchiometrischen Verhältnis an verbrückenden Oligonucleotiden für die Assemblierung von **87**, wurden bei allen folgenden Assemblierungen 40 Äquivalente cA12cB12 eingesetzt.

2.5.2.2 Schmelzkurven

Die Assemblierung des dispersen Nanopartikel Aggregates **87** erfolgte über die Hybridisierung beider Nanopartikel an das verbrückende Oligonucleotid cA12cB12. Im Aggregat wurden die Au-NP₂₃ über dsOligonucleotide miteinander verbunden.

Die thermisch reversible Denaturierung von des assemblierten **87** sollte UV/Vis-spektroskopisch charakterisiert werden. Für die Schmelzkurven der Au-NP₂₃-Aggregate wurde ein ähnlich sigmoider, jedoch steilerer Verlauf wie bei einer DNA-Schmelzkurve erwartet.^[226-227] Die Detektion erfolgte bei der Absorption der Oligonucleotide ($\lambda = 260 \text{ nm}$) und bei der Absorption der funktionalisierten Au-NP₂₃ ($\lambda = 529 \text{ nm}$).

Im Folgenden ist die Charakterisierung des dispersen Au-NP Aggregats **87** mittels Schmelzkurven-Experimenten beschrieben. Dafür wurden drei Proben vorbereitet. In der ersten Proben wurden 600 fmol **84**, **86** und 1.2 pmol cA12-cB12 in TETBS 300 für 16 h bei RT im Dunkeln inkubiert. In der zweiten Proben wurden 600 fmol **84** und **86** in TETBS 300 für 16 h bei RT im Dunkeln inkubiert. In der dritten Proben wurden 600 fmol **84** und 1.2 pmol cA12-cB12 in TETBS 300 für 16 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Dann wurden die Proben in eine Küvette für Magnetrührstäbchen gefüllt. Die Schmelzkurven wurden am UV/Vis-Spektrometer bei 25 °C bis 65 °C bei $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 529$ nm gemessen. In *Abbildung 2.91* sind die bei $\lambda = 260$ nm gemessenen Schmelzkurven der Proben 1 bis 3 gezeigt.

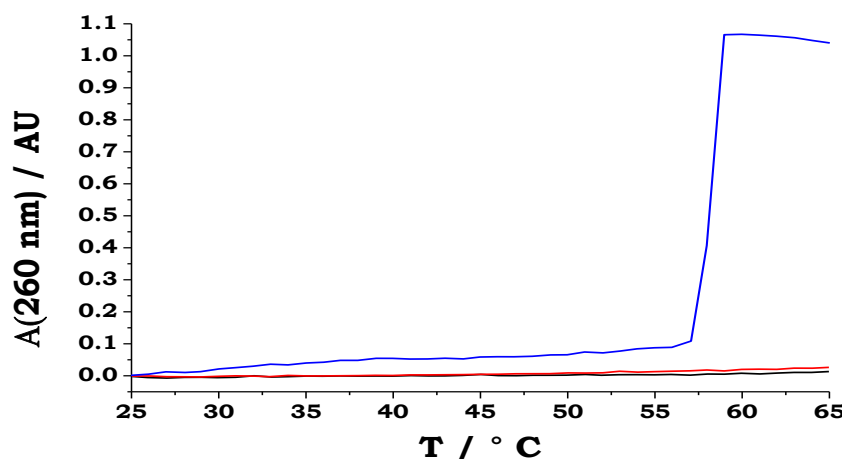


Abbildung 2.91: Schmelzkurven von **84** + **86** (—), von **84** mit cA12cB12 (—) und von **84** + **86** + cA12cB12 (—) bei $\lambda = 260$ nm.

Aus dem in *Abbildung 2.91* gezeigten Spektrum ließ sich eine Schmelztemperatur (T_M) für das dispersen Au-NP Aggregat **87** (—) von $T_M = 58$ °C bestimmen. Ohne Zugabe des verbrückenden Oligonucleotids cA12cB12 assemblierten **84** und **86** (—) nicht. Auch das verbrückende Oligonucleotid cA12cB12 hybridisierte in Abwesenheit von **84** nicht an **86** (—).

Bei analogen Schmelzkurven detektiert bei $\lambda = 529$ nm (Daten nicht gezeigt) wurde ebenfalls $T_M = 58$ °C für die Aggregation von **87** bestimmt. Im Gegensatz zu DNA-Schmelzkurven ließ sich bei den Schmelzkurven DNA-funktionalisierten Au-NP deutlich steilere Kurvenverläufe beobachten. Ursache für dieses literaturbeschriebene Phänomen ist ein kooperativer Effekt beim Denaturieren von DNA-funktionalisierten Au-NP.^[226] Durch das gleichzeitige Aufschmelzen der hybridisierten Oligonucleotide sinkt die lokale Salzkonzentration im Aggregat, so dass die T_M der verbliebenen dsOligonucleotide herabgesetzt wird.

Die Schmelzkurven des dispersen Au-NP Aggregats **87** zeigte die erfolgreiche Assemblierung der DNA-funktionalisierten Au-NP **84** und **86** mittels des verbrückenden Oligonucleotids cA24cA12. Aggregation konnte in Abwesenheit eines der drei Aggregatbausteine nicht beobachtet werden. Es ließ sich keine unspezifische Aggregation zwischen den Aggregatbausteine beobachten.

2.5.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Als Nächstes sollte die Assemblierung des dispersen Au-NP Aggregats **87**, die Hybridisierung des FP-DNA-Konjugats **79c** an **84** und die Hybridisierung von **79c** an **87** mittels Agarose-Gelelektrophorese charakterisiert werden. In Folge der Ladung des Phosphatrückgrats der Oligonucleotide wurde bei DNA-funktionalisierten Au-NP eine gute elektrophoretische Mobilität in Agarose-Gelen beobachtet.^[78] Bei der Assemblierung zu zunehmend komplexeren Strukturen wird, ähnlich der in Kapitel 2.2 gezeigten ndPAGE von DNA-STV-Nanostrukturen, eine Reduktion der elektrophoretischen Mobilität erwartet.

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden je 5 fmol **84**, **86**, 4 pmol A24-EGFP und 200 fmol cA24cA12 für Probenlösung mit einer Zusammensetzung nach der Tabelle in *Abbildung 2.92* vorbereitet und über Nacht im Dunkeln bei RT inkubiert. Danach wurden die Proben mit 0.75 μ L Au-NP-Ladepuffer gemischt und in die Taschen eines 0.5% Agarose-Gels geladen. In *Abbildung 2.92* ist ein repräsentatives 0.5% Agarose-Gel mit DNA-funktionalisierten Au-NP **84** und **86** gezeigt, das ohne Fixierung und Anfärbung nach der Elektrophorese am Flachbettscanner dokumentiert wurde.

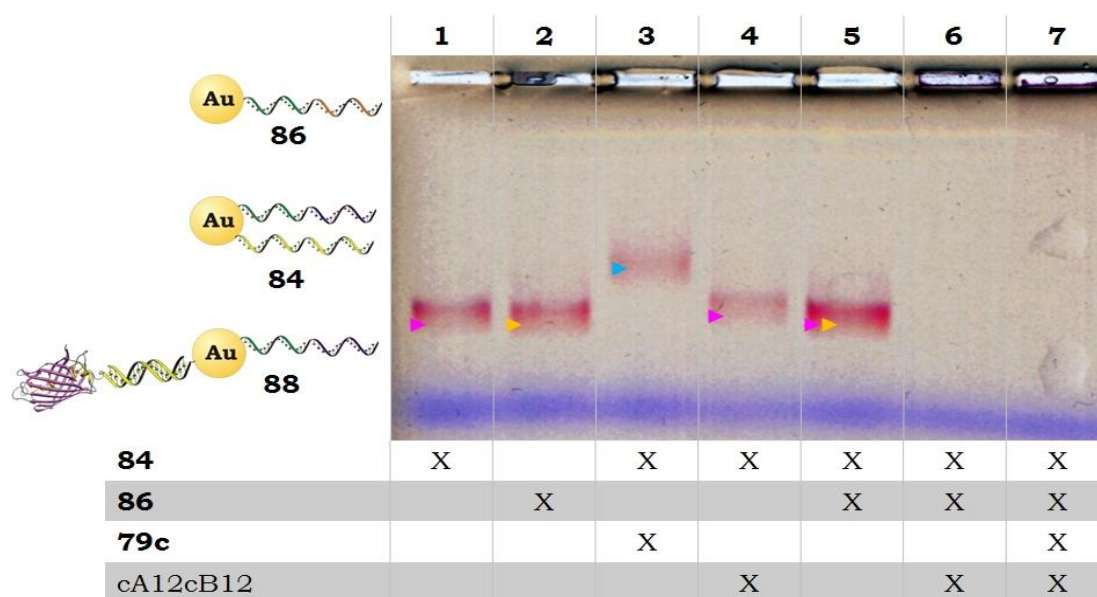


Abbildung 2.92: 0.5% Agarose Gel DNA-funktionalisierten Au-NP **84** und **86** nach der Elektrophorese am Flachbettscanner dokumentiert. **1:** **84**, **2:** **85**, **3:** **84** + 1000 eq **79c**, **4:** **84** + 20 eq cA12cB12, **5:** **84** + **86**, **6:** **84** + **86** + 20 eq cA12cB12, **7:** **84** + **86** + 20 eq cA12cB12 + 1000 eq A24-EGFP.

Im Agarosegel in *Abbildung 2.92* lassen sich die roten Banden der DNA-funktionalisierten Au-NP **84** und **86** gut erkennen.

Der Bande (▶) in Spur 1 wurde **84** zugeordnet. Mit einer identischen elektrophoretischen Mobilität wurde der Bande (►) in Spur 2 **86** zugeordnet. Ursache für die identische Mobilität ist das annähernd gleiche m/z-Verhältnis der beiden gleichgroßen DNA-funktionalisierten Au-NP.

Der Bande (▶) in Spur 3 wurde die Au-NP-DNA-FP-Hybride **88** aufgebaut aus **84** und **79c** zugeordnet. Die elektrophoretische Mobilität von **88** ist infolge der immobilisierten Proteine gegenüber **84** und **86** gesunken.

Der Bande (▶) in Spur 4 wurde **84** zugeordnet. Wie bei der Schmelzkurven (siehe Abbildung 2.91) von **84** mit zwanzig Äquivalenten cA12cB12 zu beobachten ist, hybridisierte das verbrückende Oligonucleotid nicht in Abwesenheit des zu verbrückenden DNA-funktionalisierten Au-NP **86**, wodurch in Spur 4 keine Veränderung der elektrophoretischen Mobilität der Bande zu erkennen ist.

Der Bande in Spur 5 wurde den DNA-funktionalisierten Au-NP **84** und **86** zugeordnet. Erneut lässt sich erkennen, dass die DNA-funktionalisierten Au-NP nicht unspezifisch aneinander binden.

In Spur 6 ist keine Bande zu erkennen. Ursache dafür ist die Ausbildung des dispersen Aggregates **87**. Durch das erheblich gesteigerte hydrodynamische Volumen der assemblierten NP, konnte **87** bei der Elektrophorese nicht in die Agarose-Gelmatrix wandern. Ein vergleichbares Verhalten bei der Agarose-Gelelektrophorese wurde in der Literatur bei Aggregaten aus gleichgroßen DNA-funktionalisierten Au-NP beschrieben.^[77]

In Spur 7 ist ebenfalls keine Bande zu erkennen. Das in Spur 7 assemblierte Aggregat **89** aufgebaut aus **84**, **86** und **79c** konnte analog zum dispersen Aggregat in Spur 6 nicht in die Gelmatrix wandern.

Bei der in *Abbildung 2.92* gezeigten Agarose-Gelelektrophorese der Bausteine des Nanopartikel-Protein Hybrids **85** wurde die erfolgreiche Assemblierung der DNA-FP-Konjugate **79c** an die DNA-funktionalisierten Au-NP **84** gezeigt. Bei der Assemblierung der dispersen Aggregate **87** und **89** zeigte sich, dass die zu einem Aggregat hybridisierten **84**, **86** und cA12cB12 bzw. **79c**, **84**, **86** und cA12cB12 nicht in die Gelmatrix wandern konnte. Damit zeigte die Bildung hochmolekularer Aggregate in den Spuren 6 und 7 die erfolgreiche Aggregation von **87** und **89**.

2.5.2.4 Dynamische Lichtstreuung

Bei der dynamischen Lichtstreuung (DLS) wird der hydrodynamische Radius (R_h) einer gelösten bzw. suspendierten Probe mittels des Streulichts eines Lasers bestimmt. Häufigste Anwendung findet diese Messmethode bei Polymeren, Nanopartikeln und Biopolymeren wie zum Beispiel Proteinen.^[231]

Bei der DLS von DNA-funktionalisierten Au-NP₂₃ und aus diesen NP assemblierten Aggregaten bestanden Limitierungen durch die Messung von nicht sphärischen Nanostrukturen und Molekülen mit unterschiedlichen R_h . Die Polydispersität (PDI) ist bei der DLS ein Maß für die Breite der bestimmten Größenverteilung und der damit auftretenden Partikelgrößen.^[232] Die PDI beschreibt die Verteilung der R_h der Probenbestandteile bei der DLS. Je größer die PDI, desto breiter ist die Verteilung der R_h , d.h. desto mehr Probenbestandteile unterschiedlicher GröÙer wurden bei der DLS bestimmt.

Für die Charakterisierung mittels DLS wurden die Proben 1 bis 5 nach *Tabelle 2.3* vorbereitet und über Nacht im Dunkeln bei RT inkubiert.

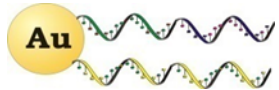
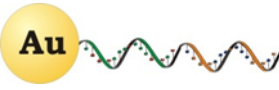
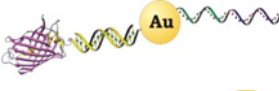
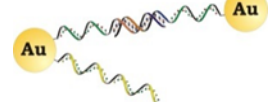
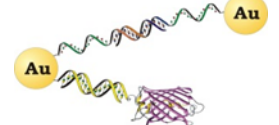
Tabelle 2.3: *Probenvorbereitung für die DLS und TEM*

Probe	84	86	79c	cA12cB12
1	50 fmol			
2		50 fmol		
3	50 fmol		50 pmol	
4	50 fmol	50 fmol		2 pmol
5	50 fmol	50 fmol	50 pmol	2 pmol

Anschließend wurden die Proben in 30 μ L-Quarz-Küvetten pipettiert und der R_h wurde am Zetasizer bestimmt. Alle Proben wurden unmittelbar vor der Messung durch Aufziehen und Ablassen mit einer Kolbenhubpipette erneut vermischt, um disperse Aggregate gleichmäßig in der Probenlösung zu verteilen.

In *Tabelle 2.4* sind die mittels DLS bestimmten R_h der DNA-funktionalisierten Au-NP₂₃ und der daraus assemblierten dispersen Aggregate zusammengefasst.

Tabelle 2.4: *Mittels DLS bestimmte hydrodynamische Radien der DNA-funktionalisierten Au-NP 84 und 86 und aus diesen aufgebauten dispersen Aggregate.*

Probe	Strukturschema	R_h / nm	PDI
84		54	0.47
86		53	0.57
88		60	0.32
87		765	0.73
89		683	0.71

Die mittels DLS bestimmten R_h der DNA-funktionalisierten Au-NP **84**, **86**, der Au-NP-DNA-FP-Hybride **88** und der Aggregate **87** und **89** bestätigen die vorhergehenden Experimente zur Charakterisierung der Assemblierung der Nanopartikel-Protein Konstrukte. Für **84** und **86** wurde ein annähernd identischer R_h bestimmt. Dieses Ergebnis wurde aufgrund der einheitlichen Funktionalisierung mit 24 bp-langen Oligonucleotiden erwartet. Bei der Assemblierung von **88** ließ sich ein Steigerung des R_h von ca. 6 nm erkennen, was infolge der Bindung der FP-DNA-Konjugate zu erwarten war. Bei der Hybridisierung der dispersen Aggregate **87** und **89** stieg der R_h um den Faktor 14 bzw. 13, was die erfolgreiche Bildung hochmolekularer Aggregate zeigte. Der steigende PDI bei **87** und **89** wies auf eine breite Größenverteilung und nicht sphärische Form der dispersen Aggregate hin.

2.5.2.5 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) beschreibt eine Technik der Elektrodennmikroskopie, bei der ein fokussierter Elektronenstrahl durch eine Probe gesendet wird. Die TEM ermöglicht eine direkte Abbildung des Probenobjekts mit Hilfe von gebeugten Elektronenstrahlen. Standardgeräte erreichen eine Auflösung von bis zu 0.2 nm.^[233]

Die Proben 1 bis 5 für die TEM wurden erneut nach *Tabelle 2.3* angesetzt. Es wurden jeweils 25 μL der Probenlösungen auf ein TEM-Gitter pipettiert, der Überstand abgenommen und das TEM-Gitter für 30 min bei RT getrocknet. In *Abbildung 2.93* sind die TEM-Bilder von DNA-bifunktionalisierten Au-NP **84** und des dispersen Au-NP-Aggregat **87** gezeigt.

Die TEM-Bilder der DNA-funktionalisierten Au-NP **86** und der Au-NP-DNA-FP-Hybride **88** ließen keine signifikanten Unterschiede zu **84** erkennen und werden darum nicht gezeigt. Ebenso entsprachen die Strukturen in den TEM-Bildern des Aggregats **89** den hier gezeigten Strukturen von **87** und werden darum nicht dargestellt.

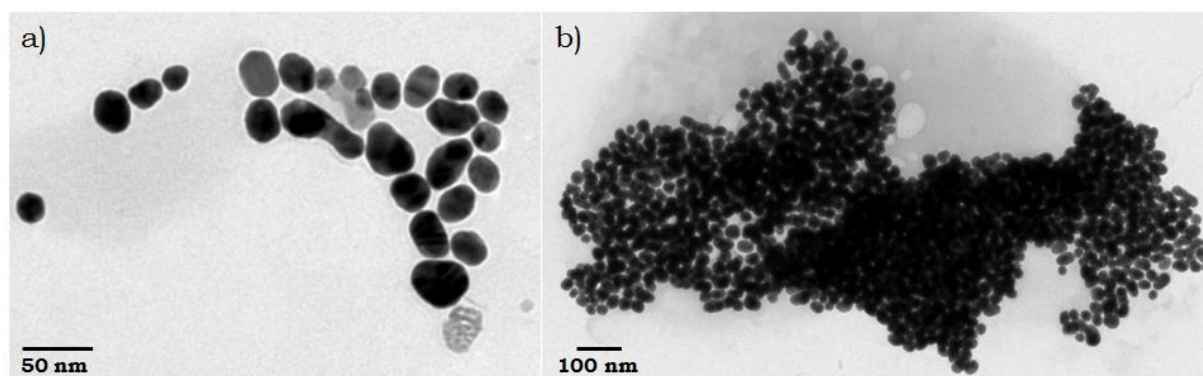


Abbildung 2.93: TEM-Bilder von DNA-bifunktionalisierten Au-NP **84** (a) und des dispersen Au-NP-Aggregat **87** (b).

Bei den in *Abbildung 2.93* gezeigten TEM-Bildern lassen sich die funktionalisierten Au-NP₂₃ gut erkennen.

Die DNA-funktionalisierten Au-NP **84** lagen einzeln oder in kleinen Clustern vor. An Form und Größe der DNA-funktionalisierten Au-NP₂₃ ließ sich erkennen, dass die Au-NP₂₃ in einer Größenverteilung um 23 nm vorlagen und häufig eine elliptische Struktur aufwiesen. Diese Größenverteilung und Form führten zu den bei der DLS bestimmten R_h und PDI. So wird bei der DLS häufig ein größerer Wert für den hydrodynamischen Radius bestimmt, wenn die Form der zu untersuchenden Moleküle nicht annähernd sphärisch ist. Zudem führen die unterschiedlichen Größen der Au-NP zu einem höheren PDI (breitere Größenverteilung). Die TEM-Bilder zeigten, dass **84**, **86** und **88** nicht aggregiert in Lösung vorlagen.

Das in *Abbildung 2.93* (b) gezeigte disperse Au-NP-Aggregat **87** ist im TEM-Bild gut zu erkennen. Ebenso ließen sich in den AFM-Bildern die Aggregate von **89** erkennen (Daten nicht gezeigt). Damit konnte bei der AFM-Charakterisierung die Hybridisierung von **84** und **86** zu dem hochmolekularen Aggregat **87** und die Hybridisierung von **84**, **86** und **79c** zu dem hochmolekularen Aggregat **89** gezeigt werden.

2.5.3 Assemblierung des Gesamtsystems

Wie im Kapitel 2.5.2 gezeigt, konnten die DNA-funktionalisierten Au-NP **84** und **86** erfolgreich mittels Hybridisieren an ein verbrückendes Oligonucleotid zum Aggregat **87** und ergänzend mit dem DNA-FP-Konjugat **79c** zum Aggregat **89** hybridisieren.

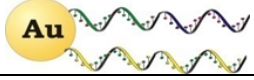
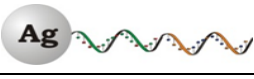

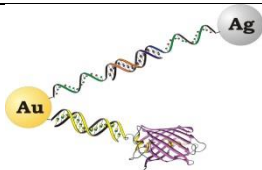
Ziel im Rahmen des SMD-Projekts war die Assemblierung der Nanopartikel-Protein Hybride **85** aus DNA-funktionalisierten Au-NP und Ag-NP mit einem daran gebundenem DNA-FP-Konjugat. Hierfür mussten optimale Pufferbedingungen für die DNA-Hybridisierung gewählt werden. TETBS 300 mit einer NaCl-Konzentration von 300 mmol/L sollte optimalen Bedingungen für die DNA-Hybridisierung an das verbrückende Oligonucleotid cA12cB12 bieten. Die DNA-funktionalisierten Ag-NP fielen jedoch nach Zugabe von TETBS 300 aus. Auch bei reduzierten Salzkonzentrationen (TETBS) oder beim Ersetzen von Tris- durch Phosphatpuffer (TEPBS und TEPBS 300) aggregierten die DNA-funktionalisierten Ag-NP zu einem unlöslichen schwarzen Rückstand.

In einer Mischung aus 1:1 H₂O:TETBS mit einer NaCl-Konzentration von 75 mmol/L zeigten sich die DNA-funktionalisierten Ag-NP als stabil. Für die folgenden Assemblierungen wurde darum 1:1 H₂O:TETBS gewählt. Wegen des niedrigen Salzgehaltes musste die Inkubationszeiten auf 10 Tage gesteigert werden.

Zunächst sollte die Assemblierung UV/Vis-spektroskopisch, analog zu den Experimenten der Rotverschiebung der Oberflächenplasmonen Bande, wie 2.5.2.1 beschrieben, gezeigt werden. Dafür sollte in getrennten Experimenten die Assemblierung der DNA-funktionalisierten Au-NP **84** mit DNA-funktionalisierten Ag-NP **83_{UoS}** (Ø ca. 40 nm) von der „University of Strathclyde“ und Ag-NP **83_{KIT}** (Ø ca. 8 nm) vom KIT gezeigt werden.

Für die UV/Vis-Messungen wurden die Proben 1 bis 7 nach *Tabelle 2.5* vorbereitet und über zehn Tage im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Proben in einer 30 µL-Quarz-Küvette am UV/Vis-Spektrometer im Bereich von $\lambda = 400$ nm bis $\lambda = 800$ nm gemessen.

Tabelle 2.5: Probenvorbereitung für die UV/Vis-spektroskopisch Bestimmung der Aggregation von **85** aus DNA-funktionalisierten Au-NP **84** mit DNA-funktionalisierten Ag-NP **83_{UoS}** und **83_{KIT}**

Probe	84	83_{UoS}	83_{KIT}	cA12cB12	Strukturschema
1	50 fmol				
2		50 fmol			
3			50 fmol		
4	50 fmol	50 fmol			
5	50 fmol		50 fmol		
6	50 fmol		50 fmol	2 pmol	
7	50 fmol	50 fmol		2 pmol	

In *Abbildung 2.94* sind die Absorptionsspektren der nach *Tabelle 2.5* angesetzten Proben 1, 2, 4 und 6 gezeigt. Bei den Absorptionsspektren der DNA-funktionalisierten Ag-NP **83_{KIT}** in den ließ sich keine Veränderung der Absorption infolge der Zugabe des verlinkenden Oligonucleotids cA12cB12 erkennen. Darum wurden für die bessere Übersicht die Proben 3, 5 und 7 nicht im folgendem Spektrum gezeigt, da hier keine Assemblierung der Nanopartikel-Protein Hybride **85** zu erkennen war.

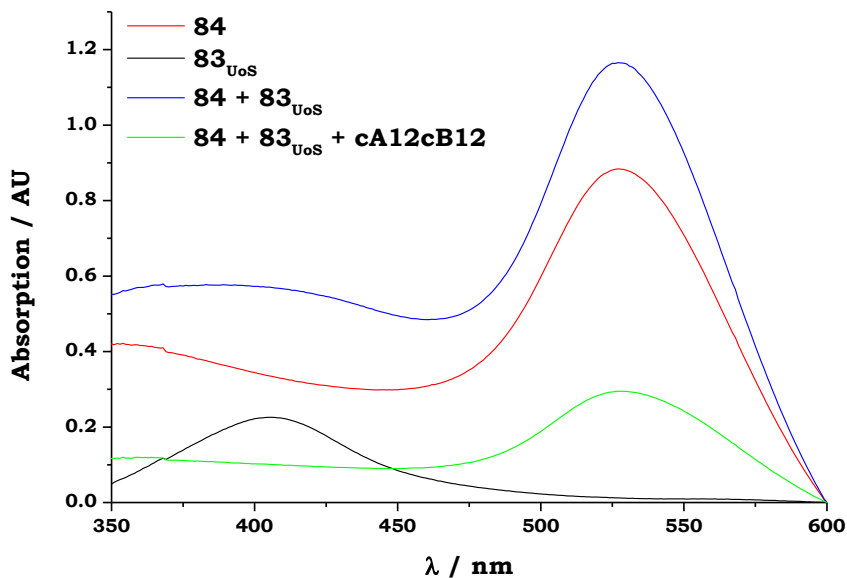


Abbildung 2.94: UV/Vis-Absorptionsspektren von DNA-bifunktionalisierten Au-NP **84** (—), DNA-funktionalisierten Ag-NP von der UoS **83_{UoS}** (—), **84** inkubiert mit **83_{UoS}** (—) und **84** inkubiert mit **83_{UoS}** und mit cA12cB12 (—).

In den in *Abbildung 2.94* gezeigten Absorptionsspektren lassen sich die charakteristischen optischen Eigenschaften der DNA-funktionalisierten Ag-NP und Au-NP gut erkennen.

Für die DNA-funktionalisierten Au-NP **84** in Probe 1 (—) wurde ein Absorptionsmaximum von $\lambda_{\text{Abs}} = 527 \text{ nm}$ und für die DNA-funktionalisierte Ag-NP **83_{UoS}** in Probe 2 (—) wurde $\lambda_{\text{Abs}} = 405 \text{ nm}$ bestimmt. Ursache für intensivere Adsorption der Au-NP war deren höherer Extinktionskoeffizient.

In Probe 4 (—) wurden **84** und **83_{UoS}** miteinander inkubiert. Das Absorptionsmaximum von **84** bei $\lambda_{\text{Abs}} = 527 \text{ nm}$ ist erneut gut zu erkennen. Im Gegensatz dazu ist der Absorptionspeak der DNA-funktionalisierten Ag-NP infolge der sich überlagernde Absorption mit den Au-NP kaum zu erkennen. Das Absorptionsmaximum von **83_{UoS}** lässt sich nur an der Intensitätszunahme im Absorptionsbereich von $\lambda = 405 \text{ nm}$ vermuten.

Die Zugabe des verbrückenden Oligonucleotids cA12cB12 zu **84** und **83_{UoS}** in der Probe 6 (—) führte zu einer deutlichen Reduktion des Absorptionspeaks der DNA-funktionalisierten Au-NP **84** im Vergleich zum Spektrum von Probe 4 (—). Die Absorption von **84** war in Folge der Zugabe von cA12cB12 um 25% im Vergleich zur Abwesenheit von cA12cB12 gesunken. Ursache für den Absorptionsrückgang war die Assemblierung eines dispersen Aggregats aus **84** und **83_{UoS}**. Die Löslichkeit dieser Aggregate ist geringer als die Löslichkeit der freien funktionalisierten NP, so dass die Aggregate ausfallen und deren Absorption nicht mitbestimmt wurde. Im Vergleich zur Bestimmung der Rotverschiebung der Oberflächenplasmonen Bande ($\Delta\lambda_{\text{Red}}$) in *Abbildung 7.15* ist hier kein $\Delta\lambda_{\text{Red}}$ zu erkennen, da von **84** und **83_{UoS}** ein abwechselndes Netzwerk aus Au- und Ag-NP aufgebaut wurde, in dem die Au-NP nicht in hinreichende räumliche Nähe zueinander gebracht werden. Damit ließ sich keine Rotverschiebung der Oberflächenplasmonen Bande beobachten. Die Absorption von **83_{UoS}** ließ sich nach der Aggregation nicht erkennen, da große Anteile der funktionalisierten Ag-NP in den assemblierten Aggregaten ausgefallen waren, so dass deren Absorption unterhalb der Detektionsgrenze lag.

Damit konnte bei den in *Abbildung 2.94* gezeigten Absorptionsspektren gezeigt werden, dass die DNA-funktionalisierten Au-NP **84** und DNA-funktionalisierten Ag-NP **83_{UoS}** nach Inkubation mit dem verbrückenden Oligonucleotid cA12cB12 als Aggregat ausfielen. Dieser Befund ist ein Hinweis auf die erfolgreiche Assemblierung eines hochmolekularen Aggregats aus **84** und **83_{UoS}**.

Zur weiteren Charakterisierung werden die Assemblierung von **84** mit **83_{UoS}** und **84** mit **83_{KIT}** mittels Agarose-Gelelektrophorese untersucht.

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden erneut Proben 1 bis 7 nach *Tabelle 2.5* vorbereitet und über zehn Tage im Dunkeln bei RT inkubiert. Zusätzlich wurde als Kontrolle eine achte Probe aus 10 fmol **84**, 10 fmol **86**, und 2 pmol cA12cB12 über zehn Tage im Dunkeln bei RT inkubiert. Danach wurden die Proben 1 bis 8 mit 0.75 μL Au-NP-Ladepuffer gemischt und in die Taschen eines 0.5% Agarose-Gels geladen. In *Abbildung 2.95* ist das 0.5% Agarose-Gel zur Charakterisierung der Assemblierung **84** mit **83_{UoS}** und **84** mit **83_{KIT}** gezeigt.

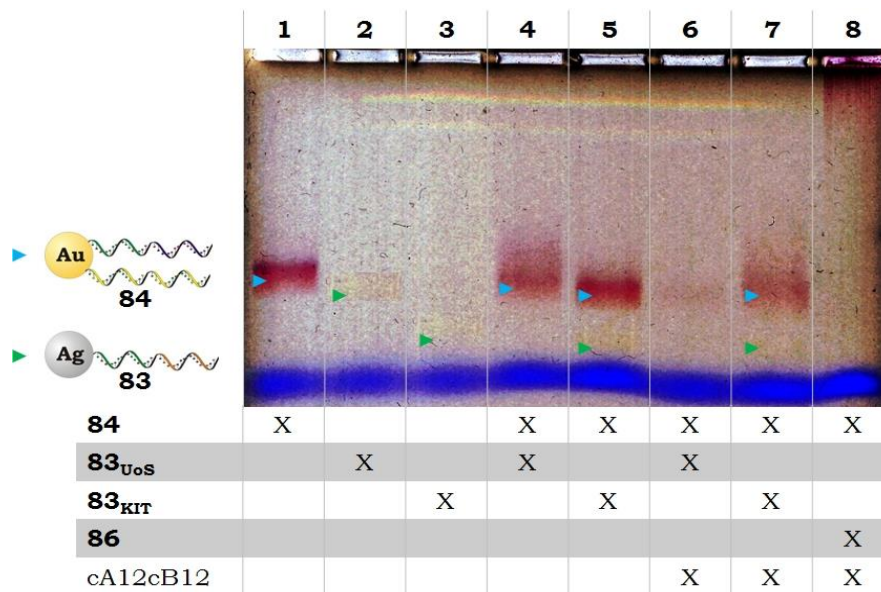


Abbildung 2.95: 0.5% Agarose Gel zur Charakterisierung der Assemblierung von **84** mit **83_{UoS}** und **84** mit **83_{KIT}** nach der Elektrophorese am Flachbettscanner dokumentiert. **1: 84, 2: 83_{UoS}, 3: 83_{KIT}, 4: 84 + 83_{UoS}, 5: 84 + 83_{KIT}, 6: 84 + 83_{UoS} + 20 eq cA12cB12, 7: 84 + 83_{KIT} + 20 eq cA12cB12 8: 84 + 86 + 20 eq cA12cB12.**

Bei der in *Abbildung 2.95* gezeigten Agarose-Gelelektrophorese-Analyse der Assemblierung von **84** mit **83_{UoS}** und **84** mit **83_{KIT}** lassen sich die roten Banden der Au-NP gut erkennen, wohingegen die gelben Banden der Ag-NP aufgrund der geringeren Extinktion (vergleiche *Abbildung 2.95*) nur schwer erkennbar sind.

In Spur 1 lässt sich eine rote Bande (▶) erkennen, der die DNA-funktionalisierten Au-NP **84** zugeordnet wurden.

In Spur 2 lässt sich eine gelbe Bande (▶) erkennen, der die DNA-funktionalisierten **83_{UoS}** zugeordnet wurden.

In Spur 3 lässt sich eine im Vergleich zu Spur 2 elektrophoretisch mobilere, gelbe Bande (▶) erkennen, der **83_{KIT}** zugeordnet wurden. Aufgrund des kleineren Partikeldurchmessers von **83_{KIT}** wandern diese schneller durch die Gelmatrix des Agarosegels als **83_{UoS}**.

In Spur 4 lässt sich eine verschmierte rote Bande (▶) erkennen, der **84** zugeordnet wurde. Die gelbe Bande der DNA-funktionalisierten Ag-NP war nicht zu erkennen, da sie von der intensiveren Bande der Au-NP überlagert wurde.

In Spur 5 lassen sich analog zu den Spuren 1 und 3 die Banden von **84** (▶) und **83_{KIT}** (▶) zuordnen.

In Spur 6 wurde zu den bereits in Spur 4 aufgetragenen DNA-funktionalisierten NP das verbrückende Oligonucleotid cA12cB12 geben. Infolge der Assemblierung von **84** mit **83_{UoS}** lassen sich in Spur 6 keine Nanopartikelbanden erkennen, da das disperse Aggregat aus **84** und **83_{UoS}** nicht in die Gelmatrix wandern konnte. Analog zum Elektrophoreseverhalten der Aggregate **87** und **89** in *Abbildung 2.92* zeigt sich in Spur 6 die Bildung eines hochmolekularen Aggregats aus DNA-funktionalisierten Ag- und Au-NP.

In Spur 7 wurden analog zu Spur 5 der gelben Bande (▶) **83_{KIT}** und der roten Bande (▶) **84** zugeordnet. In dieser Spur lässt sich kein Hinweis für die Assemblierung der DNA-funktionalisierten Ag- und Au-NP erkennen. Im Vergleich zu **83_{UoS}** assemblieren **83_{KIT}** nicht mit **84** und cA12cB12 zu einem hochmolekularen Aggregat.

In Spur 8 wurde als Positivkontrolle das Aggregat **87** assembliert. Wie in Spur 6 lassen sich keine Banden der eingesetzten Au-NP erkennen. Der rote Rückstand in der Geltasche zeigt deutlich, dass das hochmolekulare Aggregat nicht in das Gel gewandert ist. Dieser Befund zeigt deutlich, dass bei der Assemblierung von hochmolekularen NP-Aggregaten keine Banden der DNA-funktionalisierten NP in den entsprechenden Spuren des Gels beobachtet werden können.

Bei der Agarose-Gelelektrophorese zur Charakterisierung der Assemblierung von **84** mit **83_{UoS}** und **84** mit **83_{KIT}** zeigte sich die erfolgreiche Aggregation der DNA funktionalisierten Au-NP **84** mit den DNA funktionalisierten Ag-NP **83_{UoS}** und dem verbrückendem Oligonucleotid cA12cB12. Die Aggregation von **84** mit **83_{KIT}** ließ sich jedoch nicht erkennen.

Die aus **84** mit **83_{UoS}** assemblierten Aggregate konnten aufgrund ihrer geringen Löslichkeit nicht mittels DLS und TEM weiter charakterisiert werden. Bei der DLS fielen die Aggregate aus und der Laser bestimmte lediglich den hydrodynamisch Radius in Lösung verbliebener DNA-funktionalisierter NP. Bei der Vorbereitung der TEM-Proben bildeten die Aggregate große, vielschichtige NP-Aggregate, die vom Elektrodenstrahl nicht passiert werden konnten. Dadurch ließen sich keine TEM-Bilder aufnehmen.

Die geringe Löslichkeit der Aggregate aus **84** mit **83_{UoS}** war zudem ein erhebliches Hindernis für die Assemblierung der Nanopartikel-Protein Hybride **85**.

Bei der Assemblierung der Gesamtstruktur aus **79c** **84** mit **83_{UoS}** und cA12cB12 bildete sich ein schwarzer Niederschlag und die Lösung entfärbte sich. Das war ein deutliches Anzeichen für das Ausfallen der assemblierten **85**. Variation der Puffer- und Assemblierungsbedingungen verbesserten die Löslichkeit der Aggregate nicht, so dass die ausgefallenen Aggregate nicht weiter charakterisiert werden konnten. Ein weiteres Problem bestand in der langen Inkubationszeit bei der Assemblierung der Aggregate. Durch die für die Stabilisierung der DNA-funktionalisierten notwendige Reduzierung der NaCl-Konzentration musste die Inkubationszeit auf zehn Tage erhöht werden. Jedoch waren die DNA-FP-Konjugate **79c** bei RT für diesen Zeitraum nicht Lagerstabil.

Die Nanopartikel-Protein Hybride **85** konnte nicht vollständig assembliert werden. Infolge der Aggregation sank die Löslichkeit von **85** soweit, dass eine Charakterisierung nicht möglich war. Für weitere Experimente zur Assemblierung von **85** müsste die Salzstabilität der DNA-funktionalisierten Ag-NP gesteigert werden, um ein besser lösliches Aggregat aufzubauen. Zudem sollten lagerstabilere DNA-FP-Konjugate ausgewählt werden, die unter den lange Inkubationszeiten zum Aufbau der Nanopartikel-Protein Hybride bei RT weniger schnell gespalten werden.

3 Zusammenfassung und Ausblick

Die Nanobiotechnologie hat sich zu einem eigenständigen und stetig wachsenden Forschungsgebiet etabliert, das sich unter anderem mit der Assemblierung biologischer Moleküle im Nanometerbereich beschäftigt. Eine zentrale Rolle spielen in diesem Gebiet halbsynthetische DNA-Protein-Konjugate,^[16,23] aus denen vielfältige supramolekulare DNA-Protein-Nanostrukturen aufgebaut werden. Diese Nanostrukturen finden Verwendung als Netzwerk zur Immobilisierung von Sonden für die Nucleinsäure- und Proteindetektion,^[38] als Rückgrat von molekularen Maschinen (siehe *Abbildung 1.6* und *Abbildung 2.48*), als Modellstrukturen^[58] bei der Weiter- und Neuentwicklung von analytischen Messmethoden im nm-Auflösungsbereich (zum Beispiel bei SERRS, TEFM und SNIM), als Überstruktur zur Adressierung und Kaskadierung von Enzymen^[234-235] oder als Bausteine von DNA-Origamis.^[29]

Die Spezifität der Hybridisierung von komplementären DNA-Oligonucleotiden wird gegenwärtig erfolgreich für die Assemblierung komplexer, dreidimensionaler Nanostrukturen und das Design bioanalytischer Systeme genutzt. Alternativ findet die einzigartig hohe Bindeaffinität von D-Biotin zu STV standardisierten Einsatz bei der Assemblierung von biologischen Nanostrukturen, da eine Vielzahl von biotinylierten Strukturbausteinen kommerziell angeboten werden. Eine große Zahl von vielversprechenden Neuentwicklungen im Bereich der Nanobiotechnologie stehen in Verbindung mit der Verfügbarkeit neuer DNA-Protein-Konjugate und aus diesen aufgebauter Nanostrukturen. Darum standen die Darstellung und der gerichtete Aufbau von DNA-Protein-Konjugaten im Mittelpunkt dieser Dissertation.

Zunächst wurde in dieser Arbeit DNA-STV-Konjugate zur Assemblierung von supramolekularen DNA-Proteinkonjugaten bereitgestellt (Kapitel 2.1.1). Es wurde die erfolgreiche DNA-STV-Konjugatsynthese und Charakterisierung mit den STV-Mutanten nSTV, nSTV-SH STV-TCH und mSTV gezeigt.

Im Besonderen die DNA-mSTV-Konjugate **32** erlaubten den hochspezifischen Aufbau von Nanostrukturen in Folge der Bindung von einem weiteren komplementären und einem biotinylierten Baustein (siehe *Abbildung 1.15*). Nach ersten Experimenten zur Assemblierung von DNA-STV-Nanohanteln **39** und Nanodoppelhanteln **40** (Kapitel 2.2.2) wurde deutlich, dass die bei der DNA-mSTV-Konjugatsynthese als Nebenprodukt gebildeten Konjugatdimere (**32**)₂ den gerichteten Aufbau der Nanostrukturen behindern und zur ungerichteten Assemblierung von Strukturen aus einer Vielzahl von Konjugatbausteinen führten.

Diese schon 1994 von Niemeyer *et al.*^[44] beobachteten Konjugatdimere und -oligomere mussten für den Nanostrukturaufbau von den Konjugatmonomeren abgetrennt werden. Alternativ mussten die Anteile der gebildeten Konjugatdimere bei der Konjugatsynthese deutlich reduziert werden. Darum wurden zunächst unterschiedliche heterobispezifische Crosslinker auf ihre Eignung zur Reduzierung der Bildung von Konjugatdimeren untersucht (Kapitel 2.1.2). Mit dem Crosslinker

SM(PEG)₄ konnte der Konjugatdimeranteil auf ca. 4% gesenkt werden, jedoch zeigten erneute Experimente zur Assemblierung der DNA-mSTV-Nanohantel **38**, dass eine vollständige Abtrennung der Konjugatdimere notwendig war.

Zu diesem Zweck wurden unterschiedliche chromatographische Methoden für ihre Eignung zur Auftrennung von DNA-mSTV-Konjugatmonomeren und-dimeren untersucht (Kapitel 2.1.3). Dabei wurde die Asymmetrischen-Feld-Flussfeldfraktionierung (AF4) als bestgeeignetes System ausgewählt. Mittels präparativer AF4 (pAF4) konnten DNA-mSTV-Konjugatdimere abgetrennt werden und mit den isolierten Konjugatmonomeren DNA-STV-Nanostrukturen aufgebaut werden.

Unter Verwendung der pAF4 aufgereinigten DNA-nSTV-Konjugatmonomere und-dimere wurden die Ursachen der Dimerisierung bei der Konjugatsynthese vorwiegend mittels SDS-PAGE und analytischer AF4 (aAF4) untersucht (Kapitel 2.1.4). Die Befunde zeigten, dass STV-Untereinheiten infolge der Derivatisierung mit Crosslinker kovalent verknüpft werden. Dabei werden zu großen Anteilen Untereinheiten innerhalb eines STV-Moleküls verknüpft. Werden jedoch Untereinheiten intramolekular zwischen zwei STV-Molekülen verknüpft entstanden Konjugatdimere, die dann anschließend abgetrennt werden mussten. Hierbei zeigte sich der große Vorteil der invertierten DNA-STV-Konjugatsynthesestrategie von STV-Mutanten mit einem rekombinant eingeführten Cysteinrest (wie nSTV-SH und STV-TCH), bei der STV nicht mit Crosslinker derivatisiert werden musste.

Die mittels pAF4 aufgereinigten DNA-mSTV-Konjugate wurden dann zu hantelförmigen **38**, doppelhantelförmigen **1**, **2** und Y-förmigen **3** Nanostrukturen assembliert (Kapitel 2.2). Zur Charakterisierung der Nanostrukturen wurden die DNA-mSTV-Konjugate mit biotinylierten Fluoreszenzfarbstoffen markiert und nach der Assemblierung mittels aAF4 detektiert und quantifiziert.

Der erfolgreiche Aufbau der Nanostrukturen **1** bis **3** unterlag jedoch einer deutlichen Limitierung in der Komplexität der assemblierten Strukturen. Infolge sterischer Hinderung und elektrostatischer Abstoßung bei der Assemblierung am zentralen DNA-mSTV-Konjugat konnten die doppelhantelförmigen Nanostrukturen **1** und **2** zu nur geringen Anteilen und die Y-förmigen Nanostruktur **3** nur unvollständig aufgebaut werden. Ein ähnlicher Befund wurde bei der Assemblierung der Nanostruktur **4** auf Basis von trivalentem STV **56** beobachtet (Kapitel 2.2.8). Hier konnte **56** in einer dreistufigen Konjugatsynthese erfolgreich dargestellt werden und die separate Assemblierung der einzelnen Konjugatbausteine konnte gezeigt werden. Jedoch konnte **4** nicht vollständig aufgebaut werden, da vermutlich durch sterischer und elektrostatische Effekte am trivalenten STV die Assemblierung der Gesamtstruktur behindert wurde. Es muss beim Aufbau der Nanostrukturen **1** – **4** deutlich darauf hingewiesen werden, dass die Peak- und Bandenzuordnungen aufgrund der Vielzahl möglicher gebildeter Konjugatspezies und Nanostrukturen mit ähnlichen hydrodynamischen Radien/Volumen mit einem Unsicherheitsfaktor verbunden sind.

Nanostrukturen mit geringerem sterischen Anspruch infolge größerer Abstände zwischen den gebundenen STV-Molekülen, wie die Y-DNA-Motiv-DNA-mSTV-Nanostruktur **49** (Kapitel 2.2.7) und DNA-mSTV-Hanteln **75** und **77** mit längeren DNA-Abstandshaltern (siehe Kapitel 2.3) konnten dagegen mit hohen Ausbeuten assembliert werden.

Zusätzlich zu **75** und **77** wurden im Rahmen des SMD-Projektes die zuvor entwickelten DNA-FP-Nanohanteln **81** und **82** weiterentwickelt und darüber hinaus Konzepte zur Integration der Konjugate in Nanopartikel-Architekturen erprobt. Das Design der Nanopartikel-Protein Hybride **85** konnte nicht vollständig charakterisiert werden. Hier wurden DNA-mono- und DNA-bifunktionalisierte Au-NP erfolgreich über ein verbrückendes Oligonucleotid mit einem DNA-EGFP-Konjugat zu einem hochmolekularen Aggregat **89** aufgebaut. Jedoch konnte nach Ersetzen der DNA-mono-funktionalisierten Au-NP **86** durch Ag-NP **83** beobachtet werden, dass daraus aufgebaute Aggregate ausfielen. Ursache war die niedrige Stabilität von **83** gegenüber der für die Assemblierung notwendigen Na⁺-Ionen. Die Aggregate aus DNA-funktionalisierten Ag- und Au-NP konnten nur begrenzt charakterisiert werden und der Einbau von DNA-FP-Konjugaten war wegen der langen notwendigen Inkubationszeit des Aggregats nicht möglich.

Die in dieser Arbeit gezeigten DNA-Protein-Konjugatsynthesen und aus den Konjugaten aufgebauten Nanostrukturen erweitern die Anwendungsmöglichkeiten von DNA-Protein-Konjugaten im breiten Feld der Nanobiotechnologie. Im speziellen konnte deutlich gezeigt werden, dass bei der Derivatisierung von STV mit unterschiedlichen Crosslinkern durch Nebenreaktionen Proteinuntereinheiten in intra- und intermolekularen Reaktionen kovalent miteinander verknüpft werden. Diese veränderten Struktureigenschaften müssen beim zukünftigen Einsatz von DNA-STV-Konjugaten berücksichtigt werden. Dieses betrifft im Speziellen den nachträglichen Austausch von STV-Monomeren analog zu der von Howarth *et al.*^[135] beschriebenen Technik zur Darstellung von mSTV.

Des Weiteren wird anhand der assemblierten Nanostrukturen **1** bis **4** deutlich, dass der Aufbau von Nanostrukturen um ein zentrales DNA-STV-Konjugat durch sterische Hinderung und elektrostatische Abstoßung stark limitiert ist. Dadurch konnte die vollständige Assemblierung nur bei Nanostrukturen aus maximal drei Konjugaten beobachtet werden (Nanodoppelhanteln). Zusätzlich konnten bei über C-terminale Cysteinreste gebundene Oligonucleotide im Vergleich zu Oberflächenamini-gebundene und Biotin-gebundene Oligonucleotide mehr Hybridisierungen zu einem komplementären DNA-STV-Konjugat in sterisch anspruchsvollen Strukturen beobachtet werden. Dieses zeigte den Vorteil eines längeren Spacers (hier der C-Terminus mit His₆-Tag und TEV-Schnittstelle) beim Aufbau komplexer DNA-STV-Nanostrukturen.

Für das Design zukünftiger Nanostrukturen müssen längere Abstände zwischen den DNA-STV-Konjugaten gewählt werden (wie bei der Y-DNA-Motiv-DNA-mSTV-Nanostruktur), um den Aufbau der Gesamtstruktur zu ermöglichen. Zudem ließe sich durch die Verwendung eines monovalenten STV mit einer C-terminalen Cys-Mutation (mSTV-SH) eine deutliche experimentelle Erleichterung bei der Konjugatsynthese und beim Aufbau supramolekularer DNA-STV-Nanostrukturen erzielen. mSTV-SH könnte durch eine Abwandlung der von Howarth *et al.*^[135] etablierten Strategie zu Herstellung von mSTV bereitgestellt werden. Drei Äquivalente dSTV müssten mit einem Äquivalent einer STV-Mutante mit C-terminalen His₆-Tag und einem Cystenrest vereint, entfaltet und anschließend renaturiert werden. Aus der dabei entstehenden STV-Mutanten-Mischung ließe sich mittels Ni-NTA-Chromatographie mSTV-SH aufreinigen. Durch die invertierte Konjugatsynthese mit mSTV-SH könnte dann die Dimerisierung der Produkte vermieden werden (keine pAF4 notwendig). Durch die C-terminale Oligonucleotidverknüpfung wäre auch bei sterisch anspruchsvollen Bindungen die Hybridisierung effizienter (auch bei DNA-Origami von Vorteil). Zudem lässt sich vermuten, dass DNA-mSTV-SH-Konjugate wegen der fehlenden TEV-Schnittstelle lagerstabiler wären als DNA-STV-TCH-Konjugate.

4 Materialien und Methoden

4.1 Chemikalien und Puffer

Alle in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen ABCR (Karlsruhe, D), Acros (Geel, B), AppliChem (Darmstadt, D), AttoTec (Siegen, D) Biorad (München, D), Fermentas (St. Leon-Rot, D), Fluka (Steinheim, D), Invitrogen (Karlsruhe, D), Merck (Darmstadt, D), Pierce (Rockford, USA), Roth (Karlsruhe, D), Sigma-Aldrich (Steinheim, D), Thermo (St. Leon-Rot, D) oder VWR (Leuven, B) bezogen. Es wurde ausschließlich bidestilliertes Wasser eingesetzt, das zuvor mit einem MillQ BioCell System (Millipore) gereinigt wurde.

4.1.1 Pufferrezepte

Tabelle 4.1: Zusammensetzung der verwendeten Puffer.

Lösung	Konzentrationen	Herstellung und Einwaage
Phosphatstammlösung (PB)	1.0 mol/L Phosphat	Puffer mit K (für 1.0mL): 174.18 g K_2HPO_4 (MW = 174.18 g/mol) 136.09 g KH_2PO_4 (MW = 136.09 g/mol) für 1.0 L:
PB	0.1 mol/L PB,	100.0 mL der Phosphatstammlösung werden nach gewünschte pH wie in <i>Tabelle 4.2</i> angeben gemischt. Volumen auf 1.0 L mit H_2O auffüllen.
PBS	0.1 mol/L PB, 0.15 mol/L NaCl	Das Rezept ist analog zum Ansetzen von Phosphatpuffer (PB) zusätzlich erfolgt die Zugabe von 8.77 g NaCl (MW = 58.44 g/mol) zu 1.0 L PB
PBS-Mg	0.1 mol/L PB, 0.15 mol/L NaCl 0.0125 mol/L $MgCl_2$	Das Rezept ist analog zum Ansetzen von Phosphatpuffer (PBS) zusätzlich erfolgt die Zugabe von 1.19 g $MgCl_2$ (MW = 95.21 g/mol) zu 1.0 L PBS
PBSE	0.1 mol/L PB, 0.15 mol/L NaCl, 0.005 mol/L EDTA	Das Rezept ist analog zum Ansetzen von Phosphatpuffer (PBS) zusätzlich erfolgt die Zugabe von 1.86 g EDTA (MW $[Na_2-EDTA \cdot 2H_2O]$ = 372.24 g/mol) zu 1.0 L PBS
TE	10.0 mmol/L Tris-Cl, 1.0 mmol/L EDTA	für 500.0 mL: 0.61 g Tris (MW = 121.14 g/mol) und 0.19 g EDTA (MW = 372.24 g/mol)
Tris A	0.02 mol/L Tris	für 1.0 L: 2.42 g Tris (MW = 121,14 g/mol)
Tris B	0.02 mol/L Tris, 1.0 mol/L NaCl	für 1.0 L: 2.42 g Tris (MW = 121.14 g/mol) und 58.44 g NaCl (MW = 58.44 g/mol)
TBE 5x (pH 8.0)	445.0 mmol/L Tris-HCl, 445.0 mmol/L Borsäure, 10.0 mmol/L EDTA	für 0.5 L: 26.95 g Tris (MW = 121.14 g/mol), 13.75 g Borsäure (MW = 61.83 g/mol) und 1.86 g EDTA (MW = 372.24 g/mol)
TBE-Mg 5x (pH 8.0)	200.0 mmol/L Tris-HCl, 100.0 mmol/L Borsäure, 10.0 mmol/L EDTA, 62.5 mmol/L $Mg(AcO)_2 \cdot 4H_2O$	für 0.5 L: 24.2 g Tris (MW = 121.14 g/mol), 6.18 g Borsäure (MW = 61.83 g/mol) 1.86 g EDTA (MW = 372.24 g/mol) und 13.40 g $Mg(AcO)_2 \cdot 4H_2O$ MW = 214.46 g/mol)
Trenngel-Puffer (pH 8.8)	1.5 mol/L Tris-Cl	für 50 mL: 9.09 g Tris (MW = 121.14 g/mol)
Sammelgel-Puffer (pH 6.8)	1.0 mol/L Tris-Cl	für 25 mL: 3.03 g Tris (MW = 121.14 g/mol)
Laufpuffer für nicht denaturierende PAGE	25.0 mmol/L Tris-Cl, 192.0 mmol/L Glycin	für 1.0 L: 3.03 g Tris (MW = 121.14 g/mol) 14.41 g Glycin (MW = 75.07 g/mol)

Lösung	Konzentrationen	Herstellung/Einwaage/Lagerung
Laufpuffer für nicht denaturierende PAGE mit Mg	25.0 mmol/L Tris-Cl, 192.0 mmol/L Glycin 12.5 mmol/L Mg(AcO) ₂ *4H ₂ O	für 1.0 L: 3.03 g Tris (MW = 121.14 g/mol) 14.41 g Glycin (MW = 75.07 g/mol) 2.68 g Mg(AcO) ₂ *4H ₂ O (MW = 214.46 g/mol)
TBS (pH 7.35)	20.0 mmol/L Tris-Cl, 150.0 mmol/L NaCl	für 500.0 mL: 1.21 g Tris (MW = 121.14 g/mol) und 4.39 g NaCl (MW = 58.44 g/mol)
TETBS (pH 7.5)	20.0 mmol/L Tris-Cl, 150.0 mmol/L NaCl, 5.0 mmol/L EDTA, 0.05 Vol% Tween-20	für 1.0 L: 2.42 g Tris (MW = 121.14 g/mol), 8.77 g NaCl (MW = 58.44 g/mol), 1.86 g EDTA (MW = 372.24 g/mol) und 0.5 mL Tween-20
TETBS 300 (pH 7.5)	20.0 mmol/L Tris-Cl, 300.0 mmol/L NaCl, 5.0 mmol/L EDTA, 0.05 Vol% Tween-20	für 1.0 L: 2.42 g Tris (MW = 121.14 g/mol), 17.53 g NaCl (MW = 58.44 g/mol), 1.86 g EDTA (MW = 372.24 g/mol) und 0.5 mL Tween-20
TEPBS (pH 7.5)	100.0 mmol/L Phosphat, 150.0 mmol/L NaCl, 5.0 mmol/L EDTA, 0.05 Vol% Tween-20	Das Rezept ist analog zum Ansetzen von 1.0 L Phosphatpuffer (PB) zusätzlich erfolgt die Zugabe von 8.77 g NaCl (MW = 58.44 g/mol), 1.86 g EDTA (MW = 372.24 g/mol) und 0.5 mL Tween-20
TEPBS 300 (pH 7.5)	100.0 mmol/L Phosphat, 300.0 mmol/L NaCl, 5.0 mmol/L EDTA, 0.05 Vol% Tween-20	Das Rezept ist analog zum Ansetzen von 1.0 L Phosphatpuffer (PB) zusätzlich erfolgt die Zugabe von 17.53 g NaCl (MW = 58.44 g/mol), 1.86 g EDTA (MW = 372.24 g/mol) und 0.5 mL Tween-20
biotin-TETBS (pH 7.5)	20.0 mmol/L Tris-Cl, 150.0 mmol/L NaCl, 5.0 mmol/L EDTA, 0.05% Tween-20, 800 µmol/L Biotin	für 1.0 L: 2.42 g Tris (MW = 121.14 g/mol), 8.77 g NaCl (MW = 58.44 g/mol), 1.86 g EDTA (MW = 372.24 g/mol), 50 mL Tween-20 und 195.5 mg D-Biotin (MW = 244.31 g/mol)
MESTBS (pH 7.35)	20.0 mmol/L Tris-Cl, 150.0 mmol/L NaCl, 5.0 mmol/L EDTA, 0.2 Gew% NaN ₃ , 4.5 Gew% Milchpulver, 1.0 mg/mL DNA	für 200.0 mL: 0.48 g Tris (MW = 121.14 g/mol), 1.75 g NaCl (MW = 58.44 g/mol), 37.0 mg EDTA (MW = 372.24 g/mol), 400 mg NaN ₃ , 9.0 g Milchpulver und 20 mL Heringssperma-DNA (10 mg/L Lösung)
RDB (pH 7.35)	20.0 mmol/L Tris-Cl, 150.0 mmol/L NaCl, 5.0 mmol/L EDTA, 0.02 Gew% NaN ₃ , 0.45 Gew% Milchpulver, 0.1 mg/mL DNA	für 200.0 mL: 0.48 g Tris (MW = 121.14 g/mol), 1.75 g NaCl (MW = 58.44 g/mol), 37.0 mg EDTA (MW = 372.24 g/mol), 40 mg NaN ₃ , 900 mg Milchpulver und 2 mL Heringssperma-DNA (10 mg/L Lösung)
biotin-RDB (pH 7.35)	20.0 mmol/L Tris-Cl, 150.0 mmol/L NaCl, 5.0 mmol/L EDTA, 0.02 Gew% NaN ₃ , 0.45 Gew% Milchpulver, 0.1 mg/mL DNA, 800 µmol/L Biotin	für 200.0 mL: 0.48 g Tris (MW = 121.14 g/mol), 1.75 g NaCl (MW = 58.44 g/mol), 37.0 mg EDTA (MW = 372.24 g/mol), 40 mg NaN ₃ , 900.0 mg Milchpulver, 2 mL Heringssperma-DNA (10 mg/L Lösung) und 39.1 mg D-Biotin (MW = 244.31 g/mol)

Lösung	Konzentrationen	Herstellung/Einwaage/Lagerung
Coomassie Lösung	2.0 Gew% Coomassie 10.0 Vol% AcOH 40.0 Vol% EtOH	für 0.5 L: 2 g Coomassie Blau G 250 (MW = 854.02), 50 mL Essigsäure (99 %) und 200 mL Ethanol
Maniatis 5x	0.125 mol/L Tris-Cl, 1.25 mol/L Tris-Cl, 0.5 Gew% SDS	für 10.0 L: 151.0 g Tris (MW = 121.14 g/mol), 940 g Glycin (MW = 75.07 g/mol) und 50 g SDS (MW = 288.4 g/mol)
Au-NP-Ladepuffer	20.0 Vol% Glycerin Bromphenolblau	für 10.0 mL: 2.0 mL Glycerin (MW = 92.09 g/mol) und Spatelspitze Bromphenolblau
SDS-Probenpuffer 4x (pH 6.8)	0.5 mol/L Tris 20 Vol% Glycerin 4.0 Gew% SDS 5.0 Vol% MeSH Bromphenolblau	Für 10.0 mL: 0.61 g Tris (MW = 121.14 g/mol), 2 mL Glycerin (MW = 92.09 g/mol), 0.4 g SDS (MW = 288.4 g/mol), 500 µL Mercaptoethanol und Spatelspitze Bromphenolblau
Salzstammlösung (20x)	2.0 mol/L NaCl	für 0.5 L: 58.44 g NaCl (MW = 58.44 g/mol)
Lagerpuffer für AF4	0.1 mol/L NaCl, 0.02 Gew% NaN ₃	für 1.0 L: zu 50.0 mL der Salzstammlösung werden 0.2 g NaN ₃ gegeben und das Volumen wird auf 1.0 L mit H ₂ O aufgefüllt.
Spüllösung für AF4	0.2 Gew% SDS, 0.2 mol/L NaOH	Für 1.0 L: 2.0 g SDS (MW = 288.4 g/mol) und 8.0 g NaOH (MW = 40.0 g/mol)

Tabelle 4.2: *pH-Wert Voreinstellung durch Variation der Phosphatstammlösungen.*

Gewünschter pH-Wert des PB (Endkonzentration 0.1 mol/L) bei Verwendung der Pufferrezepte für 1.0 mol/L Phosphatlösungen siehe Tabelle 4.1	KH₂PO₄	K₂HPO₄	H₂O
5.7	93.5	6.5	900.0
5.8	92.0	8.0	900.0
5.9	90.0	10.0	900.0
6.0	87.7	12.3	900.0
6.1	85.0	15.0	900.0
6.2	81.5	18.5	900.0
6.3	77.5	22.5	900.0
6.4	73.5	26.5	900.0
6.5	68.5	31.5	900.0
6.6	62.5	37.5	900.0
6.7	56.5	43.5	900.0
6.8	51.0	49.0	900.0
6.9	45.0	55.0	900.0
7.0	39.0	61.0	900.0
7.1	33.0	67.0	900.0
7.2	28.0	72.0	900.0
7.3	23.0	77.0	900.0
7.4	19.0	81.0	900.0
7.5	16.0	84.0	900.0
7.6	13.0	87.0	900.0
7.7	10.5	89.5	900.0
7.8	8.5	91.5	900.0
7.9	7.0	93.0	900.0
8.0	5.3	94.7	900.0

4.1.2 Proteine

Tabelle 4.3: Wichtige Eigenschaften der verwendeten Proteine.

Protein	Streptavidin (STV) ^[131]	monovalentes, rotes Fluoreszenzprotein von <i>Discosoma</i> (mDsRed) ^[212]	grünes Fluoreszenzprotein der 2. Generation (EGFP) ^[213]
PDB ID	3RY2	1ZGO	2Y0G
Masse	ca. 63000 g/mol	ca. 26000 g/mol	ca. 28000 g/mol
ϵ / L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹	142400	27300	56000
λ_{Ext} / nm	280	558	488
λ_{EM} / nm	350	583	508
Isoelektrischer Punkt pI	6.4	7.8	6.1
Lagerung	-80 °C	-80 °C	-80 °C
optimaler Puffer nach Konjugation	PBS oder TE	TE	TE
optimaler pH	6 – 8.5	6.5 – 7.5	6.5 – 8.0

4.1.3 Oligonucleotide

In *Tabelle 4.4* sind alle verwendeten Oligonucleotide zusammengefasst. Sämtliche Oligonucleotide wurden bei Sigma-Aldrich synthetisiert, HPLC gereinigt und lyophilisiert.

Die Oligonucleotide mit Sequenzen F1, F5, F9 und F10 und die dazu komplementären Oligonucleotide cF1, cF5, cF9 und cF10 trugen zur Synthese von DNA-STV-Konjugaten entweder eine 5'-NH₂-Modifikation an einem C₆-Linker (F1, F9 und cF9) oder eine 5'-Thiol-Modifikation an einem C₆-Linker (alle F-Sequenz Oligonucleotide). Alle F-Sequenzen Oligonucleotide wurden zusätzlich mit einer 5'-Biotin Modifikation an einem C₆-Linker bezogen und zur DNA-Funktionalisierung von STV und DNA-STV-Konjugaten in der Gelelektrophorese oder für die Generierung von supramolekularen Nanostrukturen verwendet. Die Sequenz F10 wurde zur Fluoreszenzmarkierung bei der Verwendung in supramolekularen DNA-STV Nanostrukturen mit einer Cy3-Markierung am 3'-Ende verwendet.

Die Oligonucleotide mit A24-Sequenz trugen zur Synthese von DNA-FP Konjugaten eine 5'-NH₂ Modifikation an einem C₆-Linker.

Die Oligonucleotide mit cA24-, A12- und B12-Sequenz trugen zur Modifikation von Au-NP entweder eine 5'- oder eine 3'-Thiol-Modifikation an einem C₆-Linker.

Alle eingesetzten Primersequenzen waren am 5'-Ende biotinyliert.

Alle aufgeführten Oligonucleotide wurden in einer Konzentration von 100 µmol/L in ddH₂O gelöst, in 100 µL Aliquote aufgeteilt und bei -20 °C (bei schneller Weiterverwendung) oder -80 °C (bei längerer Lagerung) gelagert.

Tabelle 4.4: Sequenzen der verwendeten Oligonucleotide.

Oligonucleotid-Name	Sequenz
für DNA-Protein-Konjugate	
F1	5'-CCT GCG TCG TTT AAG GAA GTA C-3'
cF1	5'-GTA CTT CCT TAA ACG ACG CAG G-3'
F5	5'-GGT CCG GTC ATA AAG CGA TAA G-3'
cF5	5'-CTT ATC GCT TTA TGA CCG GAC C-3'
F9	5'-GTG GAA AGT GGC AAT CGT GAA G-3'
cF9	5'-CTT CAC GAT TGC CAC TTT CCA C-3'
F10	5'-GGA CGA ATA CAA AGG CTA CAC G-3'
cF10	5'-CGT GTA GCC TTT GTA TTC GTC C-3'
für Y-DNA-Motiv	
F9-Y_a	5'-GTG GAA AGT GGC AAT CGT GAA GTG GAT CCG CAT GAC ATT CGC CGT AAG-3'
F9-Y_b	5'-GTG GAA AGT GGC AAT CGT GAA GCT TAC GGC GAA TGA CCG AAT CAG CCT-3'
F9-Y_c	5'-GTG GAA AGT GGC AAT CGT GAA GAG GCT GAT TCG GTT CAT GCG GAT CCA-3'
für Nanopartikel-Protein Hybride	
A24 (FP)	5'-AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA-3'
cA24 (Au-NP)	5'-TCC TGT GTG AAA TTG TTA TCC GCT-3'
A12 (Au-NP))	5'-GCA CTT GAG AGC TTT TTT TTT TTT-3'
B12 (Ag-NP)	5'-TTT TTT TTT TTT GGT GAA GAG ATC-3'
cA12cB12	5'-GCT CTC AAG TGC GAT CTC TTC ACC-3'
für PCR der bisbiotinylierten 255- und 486- ds Oligonucleotide	
Templat	pUC19
S 255	5'-ATT GTT GCC GGG AAG CTA GAG TAA GTA-3'
A 255	5'-TAT GCA GTG CTG CCA TAA CCA TGA-3'
S486	5'-GTA ATC ATG GTC ATA GCT GTT-3
A486	5'-CCT GTC GGG TTT CGC CAC CTC-3'

4.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4.5: Aufstellung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Material	Hersteller
Membranfilter: Ø=0.2 µm	Sartorius (Göttingen, D)
Stericup & Steritop™: Ø=0.1 µm	Millipore (Billerica, USA)
Pipettenspitzen: 10 µL, 200 µL und 1 mL	VWR (Darmstadt, D)
Einwegspritzen: 1 mL, 2 mL und 5 mL	Fleischhacker (Schwerte, D)
Kanülen: Ø=0.8 mm x 120 mm	Fleischhacker (Schwerte, D)
BD Falcon™ tube: 15 mL und 50 mL	Fischer (Schwerte, D)
Illustra NAP-5 und NAP-10	GE Healthcare (München, D)
PP-Röhrchen: 6 mL und 15 mL	Greiner bio one (Frickenhausen, D)
Vivaspin 6: 10000 und 30000 MWCO	Sartorius (Göttingen, D)
Vivaspin 500: 10000 und 30000 MWCO	Sartorius (Göttingen, D)
Vivaspin 15R: 10000 und 30000 MWCO	Sartorius (Göttingen, D)
Eppendorf Reaktionsgefäße: 0.5, 1.5 und 2.0 mL	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, D)
F16-Module; Maxisorp schwarz	Thermo (Soeborg, DK)
F96-Platten; Polypropylen transparent	Thermo (Soeborg, DK)
Montage™ DNA Gel Extraction Kit	Millipore (Billerica, USA)
ChIP DNA Clean & Concentrator™	Zymo Research (Irvine, USA)
Onlinefilter	Postnova Analytics (Landsberg, D)
Flusskanalmembran RC 10000 MWCO	Postnova Analytics (Landsberg, D)
PCR-Reaktionsgefäße: 200 µL	Biozym (Oldendorf, D)
HPLC-Gefäße 1.5mL und 10.0 mL	Postnova Analytics (Landsberg, D)
HPLC-Gefäßeinsätze für 200 µL	Agilent (Böblingen, D)
TEM-Gitter	Plano (Wetzlar, D)

4.3 Instrumentierung

Tabelle 4.6: Aufstellung der verwendeten Geräte.

Gerät	Hersteller	Bautyp	Software
Asymmetrisches-Fluss-Feldflussfraktiometer	Postnova Analytics (Landsberg a. Lech, D)	AF2000	AF 2000 Control
UV-Vis-Spektrometer	Varian (Palo Alto, USA)	Cary 100 Bio	Cary WinUV 3.0
Multititerplatten-Lesegerät	BioTek (Bad Friedrichshall, D)	Synergy 2	Gen5™ Data Analysis
FPLC	Amersham Pharmacia (Glattbrugg, CH)	Äkta Purifier	Unicorn 4.00.16
HPLC	Agilent (Böblingen, D)	1100 Serie	Chem Station Reversionsnummer A.10.01
Geldokumentation	Biozym (Hessisch Oldendorf, D)	Alphaimager 2200	AlphaEaseFC 3.2.1
DLS	Malvern (Herrenberg, D)	Zetasizer Nano S	21CFR part 11
TEM	Philips (Hamburg, D)	FEI CM200	ImageQuant TL
AFM	Veeco Metrology (Santa Barbara, USA)	Nanoscope IV	NanoScope 6.14
Fluoreszenzgelscanner	Amersham Biosciences (Glattbrugg, CH)	TyphoonTrio+	ImageQuant TL
Fluoreszenzbildgerät	LaVision Biotec (Bielefeld, D)	Bioanalyzer 4F	
Thermoschüttler	Lab-4you (Wien, A)	Ts-100	
PCR	MJ Research (St. Bruno, Canada)	PTC-200 Thermo Cycler	
Flachbettscanner	Canon (Krefeld, D)	8800 F	
Glovebox	MECAPLEX (Grenchen, CH)	GB 3111 "S1"	
Tischzentrifugen	Eppendorf (Hamburg, D)	C5804R und 5415R	
Kolbenhubpipetten	Eppendorf (Hamburg, D)	Research und Research Plus	
pH-Meter	Knick (Berlin, D)	765 climatic	
Magnetrührer	IKA (Staufen, D)	RCT b	
Ultraschallbad	Bandelin (Berlin, D)	Sonore X	
Schüttler	Heidolph (Schwabach, D)	Unimax 1010	
PAGE-Gelpräparation	Biozym (Hessisch Oldendorf, D)	Mini-PROTEAN Tetra Cell	
Agarose-Gelpräparation	Febikon (Wermelskirchen, D)	E-H6	

4.3.1 Chromatographie

Aufreinigung aller dargestellten DNA-Protein-Konjugate erfolgte an der FPLC-Anlage Äkta Purifier von Amersham Pharmacia Biotech, welche durch ein Kühlkabinett Unichromat 1500 auf 4° C temperiert war. Als stationäre Phase diente eine Anionenaustauschsäule MonoQ 5/5 HR von GE Healthcare (München, D). Die Flussrate der mobilen Phase betrug dabei 1.0 mL/min. Das Flussprofil bei der Aufreinigung von STV-DNA-Konjugaten ist in *Tabelle 4.7* aufgeführt.

Tabelle 4.7: NaCl-Gradient bei der Anionenaustauschchromatographie an der FPLC von DNA-STV Konjugaten (links) und DNA-FP Konjugaten (rechts).

V / mL	c _{NaCl} / mol/L	V / mL	c _{NaCl} / mol/L
0.0-5.0	0.3	0.0-5.0	0.3
5.0-6.0	0.3-0.42	5.0-6.0	0.3-0.45
6.0-21.0	0.42-0.54	6.0-18.0	0.45-0.5
21.0-28.0	0.54-1.0	18.0-25.0	0.5-1.0
28.0-33.0	1.0	25.0-30.0	1.0

Bei der Aufreinigung der unterschiedlichen DNA-STV-Konjugate wurde der NaCl-Gradient im Bereich von 42% bis 54% je Konjugat leicht variiert und teilweise um 5.0 mL verlängert. Diese Variationen sind bei der Durchführung der Konjugatsynthese genauer beschrieben.

Mit dem Äkta Purifier wurden ferner DNA-mSTV-Konjugate über eine manuell gefüllte Größenausschluss säule mit Sephacryl als stationäre Phase aufgereinigt.

Sämtliche HPLC-Analysen und präparativen Aufreinigungen von DNA-mSTV Konjugaten zur Trennung von Konjugatmonomeren und -dimeren wurden mit einem Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) System der Firma Agilent (Serie 1100) bei einer Flussrate von 1 mL/min durchgeführt.

Die dabei verwendeten Säulen waren eine TSGgel DNA-NPR von Tosoh (Stuttgart, D) für Größenausschlusschromatographie und eine TSKgel G3000SWXL von Tosoh für Anionenaustauschchromatographie.

4.3.2 Asymmetrischen-Feld-Flussfeldfraktionierung

Die weitere Aufreinigung der dargestellten DNA-STV-Konjugate zur Trennung von Konjugatmonomeren und -dimeren sowie zur Bestimmung der Anteile von Konjugatoligomeren erfolgte an dem Asymmetrischen-Feld-Flussfeldfraktiometer AF2000 von Postnova Analytics. Die Bedienung der AF4 ist im Kapitel 4.7.1.4 bis 4.7.1.7 beschrieben.

4.3.3 Elektrophorese

Sämtliche Polyacrylamidgelelektrophoresen (PAGE) wurden mit dem Mini Protean tetra System von BioRad (München, D) durchgeführt.

Die Agarosegelelektrophoresen erfolgten in Elektrophoresekammern (7.3 cm) der Firma Febikon.

In beiden Fällen diente als Spannungsquelle ein Power Pac™ HC (bei 4 °C) oder Power Pac™ Basic (bei RT) von Biorad.

Für die Dokumentation der Gele wurde der Alpha-Imager, für die Durchlichtdokumentation der Gele wurde der Flachbettscanner CanoScan 8800F eingesetzt.

4.3.4 Spektroskopie

Die UV/VIS-Absorptionsspektren wurden am Cary 100 Bio UV/VIS Spektrometer aufgenommen. Jede Probe wurde drei Mal vermessen und für die folgende Konzentrationsbestimmung der Mittelwert der drei Messungen bestimmt. Zusätzlich wurde die Absorption bei einer nicht absorbierenden Wellenlänge (bei nicht farbigen Proteinen und DNA $\lambda = 400\text{nm}$) vom Messergebnis für eine Normierung auf den Nullwert abgezogen.

4.3.5 DLS

Messungen zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius sphärischer Nanopartikel und assemblierter NP-Protein Aggregate mittels dynamischer Lichtstreuung erfolgten am Zetasizer Nano S in einer Sub-Mikro Küvette (für ein Minimalvolumen von 15.0 μL) von Starna (Pfungstadt, D). Die Messungen erfolgten in TETBS oder TETBS 300 bei einem Probenvolumen von 40 μL .

4.3.6 AFM

Für die AFM-Messungen wurden 1.0 μL der zu untersuchenden Probe und 1.0 μL 25 $\mu\text{mol/L}$ MgCl_2 auf ein Stück Parafilm gegeben. Auf diesen Tropfen wurde ein frisch gespaltenes Glimmerplättchen (Mica, Plano GmbH) gelegt und die Probe 1 h an der Oberfläche adsorbiert. Danach wurde die Probe im Tapping Mode mit einem MultiMode™ Rasterkraftmikroskop von Veeco Metrology (Santa Barbara, CA), das mit einem Nanoscope IV controller ausgestattet war, gescannt. Für die Messung wurden Cantilever mit einer Kraftkonstante von 0.58 N/m und einer scharfen pyramidalen Spitze (SNL-10 tips) von Veeco Metrology (Mannheim, D) verwendet.

4.3.7 TEM

Für die TEM-Messungen wurden 25.0 μL einer 1.0 nmol/L NP-Lösung auf ein TEM-Gitter S160-4 (Kupfer Netz mit Kohlefilm auf 400 mesh-Netzchen) pipettiert. Zur Aufnahme überschüssigen Puffers wurde das TEM-Gitter auf Zellstoff platziert. Ein dabei entstandener Tropfen wurde danach mit weiterem Zellstoff von der Seite des TEM-Gitters aufgenommen und das TEM-Gitter dann für 30 min bei RT getrocknet. Die TEM-Messung erfolgte an einem FEI CM200.

4.4 Sonstige Geräte und Hilfsmittel

Tabelle 4.8: *Aufstellung weiterer verwendeter Geräte und Hilfsmittel.*

Gerät	Hersteller
Cary Temperatur Controller	Varian (Palo Alto, USA)
Feuchtkammer	VWR (Darmstadt, D)
Küvettenschleuder	ITS (Hattersheim, D)
pH-Meter 765 climatic	Knick (Berlin, D)
Quarz-Küvetten 30 μL	Hellma (Müllheim, D)
Quarz-Küvetten 100 μL	Hellma (Müllheim, D)
Küvette für Magnetrührstäbchen	Hellma (Müllheim, D)
UV-Handlampe	Benda Laborgeräte (Wiesloch, D)
Pipettenspitzenboxen	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, D)
Wasserstrahlpumpe	Bürkle (Bad Bellingen, D)
Vortex-Schüttler REAX top	Heidolph (Schwabach, D)
Minizentrifuge	Labnet (Woodbridge, USA)

4.5 Software

Tabelle 4.9: *Im Rahmen der Dissertation verwendete Software.*

Software	Hersteller
Office 2010	Microsoft (Redmond, USA)
OriginPro 8.6G	OriginLab (Northampton, USA)
ChemBioDraw Ultra 12.0	CambridgeSoft (Cambridge, USA)
CorelDRAW 11.0	Corel (Ottawa, CA)
EndNote X4	Thomson Reuters (New York, USA)
UCSF Chimera 1.6.2	University of California (USA)
ImageJ 1.43s	Wayne Rasband (Bethesda, USA)
IrfanView 4.32	Irfan Škiljan (Wien, AU)

4.6 Gelelektrophoretische Techniken

Im Rahmen der Dissertation fanden unterschiedliche gelelektrophoretische Techniken Anwendung.

DNA-Protein-Konjugate wurden in nicht denaturierenden Gelen analysiert, um das Hybridisieren mit komplementärer DNA oder mit komplementären DNA-Protein-Konjugaten zu charakterisieren. Zudem bleibt die hohe Affinität des STV zu Biotin in nicht denaturierenden Gelen erhalten.

Denaturierende SDS-Gele wurden verwendet um die Massen der Untereinheiten von dargestellten DNA-Protein-Konjugaten mit Reaktionsprodukten und Referenzen zu vergleichen. Der Vorteil dieser Gelmethode liegt in der Möglichkeit Probenbanden zu Banden eines Markers zuzuordnen, um die Masse der Probenbanden einzuschätzen.

Harnstoffgele wurden verwendet, um die Reinheit einzelner kommerziell erworbenen Oligonucleotidsequenz zu überprüfen.

Agarosegele wurden, wegen der größeren Poren der Gelmatrix, zur Analyse von langkettigen PCR Produkten und funktionalisierten NP sowie deren Aggregaten verwendet.

4.6.1 Polyacrylamidgele

Sämtliche Polyacrylamidgele wurde in einer Mini-PROTEAN Tetra Apparatur gegossen. Für die Lagerung wurden die Gele in feuchtem Zellstoff und vor Austrocknung geschützt bei 4° gelagert.

4.6.1.1 Nicht denaturierende Polyacrylamidgele (ndPAGE)

Eine Gelelektrophorese mit nicht-denaturierenden Acrylamidgelen, wurde für die Analyse von DNA-Protein-Konjugaten und sich daraus aufbauenden DNA-Nanostrukturen verwendet. Je nach Größe des Konjugats oder der Nanostruktur wurden Gele mit verschiedenen Acrylamidkonzentrationen gegossen.

Für je zwei 1.0 mm dicke ndGele wurde je nach gewünschter Acrylamidkonzentration eine Lösung nach den Angaben in *Tabelle 4.10* angesetzt. Die Polymerisation wird mit APS und TEMED initialisiert, die erst kurz vor dem Gießen der Gele zugegeben wurden. Zunächst wurden die Komponenten für das Trenngel gemischt und diese Lösung mit einer Pipette zwischen die zwei Glasplatten einer Gelgießapparatur gegeben. Nach dem Befüllen mit 4.2 mL Trenngel wurde das Gel sofort mit Ethanol überschichtet, um eine glatte Geloberfläche zu erzeugen. Nach der Polymerisation wurde das Ethanol abgegossen, die Lösung des Sammelgels auf das Trenngel gegeben und ein Kamm eingesetzt. Das Trenn- und das Sammelgel wurden jeweils eine Stunde polymerisiert.

Um DNA-Hybridisierungen und STV-Biotin Bindungen während der Gelelektrophorese zu erhalten, wurden sämtliche Elektrophoresen bei 4 °C in einer Mini Protean Tetra Elektrophoresekammer durchgeführt. Im Falle komplexerer Nanostrukturen wurde dem Laufpuffer 12.5 mmol/L Magnesiumacetat zugegeben um die DNA-Hybridisierung zu stabilisieren.

Typische Stoffmengen für Proben in einer Geltasche waren 2.0 pmol eines DNA-Protein-Konjugats.

Die Proben wurden zunächst mit Orange loading dye von Fermentas (Soeborg, DK) und dH₂O auf die gewünschte Konzentration verdünnt und dann 5.0 µL der

Probenlösung in die Geltaschen pipettiert. Bei der Analyse von komplexeren Nanostrukturen wurde die Stoffmenge der Probe weiter reduziert, um eine Überladung der Banden zu vermeiden. Die in den Experimenten gewählten Acrylamidkonzentrationen, Spannungen und Gelelektrophoresezeiten sind im Kapitel 2 jeweils für die gezeigten Gele angegeben.

Tabelle 4.10: Zusammensetzungen des Sammelgels und der Trenngele von nicht denaturierenden Polyacrylamidgelen mit verschiedenen Acrylamidkonzentrationen für ca. 10 mL ndGel (zwei Gele).

Sammelgel 5%					
dH ₂ O / mL	2.1				
1.0 mol/L Tris pH 6.8 / mL	0.4				
30% Acrylamid (37.5:1) / mL	0.5				
TEMED / μ L	3.0				
APS / μ L	30.0				
Trenngele					
Acrylamidkonzentrationen	6.5%	7%	7.5%	8.5%	9%
dH ₂ O / mL	5.33	5.17	5.0	4.67	4.5
1.5 mol/L Tris pH 8.8 / mL	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
30% Acrylamid (37.5:1) / mL	2.17	2.33	2.5	2.83	3.0
TEMED / μ L	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
APS / μ L	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0

4.6.1.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit SDS-PAGE konnten die Untereinheiten von STV und DNA-STV-Konjugate auf Grund ihrer Massenauftrennung im Gel analysiert werden. Die Zusammensetzung der Lösungen für zwei 1 mm dicke SDS-Gele ist in *Tabelle 4.11* angegeben. Das Gelgießen ist unter *4.6.1.1* beschrieben. Bei der SDS-PAGE wurde eine Stoffmenge der verwendeten Proben von 20.0 pmol pro Geltasche gewählt. Dabei wurden die Proben zunächst mit 4x SDS-Probenpuffer und dH₂O auf die gewünschte Konzentration verdünnt und dann 5.0 μ L der Probenlösung in die Geltaschen pipettiert. Jede Probe wurde zwei Mal auf ein Gel gegeben zunächst direkt nach dem Ansetzen und ein weiteres Mal nach fünfminütigem Erhitzen auf 95 °C (thermisches Denaturieren). Als Laufpuffer bei der SDS-PAGE wurde Maniatis verwendet. Für die SDS-PAGE wurde eine Stromstärke von 50 mA für 20 min bei RT gewählt.

Tabelle 4.11: Zusammensetzungen des Sammelgels und Trenngels des SDS-Polyacrylamidgels für ca. 10 mL ndGel (zwei Gele).

	Sammelgel 5%	Trenngel 15%
dH ₂ O / mL	2.1	2.5
1.0 mol/L Tris pH 6.8 / mL	0.4	
1.5 mol/L Tris pH 8.8 / mL		2.5
30% Acrylamid (37.5:1) / mL	0.5	5.0
TEMED / μ L	3.0	5.0
APS / μ L	30.0	50.0

4.6.1.3 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (dPAGE)

Denaturierende Gelelektrophorese mit Harnstoffgelen wurde für die Kontrolle der Reinheit von einzelnen, kommerziell erworbenen Oligonucleotiden verwendet.

Für zwei 1.0 mm dicke denaturierende Harnstoff-Acrylamidgele wurde eine Lösung nach den Angaben in *Tabelle 4.12* angesetzt. Damit sich der Harnstoff vollständig löste, wurde die Lösung vor der Zugabe von TEMED und APS unter fließendem, warmen Wasser aus dem Wasserhahn erwärmt und anschließend gut durchmischt. Danach wurde die Lösung wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. Da APS und TEMED die Polymerisation einleiten, wurden sie unmittelbar vor dem Gießen der Gele zugegeben. Die Polymerisation erfolgte über Zeitraum von 30 min.

Für eine vollständige Denaturierung der zu untersuchenden Oligonucleotide wurden diese mit Formamid Puffer und Bromphenolblau (BPB) gemischt und vor dem Auftragen auf das Gel für 5 min auf 95 °C erhitzt. Für die Gelelektrophorese wurden 2 pmol der Oligonucleotide auf das Gel aufgetragen. Vor dem Befüllen der Geltaschen mit Oligonucleotidproben mussten die Taschen des Gels mit Hilfe einer Pipette mit Kapillarspitze mit TBE 1x Puffer gespült werden, um überschüssigen Harnstoff zu entfernen. Als Folge des unzureichenden Spülens der Geltaschen, diffundieren die Proben inhomogen in den Geltaschen und es werden aufgrund dessen keine scharfen Gelbanden erhalten. Die denaturierende Gelelektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur mit einer konstanten Spannung von 220 V in TBE.

Tabelle 4.12: Zusammensetzung des Harnstoff-Polyacrylamidgels für ca. 17 mL ndGel (drei Gele).

Harnstoffgel 15%	
dH ₂ O / mL	5.1
Harnstoff / g	5.0
TBE 5x (pH 8.0)	2.4
30% Acrylamid (37.5:1) / mL	4.5
TEMED / µL	10.0
APS / µL	100.0

4.6.2 Agarose Gele

Die aus PCR-Produkten aufgebauten, mSTV-Nanohanteln mit längeren DNA-Abstandshaltern und Proben mit DNA-funktionalisierten Au-NP sowie Ag-NP wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert und aufgereinigt. Hierfür wurden 0.5%ige bis 1.2%ige Agarosegele nach *Tabelle 4.13* gegossen. Dabei wurde Agarose in 100 mL TBE gegeben und in der Mikrowelle erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Nachdem die Lösung auf etwa 35 °C abgekühlt war, wurde ein 0.5 bis 0.8 cm dickes Gel in einer Agarosegelkammer gegossen. Nach dem Aushärten des Agarosegels wurde es mit den Proben, die vorher mit 1/6 Vol% 6x DNA Ladepuffer (für die PCR-Produkte) oder 1/6 Volumenanteil Au-NP-Ladepuffer versetzt wurden, beladen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung von 150 V in 0.5 x TBE für 30 bis 45 min bei 4 °C.

Tabelle 4.13: Zusammensetzungen der unterschiedlich konzentrierten Agarosegele für 100 mL Gel (drei Gele).

Agarosekonzentration	0.5%	0.75%	1.0%	1.2%
Agarose / g	0.5	0.75	1.0	1.2
TBE / mL	100	100	100	100

4.6.3 Anfärben von Gelen

4.6.3.1 SybrGold-Färbung

Mit dem interkalierenden SybrGold Fluoreszenzfarbstoff wurden ssDNA und dsDNA in DNA-STV Konjugaten und daraus aufgebaute Nanostrukturen nach der dPAGE und ndPAGE angefärbt.

Hierfür wurden 2.5 µL SybrGold (Invitrogen) zu ca. 25 mL H₂O gegeben (10⁴-Verdünnung). Das vollständig mit Flüssigkeit bedeckte Gel wurde dann ca. 20 bis 30 min auf dem Orbitalschüttler im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Polyacrylamidgele an der Geldokumentation unter Verwendung des SybrGold-Filters aufgenommen.

4.6.3.2 Silber-Färbung

Mit der Silberfärbung wurden Proteine in allen Typen von Polyacrylamidgelen angefärbt. Der Vorteil der Silber-Färbung im Vergleich zur Coomassie-Färbung ist eine höhere Sensitivität für Proteine (ca. Faktor 20).

Vor der Silberfärbung erfolgte eine Fixierung des Gels durch Inkubation in 40% Ethanol und 10% Essigsäure unter Schütteln für 20 min. In der Fixierlösung konnte das Gel auch über Nacht gelagert werden, was das Färbeergebnis nur geringfügig beeinträchtigte. Anschließend wurde die Fixierlösung abgegossen, das Gel mit H₂O gespült und dann mit dem Silver Stain Plus Kit von BioRad (Hemel Hempstead, UK) gefärbt.

Hierfür wurde das Gel zunächst für 5 min mit einer K₂Cr₂O₇-Lösung oxidiert. Die Chromatlösung wurde abdekantiert (Achtung: Schwermetall) und das nun gelb gefärbte Gel so lange mit H₂O gespült, bis keine gelbe Farbe zu erkennen war. Dafür wurde das Gel mehrmals für 3 min in ca. 25 mL H₂O gewaschen, wobei das Wasser für jeden Waschritt ausgetauscht wurde. Dann wurde das Gel mit einer Silbernitrat-Lösung bedeckt und für 20 min unter Schütteln inkubiert. Danach wurde das Gel wieder mit Wasser gespült und in eine Entwicklerlösung mit Paraformaldehyd gegeben. Sobald sich die Entwicklerlösung dunkel färbte, wurde sie gegen frische ausgetauscht. Nachdem die Banden klar zu erkennen waren und bevor sich das gesamte Gel dunkel färbte, wurde die Entwicklung gestoppt, indem die Färbereaktion in einer 5%igen Essigsäurelösung für 30 min gequenchet wurde. Anschließend wurde das Gel auf einem Flachbettscanner mit Durchlichtfunktion eingescannt.

4.6.3.3 Coomassie-Färbung

Mit der Coomassie Färbung können Proteine nach der SDS-PAGE und bei ausreichender Beladung (mindestens 20 fmol bei DNA-STV-Konjugaten) auch bei ndPAGE angefärbt werden. Dabei reagiert das Coomassie-Brillant-Blau mit den basischen Seitenketten der Proteine.

Die Polyacrylamidgele wurden mit Coomassie-Lösung bedeckt und zehn bis fünfzehn Minuten auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Coomassie-Lösung abgegossen (kann vielfach verwendet werden) und das Gel mit H₂O gespült. Das komplett blau gefärbte Gel wurde zum Entfärben mit H₂O bedeckt und in der Mikrowelle bis zum Sieden erhitzt. Um den austretenden Farbstoff aufzunehmen, wurden im Anschluss zwei Kosmetiktücher in das heiße Wasser gelegt und das Gel einige Zeit geschüttelt. Das Gel konnte auch alternativ langsam über Nacht entfärbt werden, wobei dann auf den Einsatz der Mikrowelle verzichtet werden konnte.

Waren die Proteinbanden durch das Entfärben hinreichend sichtbar, wurde das Gel mit einem Flachbettscanner mit Durchlichtfunktion eingescannt.

4.6.3.4 Ethidiumbromid-Färbung

Mit der Ethidiumbromid-Färbung wurden doppelsträngige DNA, DNA-STV-Konjugate und darauf aufgebaute Nanostrukturen in Agarosegelen und bei der ndPAGE angefärbt. Hierfür wurden 2.0 µL Ethidiumbromid von Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, München) in ca. 25 mL H₂O gegeben. Das vollständig bedeckte Gel wurde in der Färbelösung für fünfzehn bis zwanzig Minuten inkubiert. Anschließend ließen sich die Banden mittels des Ethidiumbromid-Filters der Geldokumentation erkennen.

4.7 Versuchsvorschriften

4.7.1 Allgemeinen Methoden und Techniken

4.7.1.1 Gelfiltration über NAP-Säulen

Zur Aufreinigung von DTT reduzierter Thiol-modifizierter DNA, DTT reduzierter Proteine mit rekombinant eingeführten C-terminalen Cysteinresten, bei der Abtrennung von überschüssigen Crosslinkern und zum Entsalzen wurden Illustra NAP-Säulen verwendet. Diese Einweg-Säulen sind mit Sephadex™ G-25 beladen und erlauben schnelle und leicht handhabbare gravitationsgetriebene Säulenchromatographie mit fest definiertem Volumen.

Um ein höheres Maß an Aufreinigung zu erreichen, wurden bei jedem Einsatz von NAP-Säulen die zu reinigende Probe zunächst auf eine NAP-5- und anschließend auf eine NAP-10-Säule aufgetragen um eine Vervielfachung der Aufreinigung zu erreichen.

Zunächst wurden die NAP-5- und NAP-10-Säule an einem Stativ fixiert und zuerst der oberer und dann der untere Deckel entfernt. Dann wurden beide Säulen drei Mal vollständig mit H₂O gefüllt bis dieses mit der Gravitation aus der Säule eluiert ist. Danach wurden die Säulen dreimal mit Reaktionspuffer equilibriert.

Die zu reinigende Probe wurde dann auf ein Gesamtvolumen von 500 µL in Reaktionspuffer verdünnt und auf die NAP-5-Säule gegeben. Nach dem vollständigen Einsinken des Probenvolumens in die Gelmatrix wurde die NAP-Säule drei Mal mit 333 µL Probepuffer direkt in die NAP-10-Säule gespült. Nachdem das Probenvolumen vollständig in die Gelmatrix der NAP-10-Säule eingesunken war, wurde die Probe mit drei Mal 490 µL Probepuffer aus der Säule eluiert.

Anschließend wurden die NAP-Säulen durch zehnmaliges vollständiges Befüllen mit H₂O gewaschen. Nach dem verschließen der beiden Kappen und vorherigen Befüllen mit 20% Ethanol konnten die Säule mehrere Monate bei 4°C im Dunkeln gelagert werden.

4.7.1.2 Umpuffern und Aufkonzentrieren

Vivaspin Ultrazentrifugations-Einheiten dienen zum Aufkonzentrieren und Umpuffern von wässrigen Lösungen in einem Volumenbereich von 100 µL bis 20 mL. Dabei wird der Puffer durch die Zentrifugalkraft durch eine Polyethersulfon- oder regenerierte Zellulose-Membran gedrückt, wobei die Probe im Reservoir des Vivaspin verbleibt.

Vor dem Umpuffern oder Aufkonzentrieren mussten die Vivaspin Ultrazentrifugation Einheiten zunächst mit 1 mL des Probepuffers equilibriert werden, indem sie nach dem Befüllen fünf Minuten bei 4000 g (Vivapsin 6 und Vivaspin 20), 3000 g (Vivaspin 15R) bzw. 12000 g (Vivaspin 500) zentrifugiert wurden. Dann wurden in die Ultrazentrifugations-Einheiten die jeweiligen Proben gefüllt und mit zur Equilibrierung analogen Geschwindigkeiten in fünf Minuten Schritten zentrifugiert. Dabei wurden die Vivaspins nach jedem der Zentrifugationsschritten gevortext, um die Entstehung eines zu großen Konzentrationsgefälles im unteren Membranbereich zu vermeiden. Beim Aufkonzentrieren wurde das Probenvolumen auf ca. 100 µL (Vivapsin 6 und Vivaspin 15R), 200 µL (Vivaspin 20) bzw. 20 µL (Vivaspin 500) reduziert. Zum Umpuffern wurde nach dem Aufkonzentrieren 1.0 mL (0.5 mL bei Vivaspin 500) des Zielpuffers zur Probe pipettiert. Dann wurde das Volumen erneut auf die oben beschriebenen Volumen reduziert. Der Puffertausch wurde weitere zwei Mal wiederholt. Anschließend wurde die umpufferte Probe mit einer Kapillarspitze aus der Ultrazentrifugations-Einheit pipettiert.

4.7.1.3 Spektroskopische Quantifizierung

Spektroskopische Konzentrationsbestimmungen erfolgten durch Messungen des UV/Vis-Spektrums um den Bereich der spezifischen Wellenlänge der zu untersuchenden Proben. Bei DNA-EGFP-Konjugaten wurde dazu zum Beispiel die proteinspezifische Absorption bei $\lambda = 488$ nm gewählt. Bei den nicht farbigen DNA-STV-Konjugaten musste hingegen die spezifische Wellenlänge der Proteinbande (Absorption der aromatischen Seitenketten von Trp, Tyr und Phe) bei $\lambda = 280$ nm gewählt werden.

Um die Konzentration (c) der dargestellten DNA-Protein-Konjugate oder DNA-funktionalisierter Au-NP zu bestimmen, wurde die spezifische Absorption der Probenspezies den gemessenen Spektren (siehe 4.3.4) entnommen und zur Konzentrationsberechnung im nach c aufgelösten Lambert-Beersches Gesetz (siehe *Formel 4.1*) eingesetzt.

$$c = \frac{A}{\varepsilon \cdot d} \quad \text{Formel 4.1}$$

mit:

A = gemessene Absorption

ε = spezifischer Extinktionskoeffizient der Probe

d = Schichtdicke der Küvette ($d = 1$ cm)

Diese Methode führt nur bei DNA-Protein-Konjugaten oder DNA-funktionalisierten NP zu einer hinreichend genauen Quantifizierung, die einen spezifischen Absorptionspeak im Bereich des sichtbaren Lichts vorweisen (wie Au-NP oder FP).

Bei der Konzentrationsbestimmung von DNA-STV-Konjugaten führt das direkte Einsetzen der photometrisch bestimmten Absorption in das Lambert-Beersches Gesetz zu einem hohen Fehler, der mit steigendem Anteil von Nucleobasen in der Probenlösung weiter ansteigt. Ursache dafür ist eine Überschneidung der Absorptionsbande von Proteinen (bei 280 nm) und der Absorptionsbande von Oligonucleotiden (bei 260 nm) im UV-Spektrum. Dadurch addiert sich zur gemessenen Absorption des STV ein Anteil der Absorption der Oligonucleotide und die über das Lambert-Beersches Gesetz errechnete Konzentration ist höher als die tatsächliche Proteinkonzentration.

Dieser Fehler kann durch eine im Folgenden hergeleitete Gleichung aus der photometrisch gemessenen Absorption bei $\lambda = 280$ nm herausgerechnet werden und dadurch kann die reine Proteinabsorption bei $\lambda = 280$ nm ($A_{280}(\text{STV})$) bestimmt werden.

Die Absorption eines DNA-STV-Konjugats bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm setzt sich zusammen aus der Absorption von Protein und Oligonucleotid (Formel 4.2). Analoges gilt für die Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm (Formel 4.3).

$$A_{280} = A_{280}(STV) + A_{280}(DNA) \quad \textbf{Formel 4.2}$$

$$A_{260} = A_{260}(STV) + A_{260}(DNA) \quad \textbf{Formel 4.3}$$

Unter der Annahme, dass die isoliert bestimmten Verhältnisse der Absorptionen (A_{260}/A_{280}) einen konstanten Wert ergeben gilt:

$$A_{260}(DNA) / A_{280}(DNA) = \alpha \quad \textbf{Formel 4.4}$$

$$A_{260}(STV) / A_{280}(STV) = \beta \quad \textbf{Formel 4.5}$$

Durch Einsetzen von Formel 4.4 und Formel 4.5 in Formel 4.2 und Formel 4.3 lassen sich Formel 4.6 und Formel 4.7 aufstellen.

$$A_{280} = A_{280}(STV) + (A_{260}(DNA) \cdot 1/\alpha) \quad \textbf{Formel 4.6}$$

$$A_{260} = A_{260}(DNA) + (A_{280}(STV) \cdot \beta) \quad \textbf{Formel 4.7}$$

Einsetzen von Formel 4.7 in Formel 4.6 führt zu:

$$A_{280} = A_{280}(STV) + (A_{260} - A_{280}(STV) \cdot \beta) \cdot 1/\alpha \quad \textbf{Formel 4.8}$$

Durch Umstellen von Formel 4.8 nach $A_{280}(STV)$ ergibt sich:

$$A_{280}(STV) = \frac{\left(A_{280} - \left(\frac{A_{260}}{\alpha} \right) \right)}{\left(1 - \left(\frac{\beta}{\alpha} \right) \right)} \quad \textbf{Formel 4.9}$$

Mit Formel 4.9 kann somit der Anteil der Absorption bei $\lambda = 280$ nm von STV in einem DNA-STV-Konjugat berechnet werden. Danach kann die Konzentration des Konjugats durch Einsetzen von $A_{280}(STV)$ in *Formel 4.1* bestimmt werden.

Mit der oben beschriebenen Methode kann die Konzentration von DNA-STV-Konjugaten bestimmt werden, solange α und β bekannt sind. Dieses setzt eine genaue Kenntnis der Stoffmengenverteilung im DNA-STV-Konjugat voraus. Proben bestehend aus unterschiedlichen DNA-STV-Konjugaten oder unterschiedlichen DNA-STV-Konjugaten und daraus aufgebauten Nanostrukturen können mit *Formel 4.9* nicht bestimmt werden. Darum erfolgte die Quantifizierung von DNA-STV-Nanostrukturen anhand der dabei zur Proteinmarkierung verwendeten biotinylierten Fluoreszenzfarbstoffe.

Bei der Verwendung von fluoreszenten Farbstoffen zur Markierung von DNA-STV-Konjugaten musste zusätzlich geprüft werden, ob der Fluorophor auch im Bereich der spezifischen Absorption von DNA oder Proteinen absorbiert. Dadurch trägt auch der fluoreszente Farbstoff einen Anteil zur Absorption bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ bei. In diesem Fall muss ein komplexeres Gleichungssystem mit drei Ausgangsgleichungen aufgestellt werden. Die Formeln werden dann analog zur Herleitung von Formel 4.9 ineinander eingesetzt und zu $A_{280}(\text{STV})$. Wenn möglich sollte in einem solchen Fall die Konjugatkonzentration mittels der spezifischen Absorption des fluoreszenten Farbstoffs bestimmt werden.

4.7.1.4 Allgemeine Arbeitsschritte bei der Asymmetrischen-Feld-Flussfeldfraktionierung

Standardisiert wurde eine hydrophile und lösungsmittelresistente Membran aus regenerierter Zellulose (RC) verwendet, die eine Ausschlussgrenze von 10 kDa hatte. Mit diesem Membrantyp wurden, im Rahmen dieser Dissertation, die besten Trennleistungen erzielt. Als Puffer wurde 0.1 mol/L NaCl (verdünnt aus dem 20x Puffer siehe *Tabelle 4.1*) verwendet, welches zuvor mit einem 100 nm Ø Teflonfilter gereinigt wurde. Sämtliche Puffer und Reinigungslösungen für den Einsatz in der AF4 mussten ebenfalls vor der Verwendung filtriert werden, um Verunreinigung durch Mikroorganismen und Staubpartikel zu vermeiden.

Vor jedem Lauf mit neuer Probe musste die AF4 bei einem gleichzeitigen Querfluss, Fokusfluss und Tipfluss von 1.0 mL/min mit 0.1 mol/L NaCl-Lösung gespült werden. Zudem mussten der Autosampler und der Fraktionssammler zwei Mal mit 0.1 mol/L NaCl-Lösung das Injektionssystem spülen. Vor einer Inbetriebnahme nach Gerätestillstand musste das System eine Stunde mit Laufpuffer equilibriert werden.

Einmal pro Woche wurden die Membran im Trennkanal und die Filter der Tip- und Fokuspumpe getauscht. Einmal im Monat wurde die Anlage unter gleichzeitigen Querfluss, Fokusfluss und Tipfluss von 0.5 mL/min mit Spüllösung für die AF4 gereinigt. Vor dem Gerätestillstand wurde die Anlage unter gleichzeitigen Querfluss, Fokusfluss und Tipfluss von 1.0 mL/min mit Lagerpuffer für die AF4 befüllt (Vorsicht Nitrose-Gase: UV-Brenner vorher abschalten).

Bei Nichtnutzung von ein oder zwei Tagen wurde die AF4 unter geringen Fluss weiter betrieben. Dabei wurde die AF4 unter gleichzeitigem Querfluss, Fokusfluss und Tipfluss von 0.1 mL/min mit 0.1 mol/L NaCl-Lösung gespült.

Ein Maximaldruck von 15 bar darf im Trennkanal nicht überschritten werden. Bei zu hohen Betriebsdrücken muss die AF4 gereinigt und/oder die Membran und Filter müssen getauscht werden. Bei Veränderungen des Detektorflusses, der Spacer-Höhe und des Trennkanals muss die Länge und der Durchmesser des Gegendruckschlauches angepasst werden. Dafür sollte der Druck im Trennkanal bei vollem Detektorfluss (ohne Querfluss und Slot-Fluss) auf einen Druckbereich von acht bis zehn bar eingestellt werden.

4.7.1.5 Entwicklung eines Flussprofils für die Asymmetrischen-Feld-Flussfeldfraktionierung

Häufig müssen die Parameter bei der Asymmetrischen-Feld-Flussfeldfraktionierung (AF4) dem Analyten angepasst werden, um eine hinreichende Trennung der Probenspezies zu erreichen. Der Optimierungsbedarf bei der AF4 steigt, wenn Proben mit ähnlichem hydrodynamischem Radius aufgetrennt werden sollen.

Für einen ersten Lauf mit einer unbekanntem Probe sollte das in *Abbildung 4.1* gezeigte Flussprofil gewählt werden.

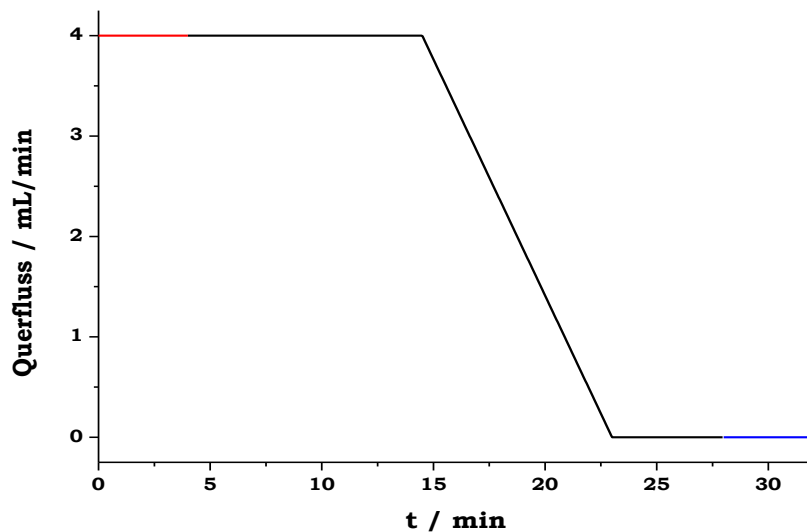


Abbildung 4.1: Im ersten Schritt der Asymmetrischen-Fluss-Feldflussfraktionierung wird die Probe in den Trennkanal injiziert. Gleichzeitig mit dem Injizieren beginnt die Fokussierung (rot). Im zweiten Schritt wird die Probe durch den Kanal gespült und aufgetrennt. Hierbei wird zunächst ein konstanter Querfluss gewählt, der im Laufe der Elution linear gesenkt wird (schwarz). Im dritten Schritt wird der Kanal ohne Querfluss gespült (blau).

Bei der AF4 können eine große Zahl von Parametern variiert werden, um die Trennleistung bei einer spezifischen Probe zu steigern. Der wichtigste Parameter ist der Querfluss, der in seiner Intensität, der Dauer des konstanten und linear sinkenden Querflusses variiert werden kann. Eine Steigerung des Querflusses führt zu einer Steigerung der Trennleistung, allerdings auch zu einer Peakverbreiterung und zu höheren Scherkräften im Trennkanal. Die höchste Trennleistung wird bei konstantem Querfluss erzielt, jedoch können Proben mit hohem hydrodynamischem Radius bei hohen Querflussraten erst beim Reduzieren des Querflusses eluieren (also beim linear sinkenden Querfluss). In diesem Fall kann eine längere Dauer für den linear reduzierten Querfluss gewählt werden, um eine höhere Trennleistung bei Spezies mit großem hydrodynamischem Radius zu erzielen. Sollen mehrere Spezies mit großem hydrodynamischem Radius voneinander getrennt werden, kann der Querfluss auch stufenförmig gesenkt werden um die einzelnen Probenbestandteile in ausreichenden Zeitabständen zu eluieren.

Eine Übersicht über die möglichen, gerätekontrollierten Parameter und die daraus folgenden Änderungen bei der Asymmetrischen-Fluss-Feldflussfraktionierung ist in

Tabelle 4.14 angegeben.

Tabelle 4.14: Parametervariation bei der Asymmetrischen-Fluss-Feldflussfraktionierung.

Parameter	Variation	Resultat
Querfluss	Erhöhung	+ Trennleistung + Peakbreite + Scherstress
Detektionsfluss	Reduktion	+ Trennleistung - Peakbreite - Maximalbeladung
Gegendruck	Erhöhung	+ Trennleistung - Maximaler Detektorfluss
Slot-Pumpenfluss	Erhöhung	+ Probenkonzentration - Ausbeute
Spacer-Höhe	Erhöhung	+ Trennleistung + Maximalbeladung - Minimalbeladung
Injektionsfluss	Erhöhung	+ Scherstress - Fokusdauer
Fokusdauer	Erhöhung	+ Trennleistung + Probenkonzentration + Scherstress
Trennkanaltemperatur	Erhöhung	+ Trennleistung + Proteinentfaltung
Probenmenge	Reduktion	+ Trennleistung

Zusätzlich kann die Wahl der Membran einen Einfluss auf die Trennleistung und Ausbeute bei der AF4 haben. Es sollte ein Membrantyp gewählt werden, der nicht mit den Proben wechselwirkt, um Scherphänome und Adsorption an der Membran zu vermeiden.

Ferner wurden für die Optimierung der Elutionsbedingungen der pH-Wert des NaCl-Puffers und das Puffersystem (PBS, TBS und MESTBS) variiert.

Die Detektion der Proben erfolgte mithilfe eines Durchflussphotometers und eines Durchflussfluorometers. Die Elution der Proben wurde analog zur FPLC bei den spezifischen Wellenlängen von DNA $\lambda = 260$ nm und Proteinen $\lambda = 280$ nm sowie durch die Fluoreszenz der aromatischen Aminosäuren bei $\lambda_{\text{Ext}} = 280$ nm und $\lambda_{\text{Emm}} = 350$ nm detektiert. Parallel erfolgte die Probendetektion in der Durchflusszelle eines statischen Lichtstreu-Messgeräts (SLS). Die Detektionsgrenze von Proben mit kleinem hydrodynamischem Radius wurde bei der SLS häufig nicht erreicht und es ließen sich in der Lichtstreuung nur der Hauptpeak und Aggregate erkennen. Bei der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Konjugaten und darauf aufgebauten Nanostrukturen erfolgte die Detektion bei der spezifischen Emission des Fluoreszenzfarbstoffes und als zusätzliche Kontrolle bei einer Absorption von $\lambda = 280$ nm.

4.7.1.6 Analytische Asymmetrische-Fluss-Feldflussfraktionierung

Nachdem ein Flussprofil für einen Analyten hinreichend optimiert wurde und bei den gewählten Flussprofil eine gute Trennleistung über alle Probenpeaks erzielt wurde, erfolgte die Charakterisierung der Probe mittels analytischer Asymmetrische-Fluss-Feldflussfraktionierung (aAF4).

Bei der aAF4 wurde die Stoffmenge der Probe so gewählt, dass die Detektionsgrenze (für Photometrische- und Fluoreszenzdetektion) nur leicht überschritten wurde. Da die Trennleistung antiproportional zur aufgetragenen Stoffmenge ist, wurde unter Verwendung von kleinen Stoffmengen die höchste Peaktrennung bei der Analyse erzielt.

Die Parameter für die analytische aAF4 mit DNA-STV-Konjugaten sind in *Tabelle 4.15* angegeben.

Tabelle 4.15: Parameter für die analytische AF4.

Parameter	Einstellung
Kanaltyp	Analysekanal
Spacer	500 µm
Membran	RC, MWCO 10 kDa
Laufpuffer	0.1 mol/L NaCl
Detektorfluss	0.5 mL/min
Injektionsvolumen	10 µL
Stoffmenge Probe	ca. 100 pmol
Querfluss	4.0 mL/min
Slot-Pumpenfluss	0.3 mL/min
Injektionsfluss	0.2 mL/min
Fokusdauer	2.5 min
Übergangszeit	1.0 min
Trennkanaltemperatur	24 °C
konstanter Querfluss	17.5 min
Linearer Querfluss	4.0 min
Autosampler-Modus	„µL pickup mode“

Die Analyse der Messergebnisse an der AF4 erfolgte mit der AF2000 Control Software. Diese erlaube die direkte Integration der erhaltenen Peaks, was einen Vergleich der Anteile der jeweiligen Peaks an der Gesamtprobe erlaubte.

4.7.1.7 Präparative Asymmetrische-Fluss-Feldflussfraktionierung

Bei der AF4 werden die Proben um etwa den Faktor 300 verdünnt. Für die anschließenden gelelektrophoretischen Charakterisierungen ist ein Umpuffern und Aufkonzentrieren der Probe unerlässlich.

Die bei der aAF4 aufgetrennten Stoffmengen der Analyten sind für eine anschließende Quantifizierung und PAGE unzureichend. Darum wurde bei der präparative Asymmetrische-Fluss-Feldflussfraktionierung (pAF4) die Stoffmenge des Analyten zu Ungunsten der Peaktrennung um den Faktor drei gesteigert. Dabei wurden für die pAF4 die Parameter nach *Tabelle 4.16* gewählt.

Tabelle 4.16: Parameter für die präparative AF4.

Parameter	Einstellung
Kanaltyp	Analysekanal
Spacer	500 μm
Membran	RC, MWCO 10 kDa
Laufpuffer	0.1 mol/L NaCl
Detektorfluss	0.5 mL/min
Injektionsvolumen	20 μL
Stoffmenge Probe	ca. 300 pmol
Querfluss	4.0 mL/min
Slot-Pumpenfluss	0.3 mL/min
Injektionsfluss	0.2 mL/min
Fokusdauer	2.5 min
Übergangszeit	1.0 min
Trennkanaltemperatur	24 $^{\circ}\text{C}$
konstanter Querfluss	17.5 min
Linearer Querfluss	4.0 min
Autosampler-Modus	„ μL pickup mode“

Mit der so erreichten Verdreifachung der Stoffmenge der zu untersuchenden Konjugate wurde jedoch nicht ausreichend Probe für weitere Analysen aufgetrennt. Da eine weitere Beladung der AF4 zu einem drastischen Verlust an Trennleistung führte und keine hinreichende Auftrennung zwischen Konjugatmonomeren und -dimeren gegeben war, wurden die pAF4-Läufe zehn bis vierzig Mal wiederholt und die jeweiligen Peakfraktionen wurden mittels eines Fraktionsammlers bei 4 $^{\circ}\text{C}$ vereinigt. Dafür musste die Fraktionen unter den Peaks im ersten Lauf der pAF4 manuelle gesammelt werden. In diesem Lauf sollte der Trennkanal der AF4 mit dem Analyten equilibriert werden. Nach dem zweiten manuell gesammelten Lauf konnte der Fraktionsammler auf die Fraktionen unter den Peaks eingestellt werden und die fraktionierte Sammlung der folgenden Läufe erfolgten automatisiert. Dabei wurden die vollständigen Fraktionen in 8.0 mL HPLC-Gläsern gesammelt, wobei die Fraktionen eines jeden Laufes in neue HPLC-Gläser gesammelt wurde. Anschließend wurden die zusammengehörenden Fraktionen vereint und nach 4.7.1.2 in Vivaspin 20 (MWCO 10 kDa) aufkonzentriert.

Damit wurde bei der pAF4 im Unterschied zu aAF4 ungefähr 36mal mehr Probe aufgetrennt und für die weitere Analyse bereitgestellt.

4.8 DNA-STV-Konjugatsynthese

Im Folgenden sind die Synthesevorschriften für sämtliche durchgeführten DNA-STV-Konjugatsynthesen beschrieben, wobei stellvertretend für alle verwendeten Oligonucleotidsequenzen (siehe *Tabelle 4.4*) sämtliche Synthesen am Beispiel eines F9-Oligonucleotids beschrieben sind.

4.8.1 DNA-nSTV-Konjugatsynthese

Zu einem Aliquot Thiol-modifiziertem Oligonucleotid mit der Sequenz F9 (tF9) (100 μ L mit 100 mol/L = 10.0 nmol) wurden 60 μ L 1.0 mol/L DTT gegeben und über Nacht im Dunkeln bei 37 °C inkubiert. Vor Zugabe auf die NAP-5 Säule wurde das Volumen der Oligonucleotidlösung mit PBS pH 7.2 auf 500 μ L aufgefüllt.

100 μ L 200 μ mol/L nSTV (20.0 nmol) wurden mit 340 μ L PBS pH 7.2 verdünnt und zur Proteinlösung wurden 2 mg sSMCC (\approx 4.6 μ mol) in 60 μ L DMSO gegeben. Anschließend wurde das nSTV für 1.5 h im Dunkeln bei RT mit dem Crosslinker inkubiert.

Die 500 μ L des DTT-aktivierten tF9 und des nSTV-SMCC wurde nach 4.7.1.1 über NAP5- und NAP10-Säulen von niedermolekularen Bestandteilen (Salze, DTT und nicht reagiertem Crosslinker) getrennt. Die Reaktanten wurden dabei mit PBS pH 7.2 von den Säulen eluiert. Als erstes wurde nSTV-sSMCC aus der NAP10-Säulen in ein 3.0 mL Reaktionsgefäß eluiert und anschließend wurde das aktivierte Oligonucleotid von der zweiten NAP10-Säule in dasselbe Reaktionsgefäß eluiert, so dass die Konjugation unmittelbar nach der NAP-Reinigung begann. Danach wurden das aktivierten tF9 und das nSTV-SMCC für 1.5 h im Dunkeln bei RT inkubiert.

Zum Aufkonzentrieren wurden die Rohprodukte der Konjugatsynthese in ein Vivaspin 6 (MWCO: 30 kDa) gegeben und das Volumen wurde nach 4.7.1.2 auf 100.0 μ L reduziert. Zu den Rohprodukten der Konjugatsynthese im Vivaspin wurde 1.0 μ L 1.0 mol/L Mercaptoethanol pipettiert. Dann wurde die Rohprodukte der Konjugatsynthese in 100 μ L 30 Vol% Tris B umgepuffert und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Das Vivaspin wurde zweimal mit 150 μ L 30 Vol% Tris B gespült und danach die Spülflüssigkeit in das Eppendorf Reaktionsgefäß mit der Konjugatlösung überführt.

Die Rohprodukte der Konjugatsynthese wurde mittels FPLC über eine Anionenaustausch-Säule (mono Q HR 5/5) aufgereinigt. Die Einstellungen der FPLC sind in *Tabelle 4.7* angeben. Die Konjugate wurden in Fraktionen zu 0.5 mL gesammelt und anhand der Peaktrennung des FPLC-Chromatogramms vereinigt.

Die vereinigten Peakfraktionen wurden in Vivaspin 6 (MWCO 10 kDa) nach 4.7.1.2 aufkonzentriert und in PBS umgepuffert, wobei das Volumen auf ca. 100 μ L reduziert wurde.

Anschließend erfolgte die Quantifizierung nach der unter 4.7.1.3 beschriebenen Methoden für DNA-STV-Konjugate. Eine erste Abschätzung der DNA-nSTV-Konjugate erfolgt unmittelbar bei der UV-Vis-Spektroskopie. Das A_{260}/A_{280} -Verhältnis erlaubte dabei eine Abschätzung über die Anzahl der kovalent gebundenen ssOligonucleotide.

Die Lagerung des DNA-nSTV-Konjugats erfolgte bei 4 °C bei Verwendung in den folgenden Wochen oder bei -80 °C in 20 Vol% Glycerin für eine längerfristige Lagerung.

4.8.2 DNA-nSTV-SH-Konjugatsynthese

Wie in Kapitel 2.1.1.2 beschrieben, setzt sich nSTV-SH aus einer Mischung von STV-Mutanten mit einer statistischen Verteilung von null bis vier rekombinant eingeführten C-terminalen Cysteinrest zusammen. Ursache für die statistische Verteilung der STV-Untereinheiten ist die Expressionstechnik. Dabei wurde bei der Rekonstitution von STV ein Verhältnis von drei nativen STV-Monomeren zu einem STV-Monomer mit rekombinant eingeführten C-terminalen Cysteinrest gewählt. Dadurch sollte die Faltung von nSTV-SH mit einem C-terminalen Cysteinrest favorisiert werden.

Für die DNA-nSTV-SH-Konjugatsynthese wurde die Konjugatsynthesestrategie von DNA-nSTV-Konjugaten in 4.8.1 invertiert. Dafür wurde Amino-modifiziertes F9 (aF9) verwendet, wobei ein Überschuss von zwei Äquivalenten aF9 zu einen Äquivalenten nSTV-SH gewählt wurde.

Für die DNA-nSTV-SH-Konjugatsynthese wurden 50 μL 200 $\mu\text{mol/L}$ nSTV-SH (10.0 nmol) mit 390 μL PBS pH 7.2 verdünnt und mit 60 μL 1.0 mol/L DTT über Nacht im Dunkeln bei 37 °C inkubiert. Parallel wurden 200 μL 100 $\mu\text{mol/L}$ aF9 (10.0 nmol) mit 240 μL PBS pH 7.2 verdünnt und mit 2 mg sSMCC in 60 μL DMSO für 1.5 h im Dunkeln bei RT inkubiert.

Die 500 μL des DTT-aktivierten nSTV-SH und des F9-SMCC wurde nach 4.7.1.1 über NAP5- und NAP10-Säulen aufgereinigt. Die Reaktanten wurden dabei mit PBS pH 7.2 von den Säulen eluiert. Als erstes wurde F9-sSMCC aus der NAP10-Säulen in ein 3.0 mL Reaktionsgefäß eluiert und anschließend wurde das aktivierte Protein von der zweiten NAP10-Säule in dasselbe Reaktionsgefäß eluiert, so dass die Konjugation unmittelbar nach der NAP-Reinigung begann. Danach wurden das aktivierten nSTV-SH und das F9-SMCC für 1.5 h im Dunkeln bei RT inkubiert.

Zum Aufkonzentrieren wurden die Rohprodukte der Konjugatsynthese in ein Vivaspin 6 (MWCO: 30 kDa) gegeben und die Lösung wurde nach 4.7.1.2 in ca. 100 μL 30 Vol% Tris B umgepuffert und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Das Vivaspin wurde zweimal mit 150 μL 30 Vol% Tris B gespült und danach die Spülflüssigkeit in das Eppendorf Reaktionsgefäß mit der Konjugatlösung überführt.

Die Rohprodukte der Konjugatsynthese wurde mittels FPLC über eine Anionenaustausch-Säule (mono Q HR 5/5) aufgereinigt. Die Einstellungen der FPLC sind in *Tabelle 4.7* angeben. Die Konjugate wurden in Fraktionen zu 0.5 mL gesammelt und anhand der Peaktrennung des FPLC-Chromatogramms vereinigt.

Die vereinigten Peakfraktionen wurden in Vivaspin 6 (MWCO 10 kDa) nach 4.7.1.2 aufkonzentriert und in PBS umgepuffert, wobei das Volumen auf ca. 100 μL reduziert wurde.

Anschließend erfolgte die Quantifizierung nach der unter 4.7.1.3 beschriebenen Methoden für DNA-STV-Konjugate. Die Lagerung der DNA-nSTV-SH-Konjugate erfolgte bei -80 °C in 20 Vol% Glycerin.

4.8.3 DNA-STV-TCH-Konjugatsynthese

Die Vorschrift für die DNA-STV-TCH-Konjugatsynthese war weitestgehend analog zur DNA-nSTV-SH-Konjugatsynthese. Bei der DTT-Aktivierung dieser STV-Mutante wurde die verwendete Stoffmenge von DTT halbiert, um das Denaturieren von STV-TCH bei der Aktivierung zu vermeiden.

Für die DNA-STV-TCH-Konjugatsynthese wurden 40 µL 500 µmol/L STV-TCH (20.0 nmol) mit 430 µL PBS pH 7.2 verdünnt und mit 30 µL 1.0 mol/L DTT über Nacht im Dunkeln bei 37 °C inkubiert. Parallel wurden 100 µL mit 100 mol/L aF9 (10.0 nmol) mit 340 µL PBS pH 7.2 verdünnt und mit 2 mg sSMCC in 60 µL DMSO für 1.5 h im Dunkeln bei RT inkubiert.

Die 500 µL des DTT-aktivierten STV-TCH und des F9-SMCC wurde nach 4.7.1.1 über NAP5- und NAP10-Säulen aufgereinigt. Die Reaktanten wurden dabei mit PBS pH 7.2 von den Säulen eluiert. Als erstes wurde F9-sSMCC aus der NAP10-Säulen in ein 3.0 mL Reaktionsgefäß eluiert und anschließend wurde das aktivierte Protein von der zweiten NAP10-Säule in dasselbe Reaktionsgefäß eluiert, so dass die Konjugation unmittelbar nach der NAP-Reinigung begann. Danach wurden das aktivierte STV-TCH und das F9-SMCC für 1.5 h im Dunkeln bei RT inkubiert.

Zum Aufkonzentrieren wurden die Rohprodukte der Konjugatsynthese in ein Vivaspin 6 (MWCO: 30 kDa) gegeben und die Lösung wurde nach 4.7.1.2 in ca. 100 µL 30 Vol% Tris B umgepuffert und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Das Vivaspin wurde zweimal mit 150 µL 30 Vol% Tris B gespült und danach die Spülflüssigkeit in das Eppendorf Reaktionsgefäß mit der Konjugatlösung überführt.

Die Rohprodukte der Konjugatsynthese wurde mittels FPLC über eine Anionenaustausch-Säule (mono Q HR 5/5) aufgereinigt. Die Einstellungen der FPLC sind in *Tabelle 4.7* angeben. Die Konjugate wurden in Fraktionen zu 0.5 mL gesammelt und anhand der Peaktrennung des FPLC-Chromatogramms vereinigt.

Die vereinigten Peakfraktionen wurden in Vivaspin 6 (MWCO 10 kDa) nach 4.7.1.2 aufkonzentriert und in PBS umgepuffert, wobei das Volumen auf ca. 100 µL reduziert wurde.

Anschließend erfolgte die Quantifizierung nach 4.7.1.3. Die Lagerung der DNA-STV-TCH-Konjugate erfolgte in Aliquoten bei -80 °C in 20 Vol% Glycerin.

4.8.4 DNA-mSTV-Konjugatsynthese

Monovalentes Streptavidin (mSTV) setzt sich aus drei Untereinheiten mit stark reduzierter Biotinbindeaffinität und einer nativen STV-Untereinheit mit einem C-terminalen His₆-Taq zusammen. Diese STV-Mutante ist im Vergleich zu nSTV deutlich labiler gegenüber organischen Lösemittel (Vergleiche *Abbildung 2.16*). Darum wurden sämtliche verwendeten Crosslinker bei der DNA-mSTV-Konjugatsynthese in max. 3Vol% DMF gelöst, da das Protein in Gegenwart von DMSO oder höheren Anteilen DMF ausfällt.

DNA-mSTV-Konjugate wurden als wichtigste Bausteine für den Aufbau der Nanostrukturen **1** bis **4** verwendet, wobei auch häufig DNA-mSTV-Bikonjugate Verwendung fanden. Darum wurde die statistische Verteilung der kovalent an ein mSTV gebundenen Oligonucleotide zum Bikonjugat verschoben, indem das stöchiometrische Verhältnis von DNA:mSTV bei der Konjugation auf 1:1.5 reduziert wurde.

Für die DNA-mSTV-Konjugatsynthese wurden zu 100 μL mit 100 mol/L tF9 (10.0 nmol) 60 μL 1.0 mol/L DTT gegeben und über Nacht im Dunkeln bei 37 °C inkubiert. Vor Zugabe auf die NAP-5 Säule wurde das Volumen der Oligonucleotidlösung mit PBS pH 7.2 auf 500 μL aufgefüllt.

75 μL 200 $\mu\text{mol/L}$ mSTV (15.0 nmol) wurden mit 410 μL PBS pH 7.2 verdünnt und zur Proteinlösung wurden 0.5 mg sSMCC (\approx 1.2 μmol) in 15 μL DMSO gegeben. Anschließend wurde das nSTV für 1.5 h im Dunkeln bei RT mit dem Crosslinker inkubiert.

Die 500 μL des DTT-aktivierten tF9 und des mSTV-SMCC wurde nach 4.7.1.1 über NAP5- und NAP10-Säulen von niedermolekularen Bestandteilen (Salze, DTT und nicht reagiertem Crosslinker) getrennt. Die Reaktanten wurden dabei mit PBS pH 7.2 von den Säulen eluiert. Als erstes wurde mSTV-sSMCC aus der NAP10-Säulen in ein 3.0 mL Reaktionsgefäß eluiert und anschließend wurde das aktivierte Oligonucleotid von der zweiten NAP10-Säule in dasselbe Reaktionsgefäß eluiert, so dass die Konjugation unmittelbar nach der NAP-Reinigung begann. Danach wurden das aktivierten tF9 und das mSTV-SMCC für 1.5 h im Dunkeln bei RT inkubiert.

Zum Aufkonzentrieren wurden die Rohprodukte der Konjugatsynthese in ein Vivaspin 6 (MWCO: 30 kDa) gegeben und das Volumen wurde nach 4.7.1.2 auf 100.0 μL reduziert. Zu den Rohprodukten der Konjugatsynthese im Vivaspin wurde 1.0 μL 1.0 mol/L Mercaptoethanol pipettiert. Dann wurde die Rohprodukte der Konjugatsynthese in 100 μL 30 Vol% Tris B umgepuffert und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Das Vivaspin wurde zweimal mit 150 μL 30 Vol% Tris B gespült und danach die Spülflüssigkeit in das Eppendorf Reaktionsgefäß mit der Konjugatlösung überführt.

Die Rohprodukte der Konjugatsynthese wurde mittels FPLC über eine Anionenaustausch-Säule (mono Q HR 5/5) aufgereinigt. Die Einstellungen der FPLC sind in *Tabelle 4.17* angeben. Die Konjugate wurden in Fraktionen zu 0.5 mL gesammelt und anhand der Peaktrennung des FPLC-Chromatogramms vereinigt.

Tabelle 4.17: NaCl-Gradient bei der Anionenaustauschchromatographie an der FPLC für die DNA-mSTV-Konjugatsynthese.

V / mL	c _{NaCl} / mol/L
0.0-5.0	0.3
5.0-6.0	0.3-0.42
6.0-26.0	0.42-0.53
26.0-31.0	0.53-1.0
31.0-36.0	1.0

Die vereinigten Peakfraktionen wurden in Vivaspin 6 (MWCO 10 kDa) nach 4.7.1.2 aufkonzentriert und in PBS umgepuffert, wobei das Volumen auf ca. 100 μL reduziert wurde.

Anschließend erfolgte die Quantifizierung nach der unter 4.7.1.3 beschriebenen Methoden für DNA-STV-Konjugate. Eine erste Abschätzung der DNA-mSTV-Konjugate erfolgt unmittelbar bei der UV-Vis-Spektroskopie. Das A_{260}/A_{280} -Verhältnis erlaubte dabei eine Abschätzung über die Anzahl der kovalent gebundenen ssOligonucleotide.

Die Lagerung des DNA-mSTV-Konjugats erfolgte bei 4 °C bei Verwendung in den folgenden Wochen oder bei -80 °C in 20 Vol% Glycerin für eine längerfristige Lagerung.

4.8.4.1 Konjugatsynthese mit sSMPB

Die Vorschrift für die sSMPB verknüpfte DNA-mSTV-Konjugatsynthese war vollständig analog zur Synthese von DNA-mSTV-Konjugaten mit sSMCC (siehe 4.8.4). Anstelle von 0.5 mg sSMCC wurden 0.5 mg sSMPB (1.2 μmol) in 15.0 μL DMF verwendet.

4.8.4.2 Konjugatsynthese mit sSIAB

Die Vorschrift für die sSIAB verknüpfte DNA-mSTV-Konjugatsynthese war annähernd analog zur Synthese von DNA-mSTV-Konjugat mit sSMCC (4.8.4). Anstelle von 0.5 mg sSMCC wurden 0.5 mg sSIAB (1.0 μmol) in 15.0 μL DMF verwendet. Abweichend zu 4.8.4 wurde bei der sSIAB verknüpfte DNA-mSTV-Konjugatsynthese PBS pH 8.3 verwendet.

4.8.4.3 Konjugatsynthese mit PEG₄-SPDP

Zu 100 μL mit 100 mol/L tF9 (10.0 nmol) wurden 60 μL 1.0 mol/L DTT gegeben und die Lösung über 6 h im Dunkeln bei 37° C inkubiert. Vor Zugabe auf die NAP-5 Säule wurde das Volumen der Oligonucleotidlösung mit PBS pH 7.2 auf 500 μL aufgefüllt.

Parallel wurden 75 μL 200 $\mu\text{mol/L}$ mSTV (15.0 nmol) mit 410 μL PBS pH 7.2 verdünnt und zur Proteinlösung 0.75 mg PEG₄-SPDP (\approx 1.3 μmol) in 15 μL DMF gegeben. Anschließend wurde das mSTV über 1.5 h im Dunkeln bei RT mit dem Crosslinker inkubiert.

Die 500 μL des DTT-aktivierten tF9 und des mSTV-PEG₄-SPDP wurde nach 4.7.1.1 über NAP5- und NAP10-Säulen aufgereinigt. Die Reaktanten wurden dabei mit PBS pH 7.2 von den Säulen eluiert. Als erstes wurde mSTV- PEG₄-SPDP aus der NAP10-Säulen in ein 3.0 mL Reaktionsgefäß eluiert und anschließend wurde das aktivierte Oligonucleotid von der zweiten NAP10-Säule in dasselbe Reaktionsgefäß eluiert, so dass die Konjugation unmittelbar nach der NAP-

Reinigung begann. Danach wurden das aktivierten tF9 und das mSTV- PEG₄-SPDP für 16 h im Dunkeln bei 4 °C inkubiert.

Zum Aufkonzentrieren wurden die Rohprodukte der Konjugatsynthese in ein Vivaspin 6 (MWCO: 30 kDa) gegeben und das Volumen wurde nach 4.7.1.2 auf 100.0 µL reduziert. Zu den Rohprodukten der Konjugatsynthese im Vivaspin wurde 1.0 µL 1.0 mol/L Mercaptoethanol pipettiert. Dann wurde die Rohprodukte der Konjugatsynthese in 100 µL 30 Vol% Tris B umgepuffert und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Das Vivaspin wurde zweimal mit 150 µL 30 Vol% Tris B gespült und danach die Spülflüssigkeit in das Eppendorf Reaktionsgefäß mit der Konjugatlösung überführt.

Die Rohprodukte der Konjugatsynthese wurde mittels FPLC über eine Anionenaustausch-Säule (mono Q HR 5/5) aufgereinigt. Die Einstellungen der FPLC sind in *Tabelle 4.17* angeben. Die Konjugate wurden in Fraktionen zu 0.5 mL gesammelt und anhand der Peaktrennung des FPLC-Chromatogramms vereinigt.

Die vereinigten Peakfraktionen wurden in Vivaspin 6 (MWCO 10 kDa) nach 4.7.1.2 aufkonzentriert und in PBS umgepuffert, wobei das Volumen auf ca. 100 µL reduziert wurde.

Anschließend erfolgte die Quantifizierung nach 4.7.1.3. Die Lagerung des PEG₄-SPDP verknüpften DNA-mSTV-Konjugats erfolgte bei 4 °C bei Verwendung in den folgenden Wochen oder bei -80 °C in 20 Vol% Glycerin für eine längerfristige Lagerung.

4.8.4.4 Konjugatsynthese mit SM(PEG)₄

Die Vorschrift der SM(PEG)₄ verknüpften DNA-mSTV-Konjugatsynthese war analog zur DNA-mSTV-Konjugatsynthese mit PEG₄-SPDP nach 4.8.4.3. Anstelle von 0.75 mg PEG₄-SPDP wurden 0.75 mg SM(PEG)₄ (1.5 µmol) in 15.0 µL DMF verwendet.

4.9 Assemblierung von DNA-STV-Nanostrukturen

Die Assemblierung der DNA-nSTV-, DNA-mSTV-Nanohanteln **13**, **38**, **39**, der DNA-mSTV- Nanodoppelhanteln **1**, **2** und der DNA-mSTV-Y-Tripelhantel **3** erfolgte durch Hybridisierung von zueinander komplementären DNA-STV-Monokonjugaten Bikonjugaten. Als repräsentative Beispiele sind im Folgenden die Vorschriften für die Assemblierung der DNA-nSTV-Hantel **13** und die DNA-STV-Doppelhantel **40** beschrieben.

Für die Assemblierung der Nanohanteln **13** wurden 120.0 pmol F9-nSTV-Monokonjugat **5a** und 120.0 pmol cF9-nSTV-Monokonjugat **5b** in einem Volumen von 30 µL mit einer Konzentration von 4.0 µmol/L in PBS pH 7.2 in einem Eppendorf Reaktionsgefäß für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Charakterisierung mittels ndPAGE nach 4.6.1.1 und aAF4 nach 4.7.1.6.

Für die Assemblierung der DNA-STV-Doppelhanteln **40** wurden die verwendeten Konjugatbausteine mit biotinylierten Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Zu Assemblierung der DNA-mSTV-Doppelhanteln **40** wurden 120.0 pmol F9-mSTV-Bikonjugat **24** und 240.0 pmol cF9-nSTV-Monokonjugat **5b** in einem Volumen von 30 μ L und einer Konzentration von 4.0 μ mol/L in PBS-Mg PBS pH 7.2 in einem Eppendorf Reaktionsgefäß für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine Charakterisierung mittels ndPAGE nach 4.6.1.1 und aAF4 nach 4.7.1.6.

Bei alle im Weiteren beschriebenen aus DNA-mSTV-Konjugaten aufgebauten Nanostrukturen wurden für die Konjugatsynthese der heterobispezifische Crosslinker SM(PEG)₄ verwendet, um die Anteile der Konjugatdimere weit möglichst zu reduzieren. Zusätzlich wurden alle DNA-mSTV-Konjugaten vor der Nanostrukturassemblierung mit einem biotinylierten Fluoreszenzfarbstoff markiert, um sie nach der PAGE oder bei der aAF4 detektieren und zuordnen zu können.

4.9.1 DNA-mSTV-Doppelhantel 1

Für die Assemblierung der DNA-mSTV-Doppelhanteln **1** wurden pAF4 aufgereinigte DNA-mSTV-Konjugatbausteine zunächst mit biotinylierten Fluoreszenzfarbstoffen markiert, dann zur Doppelhantel assembliert und anschließend wurde **1** mittels aAF4 charakterisiert.

In einem ersten Schritt wurden F9-mSTV-Bikonjugat **33a** und cF9-mSTV-Monokonjugat **32b** mittels pAF4 nach 4.7.1.7 aufgereinigt. Dann wurden 125 pmol **33a** mit 250 pmol bAtto488 in 100 μ L PBS-Mg und parallel 250 pmol **32b** mit 500 pmol bAtto633 in 100 μ L PBS-Mg für 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend wurden **33a** und **32b** vereinigt und erneut für 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert.

Die Charakterisierung der Nanodoppelhantel **1** erfolgte mittels aAF4 nach 4.7.1.6.

4.9.2 DNA-mSTV-Doppelhantel: 2

Für die Assemblierung der DNA-mSTV-Doppelhanteln **2** wurden pAF4 aufgereinigte DNA-mSTV-Konjugatbausteine zunächst mit biotinylierten Fluoreszenzfarbstoffen markiert, dann zur Doppelhantel assembliert und anschließend wurde **2** mittels aAF4 charakterisiert.

In einem ersten Schritt wurden F9-mSTV-Monokonjugat **32a**, cF9-mSTV-Monokonjugat **32b** und cF10-mSTV-Monokonjugat **32d** mittels pAF4 nach 4.7.1.7 aufgereinigt. Dann wurden parallel 250 pmol **32a** mit 500 pmol bF10-Cy3 in 200 μ L PBS-Mg, 125 pmol **32b** mit 250 pmol bAtto633 in 100 μ L PBS-Mg und 125 pmol **32d** mit 250 pmol bAtto488 in 100 μ L PBS-Mg für 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert.

Anschließend wurde das F9-mSTV-Monokonjugat **32a** mit daran gebundenem bF10-Cy3 nach 4.7.1.1 über NAP Säulen gereinigt, nach 4.7.1.2 das Volumen auf ca. 80 μL reduziert und nach 4.7.1.3 quantifiziert. Von diesen fluoreszenzmarkierten Konjugat **32a**, **32b** und **32d** wurden jeweils 125 pmol entnommen und mit PBS-Mg auf ein Volumen von 100 μL verdünnt. Dann wurden die drei fluoreszenzmarkierten DNA-mSTV-Konjugate vereinigt und für 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert.

Die Charakterisierung der Nanodoppelhantel **2** erfolgte mittels aAF4 nach 4.7.1.6.

4.9.3 DNA-mSTV-Y-Tripelhantel **3**

Für die Assemblierung der DNA-mSTV-Y-Tripelhantel **3** wurden pAF4 aufgereinigte DNA-mSTV-Konjugatbausteine zunächst mit biotinylierten Fluoreszenzfarbstoffen markiert, dann zur Tripelhantel assembliert und anschließend wurde **3** mittels aAF4 charakterisiert.

In einem ersten Schritt wurden F9-mSTV-Bikonjugat **33a**, cF9-mSTV-Monokonjugat **32b** und cF10-mSTV-Monokonjugat **32d** mittels pAF4 nach 4.7.1.7 aufgereinigt. Es wurden parallel 500 pmol **33a** mit 1000 pmol bF10-Cy3 in 100 μL PBS-Mg, 250 pmol **32b** mit 500 pmol bAtto633 in 100 μL PBS-Mg und 125 pmol **32d** mit 250 pmol bAtto488 in 100 μL PBS-Mg für 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert.

Anschließend wurde das F9-mSTV-Bikonjugat **33a** mit daran gebundenem bF10-Cy3 nach 4.7.1.1 über NAP Säulen gereinigt, nach 4.7.1.2 das Volumen auf ca. 80 μL reduziert und nach 4.7.1.3 quantifiziert. Von diesen fluoreszenzmarkierten Konjugat **33a**, **32b** und **32d** wurden jeweils 250 pmol entnommen und mit PBS-Mg auf ein Volumen von 100 μL verdünnt. Dann wurden die drei fluoreszenzmarkierten DNA-mSTV-Konjugate vereinigt und für 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert.

Die Charakterisierung der Y-Tripelhantel **3** erfolgte mittels aAF4 nach 4.7.1.6.

4.9.4 Steigerung der Assemblierungseffizienz durch Furchen-Binder

Um die Assemblierungseffizienz der unter 4.9.1 bis 4.9.3 beschriebenen fluoreszenzmarkierten Nanostrukturen **1** bis **3** zu steigern, wurden bei der Inkubation der Gesamtstruktur zusätzlich Furchenbinder zugegeben.

Dafür wurden der natürliche kleine Furchenbinder Netropsin von Sigma-Aldrich (Hamburg, D) und der synthetische kleine Furchenbinder Hoechst 33258 von Sigma-Aldrich (Hamburg, D) ausgewählt. 50 mg Hoechst 33258 (80 μmol) wurde dafür in 8 mL DMF und 50 mg Netropsin (99 μmol) in 10 mL DMF gelöst. Die 100 mmol/L Furchenbinder-Lösungen wurden in Aliquoten zu 1 mL bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Für die Steigerung der Assemblierungseffizienz durch kleine Furchen-Binder wurden zum Inkubationsschritt aller Bausteine von **2** (siehe 4.9.2) zusätzlich 500 pmol (2 eq), 1250 pmol (5 eq) oder 2500 pmol (10 eq) eines der beiden kleinen Furchenbinder zugegeben. Die Lösungen der Furchenbinder zuvor auf eine Konzentration von 20 $\mu\text{mol/L}$ (für die geringste Konzentration) oder 200 $\mu\text{mol/l}$ (für die Ansätze mit 1.25 nmol und 2.5 nmol) in PBS-Mg verdünnt. Anschließend wurde der Einfluss der Furchenbinder auf die Assemblierung der Nanostruktur mittels aAF4 nach 4.7.1.6 untersucht.

4.10 Synthese von trivalentem STV 56

Als erstes wurde nach dem Protokoll für die DNA-STV-TCH-Konjugatsynthese unter 4.8.3 aus 120 nmol STV-TCH und 60 nmol aF1 das F1-STV-TCH-Konjugat **18** dargestellt.

Im zweiten Schritt der Synthese wurde F1-STV-TCH-Konjugat **18** kovalent über dem heterobispezifischen Crosslinker SM(PEG)₄ mit tF9 gekuppelt.

Dafür wurde zunächst 100 μL mit 100 mol/L tF9 (10.0 nmol) mit 60 μL 1.0 mol/L DTT für 6 h im Dunkeln bei 37° C aktiviert. Vor Zugabe auf die NAP5-Säule wurde das Volumen der Oligonucleotidlösung mit PBS pH 7.2 auf 500 μL aufgefüllt. Parallel wurde das zuvor dargestellte **18** mit PBS pH 7.2 auf ein Gesamtvolumen von 470 μL verdünnt. Zu der Proteinlösung wurden 0.75 mg SM-(PEG)₄ (1.5 μmol) in 15 μL DMF gegeben und **18** wurde über 1.5 h im Dunkeln bei RT mit dem Crosslinker inkubiert.

Dann wurde das DTT aktivierte tF9 und SM-(PEG)₄ derivatisierte **18** über NAP5 und NAP10 Säulen nach 4.7.1.1 aufgereinigt und mit PBS pH 7.2 eluiert. Anschließend wurden die Reaktanten in einem 3.0 mL Reaktionsgefäß vereinigt und für 16 h bei 4 °C im Dunkeln inkubiert.

Zum Aufkonzentrieren wurden die Rohprodukte der Konjugatsynthese in ein Vivaspin 6 (MWCO: 30 kDa) gegeben und das Volumen wurde nach 4.7.1.2 auf 100.0 μL reduziert. Zu den Rohprodukten der Konjugatsynthese im Vivaspin wurde 1.0 μL 1.0 mol/L Mercaptoethanol pipettiert. Dann wurde die Rohprodukte der Konjugatsynthese in 100 μL 30 Vol% Tris B umgepuffert und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Das Vivaspin wurde zweimal mit 150 μL 30 Vol% Tris B gespült und danach die Spülflüssigkeit in das Eppendorf Reaktionsgefäß mit der Konjugatlösung überführt.

Das Rohprodukt der Synthese des Bikonjugat **55** wurde mittels FPLC über eine Anionenaustausch-Säule (mono Q HR 5/5) aufgereinigt. Einstellungen der FPLC sind in *Tabelle 4.17* angegeben. Die Fraktionen wurden in 0.5 mL Ansätzen gesammelt und die Fraktionen der zusammengehörenden Peaks wurden nach Auswertung des FPLC-Chromatogramms vereinigt.

Die vereinigten Peakfraktionen wurden in Vivaspin 6 (MWCO 10 kDa) nach 4.7.1.2 aufkonzentriert und in PBS pH 7.2 umgepuffert, wobei das Volumen auf ca. 50 μL reduziert wurde.

Anschließend erfolgte die Quantifizierung von **55** nach der unter 4.7.1.3 beschriebene Methode für DNA-STV-Konjugate. Hierbei war zu beachten, dass sich α ($A_{260}(\text{DNA})/A_{280}(\text{DNA})$) aus der Absorption zweier unterschiedlicher Oligonucleotide zusammensetzte und α auch aus einer 2.0 $\mu\text{mol/L}$ F9 und 2.0 $\mu\text{mol/L}$ F1 Oligonucleotidlösung bestimmt wurden.

Im letzten Syntheseschritt wurde bF10-Cy3 an **55** gebunden und das dabei dargestellte trivalente STV **56** wurden erneut mittels FPLC aufgereinigt. Dafür wurden zu 0.75 nmol **55** in PBS pH 7.2 2 150 μL 100 $\mu\text{mol/L}$ bF10-Cy3 (1.5 nmol) in PBS pH 7.2 gegeben und für 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert.

Zum Aufkonzentrieren wurden die Rohprodukte der Konjugatsynthese von **56** in ein Vivaspin 15R (MWCO: 30 kDa) gegeben und das Volumen wurde nach 4.7.1.2 auf 100.0 μL reduziert. Dann wurde die Rohprodukte der Konjugatsynthese in 100 μL 30 Vol% Tris B umgepuffert und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Das Vivaspin wurde zweimal mit 150 μL 30 Vol% Tris B gespült und danach die Spülflüssigkeit in das Eppendorf Reaktionsgefäß mit der Konjugatlösung überführt.

Das Rohprodukt der Synthese des Bikonjugat **56** wurde mittels FPLC über eine Anionenaustausch-Säule (mono Q HR 5/5) aufgereinigt. Einstellungen der FPLC sind in *Tabelle 4.18* angeben. Die Fraktionen wurden in 0.5 mL Ansätzen gesammelt und die Fraktionen der zusammengehörenden Peaks wurden nach Auswertung des FPLC-Chromatogramms vereinigt.

Tabelle 4.18: NaCl-Gradient bei der Anionenaustauschchromatographie an der FPLC für trivalentes STV **56**.

V / mL	c _{NaCl} / mol/L
0.0-5.0	0.3
5.0-6.0	0.3-0.43
6.0-26.0	0.43-0.51
26.0-34.0	0.51-1.0
33.0-38.0	1.0

Anschließend wurden die gesammelten Fraktionen von **56** in einem Vivaspin 15R (MWCO: 30 kDa) in 100 μL PBS pH 7.2 umgepuffert. Dann erfolgte die Quantifizierung nach 4.7.1.3 anhand der spezifischen Absorption des fluoreszenten Farbstoffes Cy3 ($\epsilon = 150000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

Sämtliche der Reaktionsschritte der Darstellung von trivalentem STV wurden mittels ndPAGE und die kovalenten Konjugatsyntheseschritte wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

4.11 Synthese der DNA-mSTV-Hanteln 75 und 77 mit längeren DNA-Abstandshaltern

In einem ersten Schritte erfolgte die Synthese eines bis-biotinylierten DNA-Fragments (b₂255) und eines 486-basenpaar-langen bis-biotinylierten DNA-Fragments (b₂486) mittels PCR mit einem iProof DNA Polymerase System.

Dafür wurden zunächst nach *Tabelle 4.19* fünf Arbeitslösungen angesetzt.

Tabelle 4.19: Zusammensetzung für die Arbeitslösungen zu je 50 µL bei der PCR.

Lösung	Zusammensetzung
Arbeitslösung mit Primer S255	10 µ/mol S255 (5 µL S256 + 45 µL TE)
Arbeitslösung mit Primer A255	10 µ/mol A255 (5 µL A256 + 45 µL TE)
Arbeitslösung mit Primer S486	10 µ/mol S486 (5 µL S485+ 45 µL TE)
Arbeitslösung mit Primer A486	10 µ/mol A486 (5 µL A485 + 45 µL TE)
Arbeitslösung mit Templat pUC19	20 mg/L pUC19 (1 µL pUC19 + 49 µL TE)

Mit den in *Tabelle 4.19* vorgegebenen Arbeitslösungen wurden für die beiden bis-biotinylierten DNA-Fragmente jeweils zehn Ansätze nach *Tabelle 4.20* in PCR-Reaktionsgefäßen angesetzt. Bei der PCR des b₂468 war die Verwendung des im iProof-Polymerase-Sets mitgelieferten GC-Puffers anstatt des HF-Puffers notwendig. Zudem ließen sich bei der Verwendung von 1.0 µL iProof DNA Polymerase bei der Synthese des b₂468 höhere Ausbeuten erzielen.

Tabelle 4.20: Ansätze für die PCR von b₂255 und b₂468.

Lösung	V / µL	Arbeitslg.	Endkonz.		
iProof HF Puffer (5x)	10	5		1	
dNTP Mischung	1	10	mmol/L	200	µmol/L
Primer (S255 oder S486)	1	10	µmol/L	0.2	µmol/L
Primer (A255 oder A486)	1	10	µmol/L	0.2	µmol/L
Templat (pUC19)	1	20	mg/L	20	ng
H₂O	35.5				
iProof DNA Polymerase	0.5	10	mU/L	0.02	U/µl
Gesamtvolumen	50				

Danach erfolgten die 35 Zyklen der PCR nach den in *Tabelle 4.21* beschriebenen Bedingungen in einem PTC-200 Thermo Cycler.

Tabelle 4.21: PCR-Bedingungen für die Synthese von b₂255 und b₂468. Schritte 2 bis 3 werden 35-mal wiederholt (PCR-Zyklen).

Schritt	T / ° C	t / s
1	98	30
2	98	10
3	53	10
4	72	15
5	72	300
6	8°	bis Ende

Die Qualität der PCR-Produkte der einzelnen PCR-Reaktionsgefäße wurde nach 4.6.2 mittels 1.2% Agarose-Gelen analysiert. Im nächsten Schritt wurden die PCR-Produkte aller b₂255 bzw. b₂468 vereinigt und nach Anleitung des Herstellers mit einem Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) – DNA Clean & Concentrator™ Kit von Zymo Research aufgereinigt.

Die Aufreinigung wurde erneut mittels 1.2% Agarose-Gele kontrolliert. Danach wurden in einem letzten Schritt die aufgereinigten b₂255 und b₂468 DNA-Fragmente nach 4.7.1.2 in Vivaspin 500 (MWCO: 100 kDa) in 200 µL PBS pH 7.2 aufgepuffert.

Repräsentativ für die Assemblierung der DNA-mSTV-Hanteln mit längeren DNA-Abstandshaltern ist die Synthesevorschrift am Beispiel den Nanohantel **75** beschrieben. Die Vorschrift zur Assemblierung der Nanohantel **77** war analog zur hier beschriebenen Synthesevorschrift von **75**.

Für die Assemblierung der Nanohantel **75** wurden zu 200 µL 2.3 µmol/L b₂255 (460 pmol) 9.2 µL 200 µmol/L mSTV gegeben (18.4 pmol) und für eine Stunde bei RT inkubiert. Die Assemblierung der Nanohantel wurde anschließend mit einem 1.2% Agarose-Gel nach 4.5.2 charakterisiert.

Die Aufreinigung von DNA-mSTV-Hanteln **75** mit längeren DNA-Abstandshaltern erfolgte durch ein präparatives 1.2% Agarose-Gel in einer E-H6 Elektrophoresekammer. Es wurden jeweils 70 µL der Rohprodukte der Assemblierung von **75** in die Taschen des präparativen Gels gegeben. Dabei wurde abweichend zu analytischen Gelen eine konstante Spannung von 145 V für 45 min bei RT gewählt. Das Agarosegel wurde mit dem Alphaimager 2200 dokumentiert, die Gelbanden von **75** aus dem Gel geschnitten und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt.

Nach Anleitung des Herstellers wurden die Banden der Nanohantel **75** mit einem Montage™ DNA Gel Extraction Kit von Millipore aus den vorher aus dem Gel geschnittenen und zerkleinerten Gelbanden extrahiert.

Die weitere Charakterisierung der Nanohantel **75** erfolgte mittels ndPAGE und AFM.

4.12 Synthese von fluoreszenten Nanohanteln

Im ersten Schritt der Synthese von fluoreszenten Nanohanteln wurden Konjugate aus den Fluoreszenzproteinen EGFP und mDsRed und den Oligonucleotiden F9 und cF9 hergestellt und mittels ndPAGE charakterisiert. Im zweiten Schritt wurden die DNA-FP-Konjugate mit komplementären DNA-FP-Konjugaten hybridisiert und die dabei assemblierten fluoreszenten Nanohanteln wurden erneut mittels ndPAGE charakterisiert.

4.12.1 DNA-Fluoreszenzprotein-Konjugatsynthese

Die Konjugation basiert auf der Synthesestrategie der unter 4.8.2 beschriebenen DNA-nSTV-SH-Konjugatsynthese. Als repräsentative Synthesevorschrift ist hier die Darstellung von F9-EGFP-Konjugat **79a** beschrieben. Die Konjugatsynthesen der weiteren DNA-FP-Konjugaten folgten einer analogen Synthesevorschrift.

Zunächst wurden 75 μL 200 $\mu\text{mol/L}$ EGFP (15.0 nmol) mit 365 μL PB pH 8.3 verdünnt und mit 60 μL 1.0 mol/L DTT über Nacht im Dunkeln bei 37 °C inkubiert. Parallel wurde 100 μL mit 100 mol/L aF9 (10.0 nmol) mit 340 μL PB pH 8.3 verdünnt und mit 2 mg sSMCC in 60 μL DMSO für 1.5 h im Dunkeln bei RT inkubiert.

Die 500 μL des DTT-aktivierten EGFP und des F9-SMCC wurde nach 4.7.1.1 über NAP5- und NAP10-Säulen aufgereinigt. Die Reaktanten wurden dabei mit PB pH 8.3 von den Säulen eluiert. Als erstes wurde F9-sSMCC aus der NAP10-Säulen in ein 3.0 mL Reaktionsgefäß eluiert und anschließend wurde das aktivierte FP von der zweiten NAP10-Säule in dasselbe Reaktionsgefäß eluiert, so dass die Konjugation unmittelbar nach der NAP-Reinigung begann. Danach wurden das aktivierte EGFP und das F9-SMCC für 1.5 h im Dunkeln bei RT inkubiert.

Zum Aufkonzentrieren wurden die Rohprodukte der Konjugatsynthese von **79a** in ein Vivaspin 6 (MWCO: 30 kDa) gegeben und die Lösung wurde nach 4.7.1.2 in ca. 100 μL 30 Vol% Tris B umgepuffert und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Das Vivaspin wurde zweimal mit 150 μL 30 Vol% Tris B gespült und danach die Spülflüssigkeit in das Eppendorf Reaktionsgefäß mit der Konjugatlösung überführt.

Die Rohprodukte der Konjugatsynthese wurde mittels FPLC über eine Anionenaustausch-Säule (mono Q HR 5/5) aufgereinigt. Die Einstellungen der FPLC sind in *Tabelle 4.22* angegeben. Die Konjugate wurden in Fraktionen zu 0.5 mL gesammelt und anhand der Peaktrennung des FPLC-Chromatogramms vereinigt.

Tabelle 4.22: NaCl-Gradient bei der Anionenaustauschchromatographie an der FPLC für die DNA-FP-Konjugatsynthese.

V / mL	c _{NaCl} / mol/L
0.0-5.0	0.3
5.0-6.0	0.3-0.45
6.0-18.0	0.45-0.50
18.0-23.0	0.50-1.0
23.0-28.0	1.0

Die vereinigten Peakfraktionen wurden in einem Vivaspin 6 (MWCO 10 kDa) nach 4.7.1.2 aufkonzentriert und in PBS pH 7.2 umgepuffert, wobei das Volumen auf ca. 100 μL reduziert wurde.

Anschließend erfolgte die Quantifizierung nach 4.7.1.3 mittels des Lambert-Beersches Gesetz anhand der spezifischen Absorption von EGFP (siehe *Tabelle 4.3*). Die Lagerung der DNA-EGFP-Konjugate erfolgte bei -80 °C in 20 Vol% Glycerin.

4.12.2 Assemblierung der DNA-FP-Nanohanteln

Für die Assemblierung der fluoreszenten Nanohanteln **81** wurde zu 40 μL 6.0 $\mu\text{mol/L}$ **79a** (240 pmol) 40 μL 6.0 $\mu\text{mol/L}$ **79b** (240 pmol) gegeben und die Konjugate wurden eine Stunde bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Assemblierung der DNA-mDsRed-Nanohantel **82** folgte einer analogen Synthesevorschrift.

Die Charakterisierung der fluoreszenten Nanohanteln **81** und **82** erfolgte mittels ndPAGE und AFM.

4.13 Herstellung von Nanopartikel-Protein Hybriden als Plattform für SERRS

Für die Aggregation der Nanopartikel-Protein Hybride **85** wurden zunächst die einzelnen Bausteine hergestellt. Als erster Baustein wurden A24-EGFP-Konjugate **79c** nach 4.12.1 aus EGFP und dem Oligonucleotid aA24 dargestellt. Der zweite Baustein bestand in mit zwei Thiol-modifizierten Oligonucleotiden funktionalisierte Au-NP **84**. Für die Funktionalisierung der Au-NP wurden die Oligonucleotidsequenzen cA24 und A12 gewählt. Die mit der Oligonucleotidsequenz B12 modifizierten Ag-NP **83** wurden aus den Arbeitsgruppen von Professor Graham (University of Strathclyde) und Dr. Ljiljana Fruk (KIT) bereitgestellt.

4.13.1 DNA-Funktionalisierung von Au-NP

Die im Folgenden beschriebenen Au-NP₂₃ wurden von Jens Reiber nach der Citrat-Reduktionsmethode in vier unterschiedlichen Chargen synthetisiert. Die Größe der Au-NP₂₃ wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie anhand einer Kalibriergeraden bestimmt. Die Quantifizierung^[236] erfolgte nach dem Lambert-Beerschen Gesetz unter Verwendung der spezifischen Absorption der Au-NP₂₃ bei $\lambda = 525 \text{ nm}$ mit einem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{\text{Au-NP}} = 1330000 \text{ L/mol}\cdot\text{cm}$.^[220]

Die nicht funktionalisierten Au-NP₂₃ wurden bei 4 °C im Dunkeln in einer 1.0 Vol% Citratlösung gelagert.

Als beispielhafte Vorschrift ist die Modifikation von Au-NP₂₃ im Folgenden mit den Oligonucleotidsequenzen cA24 und A12 beschrieben.

4.13.1.1 Protokoll mit Citrat-stabilisierten NP

800 μL 100 mmol/L Thiol-modifizierte A12 (tA12; 80 nmol) wurden mit 480 μL 1.0 mol/L DTT über Nacht im Dunkeln bei 37 °C aktiviert. Parallel wurden 400 μL 100 mmol/L tcA24 (40.0 nmol) mit 240 μL 1.0 mol/L DTT versetzt und über Nacht im Dunkeln bei 37 °C inkubiert.

Die beiden aktivierten Oligonucleotide wurde nach 4.7.1.1 über NAP-Säulen aufgereinigt und dabei mit H₂O eluiert. Anschließend wurde die Oligonucleotidkonzentration mittels des Lambert-Beersches Gesetz (siehe *Formel 4.1*) anhand der spezifischen Oligonucleotidabsorption bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ bestimmt.

Die Oligonucleotidlösungen wurden dann auf Konzentrationen von 2.8 $\mu\text{mol/L}$ für tcA24 und 5.6 $\mu\text{mol/L}$ für tA12 durch Verdünnen mit H_2O eingestellt. Anschließend wurden je 5.0 mL 2.8 $\mu\text{mol/L}$ tcA24 und 5.6 $\mu\text{mol/L}$ tA12 vereinigt und zu 10.0 mL einer 0.924 nmol/L Au-NP₂₃ in H_2O (Verhältnis: cA24:A12:Au-NP₂₃ = 1500:3000:1) zugegeben. Die Reaktionslösungen wurden über Nacht bei RT im Dunkeln inkubiert.

Am nächsten Tag wurden zu der Reaktionslösung 20.0 mL TETBS 300 gegeben (Verdünnung von 1:1), wodurch eine NaCl-Konzentration von 150 $\mu\text{mol/L}$ erzielt wurde. Die Reaktionslösung wurde anschließend für zwei weitere Tage im Dunkeln bei RT inkubiert.

Zur Aufreinigung der DNA-funktionalisierten Au-NP **84** wurde die Lösung in 2.0 mL Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und in diesen für 15 min bei 12000 G und 4 °C zentrifugiert bis keine rote Färbung mehr zu erkennen war. Der farblose Überstand wurde entnommen und der rote Rückstand in 1.0 mL TETBS resuspendiert. Nach zweimaliger Wiederholung von Zentrifugation und Resuspendierung wurden **84** in TETBS 300 bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Die Quantifizierung unter Verwendung der spezifischen Absorption der Au-NP₂₃ bei $\lambda = 529 \text{ nm}$ (leichte Rotverschiebung in Folge der Funktionalisierung) erfolgte bei einem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{\text{Au-NP}} = 1330000 \text{ L/mol}\cdot\text{cm}$.

4.13.1.2 Protokoll mit BSPP stabilisierten NP

800 μL 100 mmol/L Thiol-modifizierte A12 (tA12; 80 nmol) wurden mit 480 μL 1.0 mol/L DTT über Nacht im Dunkeln bei 37 °C aktiviert. Parallel wurden 400 μL 100 mmol/L tcA24 (40.0 nmol) mit 240 μL 1.0 mol/L DTT versetzt und über Nacht im Dunkeln bei 37 °C inkubiert.

Die beiden aktivierten Oligonucleotide wurde nach 4.7.1.1 über NAP-Säulen aufgereinigt und dabei mit H_2O eluiert. Anschließend wurde die Oligonucleotidkonzentration mittels des Lambert-Beersches Gesetz (siehe *Formel 4.1*) anhand der spezifischen Oligonucleotidabsorption bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ bestimmt.

Zu 32.5 mL 0.924 nmol/L Citrat-stabilisierten Au-NP₂₃ (30 pmol) wurden 13.5 mg BSPP ($\approx 250 \text{ nmol}$) gegeben und die kolloidale Nanopartikellösung über Nacht bei RT inkubiert.

Zu der kolloidalen Nanopartikellösung wurden so lange kleine Mengen NaCl gegeben, bis ein Farbumschlag der Lösung von burgunderrot nach dunkelviolet zu beobachten war. Dann wurde die Lösung bei 3000 G für 60 min zentrifugiert und der farblose Überstand abgenommen. Der dunkle Rückstand wurde in 5 mL 2.5 mmol/L ($\approx 12.5 \mu\text{mol}$) BSPP resuspendiert.

Die Quantifizierung der DTT-aktivierten Oligonucleotide und der BSPP-stabilisierten Au-NP₂₃ erfolgte nach 4.7.1.3 bei der spezifischen Absorption der Oligonucleotide von $\lambda = 260 \text{ nm}$ bzw. der Au-NP₂₃ von $\lambda = 525 \text{ nm}$ mit einem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{\text{Au-NP}} = 1330000 \text{ L/mol}\cdot\text{cm}$.

Im nächsten Schritt wurden die aktivierten Oligonucleotide mit den BSPP-stabilisierten Au-NP₂₃ in einem Verhältnis von 3000:1500:1 (A12:cA24:Au-NP₂₃) vereint. Dafür wurden die Oligonucleotidlösungen auf Konzentrationen von 20 µmol/L für tA12 und 10 µmol/L für tcA24 durch Verdünnen mit H₂O eingestellt. Anschließend wurden jeweils 4.0 mL der Oligonucleotidlösungen vereinigt und zu 8.0 mL der BSPP-stabilisierten und mit H₂O verdünnten 3.3 nmol/L Au-NP₂₃ gegeben. Die Reaktionslösungen wurden über Nacht bei RT im Dunkeln inkubiert.

Am nächsten Tag wurden zu der Reaktionslösung 16.0 mL TETBS gegeben (Verdünnung von 1:1), wodurch eine NaCl-Konzentration von 75 µmol/L erzielt wurde. Die Reaktionslösung wurde für einen weiteren Tag im Dunkeln bei RT inkubiert.

Zu der Reaktionslösung wurden dann 16.0 mL TETBS 300 gegeben, wodurch die NaCl-Konzentration auf 150 µmol/L erhöht wurde. Die Reaktionslösung wurde wieder für 24 h im Dunkeln bei RT inkubiert.

In einem letzten Inkubationsschritt wurde die NaCl-Konzentration durch Zugabe von weiteren 32 mL TETBS 300 auf 225 µmol/L erhöht und es folgte eine weitere Inkubation von einem Tag im Dunkeln bei RT.

Zur Aufreinigung der DNA-funktionalisierten Au-NP **84** wurde die Lösung in 2.0 mL Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und in diesen für 15 min bei 12000 G und 4 °C zentrifugiert bis keine rote Färbung mehr zu erkennen war. Der farblose Überstand wurde entnommen und der rote Rückstand in 1.0 mL TETBS resuspendiert. Nach zweimaliger Wiederholung von Zentrifugation und Resuspendierung wurden **84** in TETBS 300 bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Die Quantifizierung unter Verwendung der spezifischen Absorption der Au-NP₂₃ bei $\lambda = 529$ nm (leichte Rotverschiebung in Folge der Funktionalisierung) erfolgte bei einem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{\text{Au-NP}} = 1330000$ L/mol·cm.

4.13.2 Charakterisierung der DNA-modifizierten NP und darauf aufbauender Nanostrukturen

Die Charakterisierung der DNA-funktionalisierten Au-NP **84** und **86** erfolgte mittels UV/Vis-Spektroskopie, Agarose-Gelelektrophorese, DLS und TEM.

Alle folgenden Messmethoden sind am Beispiel der Charakterisierung von DNA-bifunktionalisierten Au-NP **84** und damit aufgebauter Nanostrukturen beschrieben.

In einer ersten Experimentreihe wurden mittels UV/Vis-Spektroskopie Absorptionsspektren von **84** bei ansteigenden NaCl-Konzentrationen gemessen. Dabei wurden in fünf Proben mit 75 µL 100.0 pmol/L **84** angesetzt. In jeder dieser Proben wurde einer der NaCl-Konzentration nach *Tabelle 4.23* (obere Reihe) eingestellt.

In einer zweiten Experimentreihe wurden mittels UV/Vis-Spektroskopie Absorptionsspektren einer gemischten Probe der DNA-funktionalisierten Au-NP **84**

mit **86** bei ansteigender Konzentration des verbrückenden Oligonucleotids cA12cB12 gemessen. Dafür wurden neun Proben mit jeweils 50 μL 100.0 pmol/L **84** und 50 μL 100.0 pmol/L **86** vorbereitet. In jeder dieser Proben wurde einer der cA12cB12-Konzentration nach *Tabelle 4.23* (untere Reihe) eingestellt.

Tabelle 4.23: *gewählten NaCl-Konzentrationen und cA12cB12-Konzentrationen für die Salzfällung mit **84** und Bestimmung von $\Delta\lambda_{\text{Red}}$ bei der Assemblierung von **84** mit **86**.*

c_{NaCl} mmol/L	150	312.5	625	1250	2500					
c_{cA12cB12} pmol/L	0	93.75	187.5	375	750	1500	3000	6000	12000	

Die Nanopartikellösung der ersten Experimentreihe wurde über Nacht bei RT im Dunkeln inkubiert und am nächsten Tag wurden 40 μL der Au-NP-Lösungen mit unterschiedlichem Salzgehalt in 30 μL -Quarz-Küvetten am Photometer in einem Wellenbereich von 200 nm bis 800 nm vermessen.

Mittels der Absorptionsspektren wurde die NP-Proben nach 4.7.1.3 bei der spezifischen Absorption $\lambda = 525 \text{ nm}$ mit einem Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{\text{Au-NP}} = 1330000 \text{ L/mol}\cdot\text{cm}$ quantifiziert. Aus dem Vergleich der Au-NP-Konzentration bei unterschiedlichem NaCl-Gehalt wurde die Stabilität der DNA-funktionalisierten Au-NP abgeschätzt.

In der zweiten photometrischen Experimentreihe wurden die UV/Vis-Spektren von 75.0 pmol/L **84** zusammen mit 75.0 pmol/L **86** unter der Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen des verlinkenden Oligonucleotids cA12cB12 (0 eq, 1.25 eq, 2.5 eq, 5 eq, 10 eq, 20 eq, 40 eq, 80 eq und 160 eq; die genauen Konzentrationen sind in *Tabelle 4.23* angeben) aufgenommen. Die Nanopartikellösung wurde über Nacht bei RT im Dunkeln inkubiert und die Absorption der neun NP-Proben anschließend in einer 30 μL -Quarz-Küvetten am UV/Vis-Spektrometer von $\lambda = 400 \text{ nm}$ bis $\lambda = 800 \text{ nm}$ bestimmt.

Zur Auswertung wurden aus diesen Spektren die Maxima der Rotverschiebung $\Delta\lambda_{\text{rot}}$ (Bestimmung von $\Delta\lambda_{\text{rot}}$ ist in *Abbildung 4.2* dargestellt) mit den eingesetzten Äquivalenten der verlinkenden Oligonucleotids cA12cB12 aufgetragen.

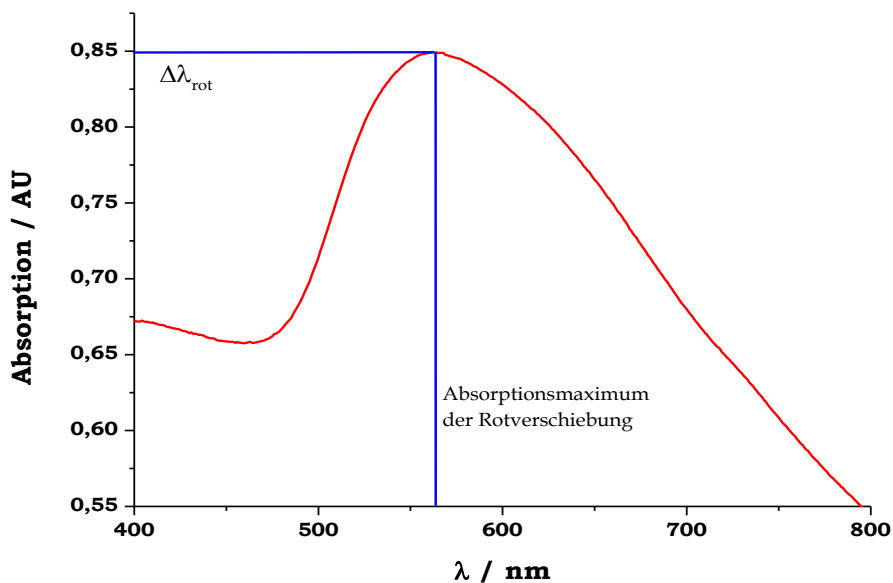


Abbildung 4.2: UV/Vis-Spektrum von **84** und **86** in Gegenwart von 160 eq cA12cB12 mit eingezeichneten Geraden zur Bestimmung von $\Delta\lambda_{rot}$

Als dritte Gruppe von Messungen am Photometer wurden Schmelzkurven von DNA-modifizierten Au-NP und daraus aggregierten Nanostrukturen aufgenommen. Dafür wurde jeweils 1 mL von 500.0 pmol/L **84**, 500.0 pmol/L **84** + 20.0 nmol/L cA12cB12 und 500.0 pmol/L **84** + 500.0 pmol/L **86** + 20.0 nmol/L cA12cB12 in einem Eppendorf Reaktionsgefäß über Nacht im Dunkeln inkubiert. Als nächstes wurden die NP-Lösungen in eine Küvette für Magnetrührstäbchen überführt und die Schmelzkurven bei Wellenlängen von $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 529$ in einem Temperaturbereich von 24 °C bis 65 °C unter ständigem Rühren aufgenommen.

Eine weitere Charakterisierung der **84** erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Dabei wurden zunächst die optimalen Gelelektrophoresebedingungen für die Au-NP₂₃ ermittelt, indem alle in *Tabelle 4.13* aufgeführten Agarosegele bei der Gelelektrophorese mit DNA-funktionalisierten Au-NP **84** getestet wurden. Alle weiteren Gelelektrophoresen mit funktionalisierten Au-NP erfolgten daraufhin mit 0.5% Agarose-Gelen, da bei diesen das beste Verhältnis von Bandenauflösung und Bandentrennung erreicht wurde.

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden jeweils 5 μ L 1 nmol/L NP-Lösung (5.0 fmol) **84**, **83**, **84** mit 5 pmol A24-EGFP, **84** mit 100 pmol cA12cB12, **84** und **86**, **84** und **86** mit 100 pmol cA12cB12, **86** und **84** mit 100 pmol cA12cB12 und 5 pmol A24-EGFP über Nacht im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Proben wurden mit 0.75 μ L Au-NP-Ladepuffer gemischt und in die Taschen eines 0.5% Agarose-Gels geladen. Die Agarose-Gelelektrophorese erfolgte bei 150 V für 35 min bei 4 °C. Für die Dokumentation wurde ein Flachbettscanner gewählt, da die roten Au-NP₂₃-Banden keiner weiteren Färbemethode bedurften.

Eine weitere Charakterisierung von **84** erfolgte mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS). Dafür wurden 50.0 μL 1.0 nmol/L (50.0 fmol) unterschiedlicher Au-NP Lösungen nach *Tabelle 4.24* angesetzt und über Nacht im Dunkeln bei RT inkubiert. Der hydrodynamische Radius der DNA-modifizierten Au-NP und daraus aufgebauter Nanostrukturen wurde anschließend in 30 μL -Quarz-Küvetten im Zetasizer Nano S bestimmt.

Tabelle 4.24: Zusammenstellung der DNA-modifizierten Au-NP und daraus aufgebauter Nanostrukturen für die DLS und TEM in fmol.

84	50	50	50	50
86		50	50	50
79c		50000		50000
cA12cB12			2000	2000

Als letzte Methode zur Charakterisierung der DNA-modifizierten Au-NP **84** und daraus aufgebauter Nanostrukturen wurden diese an einem FEI CM200 Transmissionselektronenmikroskop (TEM) vermessen. Dafür wurden erneut 50.0 μL 1.0 nmol/L der unterschiedlichen Au-NP Lösungen nach *Tabelle 4.24* angesetzt und über Nacht im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend wurden 25.0 μL der inkubierten NP-Lösung nach 4.3.7 auf ein TEM-Gitter gegeben und für 30 min bei RT getrocknet.

5 Literaturverzeichnis

- [1] M. Boncheva, G. M. Whitesides, *Making things by self-assembly*, MRS Bull., **30**, 10 (2005), 736-42.
- [2] V. Palermo, P. Samori, *Molecular self-assembly across multiple length scales*, Angew. Chem., Int. Ed., **46**, 24 (2007), 4428-32.
- [3] L. C. Palmer, Y. S. Velichko, M. O. de la Cruz, S. I. Stupp, *Supramolecular self-assembly codes for functional structures*, Phil. Trans. R. Soc. A, **365**, 1855 (2007), 1417-33.
- [4] S. Zhang, *Designer self-assembling peptide scaffolds*, Xenotransplantation, **14**, 5 (2007), 393-4.
- [5] J. Elemans, A. E. Rowan, R. J. M. Nolte, *Mastering molecular matter. Supramolecular architectures by hierarchical self-assembly*, J. Mater. Chem., **13**, 11 (2003), 2661-70.
- [6] K. Van Workum, J. F. Douglas, *Symmetry, equivalence, and molecular self-assembly*, Phys. Rev. E, **73**, 3 (2006).
- [7] G. M. Whitesides, B. Grzybowski, *Self-assembly at all scales*, Science, **295**, 5564 (2002), 2418-21.
- [8] W. H. Binder, V. Barragan, F. M. Menger, *Domains and rafts in lipid membranes*, Angew. Chem. Int. Ed., **42**, 47 (2003), 5802-27.
- [9] I. W. Hamley, *Nanotechnology with soft materials*, Angew. Chem. Int. Ed., **42**, 15 (2003), 1692-712.
- [10] C. M. Niemeyer, *Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: Biotechnology meets materials science*, Angew. Chem., Int. Ed., **40**, 22 (2001), 4128-58.
- [11] J.-M. Lehn, *From supramolecular chemistry towards constitutional dynamic chemistry and adaptive chemistry*, Chem. Soc. Rev., **36**, 2 (2007), 151-60.
- [12] C. M. Niemeyer, *Functional Devices from DNA and Proteins*, Nanotoday, **2**, 2 (2007), 42-52.
- [13] C. M. Niemeyer, C. A. Mirkin, *Nanobiotechnology: Concepts, Applications and Perspectives*; WILEY-VCH Verlag: weinheim, 2004.
- [14] C. A. Mirkin, C. M. Niemeyer, *Nanobiotechnology II - More Concepts and Applications*; WILEY-VCH Verlag: Weinheim, 2007.
- [15] O. I. Wilner, I. Willner, *Functionalized DNA Nanostructures*, Chem. Rev., **112**, 4 (2012), 2528-56.
- [16] B. Sacca, C. M. Niemeyer, *Functionalization of DNA nanostructures with proteins*, Chem. Soc. Rev., **40**, 12 (2011), 5910-21.
- [17] N. C. Seeman, *At the crossroads of chemistry, biology, and materials: Structural DNA nanotechnology*, Chem. Biol., **10**, 12 (2003), 1151-9.
- [18] N. C. Seeman, *From genes to machines: DNA nanomechanical devices*, Trends Biochem. Sci., **30**, 3 (2005), 119-25.
- [19] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid*, Nature, **171**, 4356 (1953), 737-8.
- [20] R. L. Letsinger, K. K. Ogilvie, *Nucleotide chemistry. XIII. Synthesis of oligothymidylates via phosphotriester intermediates*, J. Am. Chem. Soc., **91**, 12 (1969), 3350-5.
- [21] M. D. Matteucci, M. H. Caruthers, *Synthesis of deoxyoligonucleotides on a polymer support*, J. Am. Chem. Soc., **103**, 11 (1981), 3185-91.
- [22] N. C. Seeman, *DNA enables nanoscale control of the structure of matter*, Q. Rev. Biophys., **38**, 4 (2005), 363-71.
- [23] C. M. Niemeyer, *Semisynthetic DNA-Protein Conjugates for Biosensing and Nanofabrication*, Angew. Chem. Int. Ed., **49**, 7 (2010), 1200-16.
- [24] K. E. Drexler, *Molecular engineering: An approach to the development of general capabilities for molecular manipulation*, PNAS, **78**, 9 (1981), 5275-8.
- [25] N. C. Seeman, *Nucleic acid junctions and lattices*, J. Theor. Bio., **99**, 2 (1982), 237-47.
- [26] C. Lin, Y. Liu, H. Yan, *Designer DNA Nanoarchitectures*, Biochemistry, **48**, 8 (2009), 1663-74.
- [27] N. C. Seeman In *Annual Review of Biochemistry, Vol 79*; R. D. Kornberg, C. R. H. Raetz, J. E. Rothman, J. W. Thorner, Eds., 2010; Vol. 79, 65-87.

- [28] F. A. Aldaye, A. L. Palmer, H. F. Sleiman, *Assembling materials with DNA as the guide*, *Science*, **321**, 5897 (2008), 1795-9.
- [29] B. Saccà, C. M. Niemeyer, *DNA Origami: The Art of Folding DNA*, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **51**, 1 (2012), 58-66.
- [30] C. M. Niemeyer, *The developments of semisynthetic DNA-protein conjugates*, *Trends Biotechnol.*, **20**, 9 (2002), 395-401.
- [31] N. C. Seeman, *DNA in a material world*, *Nature*, **421**, 6921 (2003), 427-31.
- [32] E. Jablonski, E. W. Moomaw, R. H. Tullis, J. L. Ruth, *Preparation of oligodeoxynucleotide-alkaline phosphatase conjugates and their use as hybridization probes*, *Nucleic Acids Res.*, **14**, 15 (1986), 6115-28.
- [33] M. S. Urdea, B. D. Warner, J. A. Running, M. Stempien, J. Clyne, T. Horn, *A comparison of non-radioisotopic hybridization assay methods using fluorescent, chemiluminescent and enzyme labeled synthetic oligodeoxyribonucleotide probes*, *Nucleic Acids Res.*, **16**, 11 (1988), 4937-56.
- [34] S. S. Ghosh, P. M. Kao, A. W. McCue, H. L. Chappelle, *Use of Maleimide-Thiol Coupling Chemistry for Efficient Syntheses of Oligonucleotide-Enzyme Conjugate Hybridization Probes*, *Bioconjugate Chem.*, **1**, 1 (1990), 71-6.
- [35] E. Kynclova, A. Hartig, T. Schalkhammer, *Oligonucleotide labelled lipase as a new sensitive hybridization probe and its use in bio-assays and biosensors*, *J. Mol. Recogn.*, **8**, 1-2 (1995), 139-45.
- [36] Y. R. Wang, M. Stanzel, W. Gumbrecht, M. Humenik, M. Sprinzl, *Esterase 2-oligodeoxynucleotide conjugates as sensitive reporter for electrochemical detection of nucleic acid hybridization*, *Biosens. Bioelectron.*, **22**, 8 (2007), 1798-806.
- [37] T. Sano, C. L. Smith, C. R. Cantor, *Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates*, *Science*, **258**, 5079 (1992), 120-2.
- [38] M. Adler, M. Spengler, *Novel Strategies and Tools for Enhanced Sensitivity in Routine Biomolecule Analytics*, *Curr. Pharm. Anal.*, **5**, 4 (2009), 390-407.
- [39] M. Spengler, M. Adler, A. Jonas, C. M. Niemeyer, *Immuno-PCR assays for immunogenicity testing*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **387**, 2 (2009), 278-82.
- [40] M. Adler, R. Wacker, C. M. Niemeyer, *Sensitivity by combination: immuno-PCR and related technologies*, *Analyst*, **133**, 6 (2008), 702-18.
- [41] E. Schallmeiner, E. Oksanen, O. Ericsson, L. Spangberg, S. Eriksson, U. H. Stenman, K. Pettersson, U. Landegren, *Sensitive protein detection via triple-binder proximity ligation assays*, *Nat. Methods*, **4**, 2 (2007), 135-7.
- [42] M. C. Pirrung, *Die Herstellung von DNA-Chips*, *Angew. Chem.*, **114**, 8 (2002), 1326-41.
- [43] P. Jonkheijm, D. Weinrich, H. Schroder, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Chemical strategies for generating protein biochips*, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **47**, 50 (2008), 9618-47.
- [44] C. M. Niemeyer, T. Sano, C. L. Smith, C. R. Cantor, *Oligonucleotide-directed self-assembly of proteins: semisynthetic DNA-streptavidin hybrid molecules as connectors for the generation of macroscopic arrays and the construction of supramolecular bioconjugates*, *Nucleic Acids Res.*, **22**, 25 (1994), 5530-9.
- [45] F. Bano, L. Fruk, B. Sanavio, M. Glettenberg, L. Casalls, C. M. Niemeyer, G. Scoles, *Toward Multiprotein Nanoarrays Using Nanografting and DNA Directed Immobilization of Proteins*, *Nano Lett.*, **9**, 7 (2009), 2614-8.
- [46] H. Schroeder, M. Adler, K. Gerigk, B. Muller-Chorus, F. Gotz, C. M. Niemeyer, *User Configurable Microfluidic Device for Multiplexed Immunoassays Based on DNA-Directed Assembly*, *Anal. Biochem.*, **81**, 3 (2009), 1275-9.
- [47] N. Tort, J. P. Salvador, R. Eritja, M. Poch, E. Martinez, J. Samitier, M. P. Marco, *Fluorescence site-encoded DNA addressable hapten microarray for anabolic androgenic steroids*, *Fluorescence site-encoded DNA addressable hapten microarray for anabolic androgenic steroids*, **28**, 6 (2009), 718-28.
- [48] C. M. Niemeyer, R. Wacker, M. Adler, *Combination of DNA-directed immobilization and immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of self-assembled DNA-protein conjugates*, *Nucleic Acids Res.*, **31**, 16 (2003).
- [49] C. M. Niemeyer, M. Adler, B. Pignataro, S. Lenhert, S. Gao, L. F. Chi, H. Fuchs, D. Blohm, *Self-Assembly of DNA-Streptavidin nanostructures and their use as reagents in immuno-PCR*, *Nucleic Acids Res.*, **27**, 23 (1999), 4553-61.

- [50] C. M. Niemeyer, M. Adler, S. Gao, L. Chi, *Supramolekulare Nanoringe aus Streptavidin und DNA*, *Angew. Chem.*, **112**, 17 (2000), 3183-7.
- [51] C. M. Niemeyer, M. Adler, S. Lenhert, S. Gao, H. Fuchs, L. F. Chi, *Nucleic acid supercoiling as a means for ionic switching of DNA-nanoparticle networks*, *ChemBioChem*, **2**, 4 (2001), 260-4.
- [52] C. M. Niemeyer, M. Adler, R. Wacker, *Detecting antigens by quantitative immuno-PCR*, *Nat. Protoc.*, **2**, 8 (2007), 1918-30.
- [53] C. M. Niemeyer, W. Burger, J. Peplies, *Covalent DNA - Streptavidin conjugates as building blocks for novel biometallic nanostructures*, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **37**, 16 (1998), 2265-8.
- [54] D. Weinrich, P. Jonkheijm, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Applications of Protein Biochips in Biomedical and Biotechnological Research*, *Angew. Chem.-Int. Edit.*, **48**, 42 (2009), 7744-51.
- [55] M. Lovrinovic, R. Seidel, R. Wacker, H. Schroeder, O. Seitz, M. Engelhard, R. S. Goody, C. M. Niemeyer, *Synthesis of protein-nucleic acid conjugates by expressed protein ligation*, *Chem. Commun.*, 7 (2003), 822-3.
- [56] K. S. Rabe, C. M. Niemeyer, *Selective Covalent Conjugation of Phosphorothioate DNA Oligonucleotides with Streptavidin*, *Molecules*, **16**, 8 (2011), 6916-26.
- [57] S. A. Kazane, J. Y. Axup, C. H. Kim, M. Ciobanu, E. D. Wold, S. Barluenga, B. A. Hutchins, P. G. Schultz, N. Winssinger, V. V. Smider, *Self-Assembled Antibody Multimers through Peptide Nucleic Acid Conjugation*, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 1 (2013), 340-6.
- [58] C. Zhang, C. Tian, F. Guo, Z. Liu, W. Jiang, C. Mao, *DNA-Directed Three-Dimensional Protein Organization*, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **51**, 14 (2012), 3382-5.
- [59] H. Yan, S. H. Park, G. Finkelstein, J. H. Reif, T. H. LaBean, *DNA-templated self-assembly of protein arrays and highly conductive nanowires*, *Science*, **301**, 5641 (2003), 1882-4.
- [60] Y. Liu, Y. G. Ke, H. Yan, *Self-assembly of symmetric finite-size DNA nanoarrays*, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 49 (2005), 17140-1.
- [61] Y. Liu, C. X. Lin, H. Y. Li, H. Yan, *Protein nanoarrays - Aptamer-directed self-assembly of protein arrays on a DNA nanostructure*, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **44**, 28 (2005), 4333-8.
- [62] K. Lund, Y. Liu, S. Lindsay, H. Yan, *Self-assembling a molecular pegboard*, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 50 (2005), 17606-7.
- [63] B. A. R. Williams, K. Lund, Y. Liu, H. Yan, J. C. Chaput, *Self-assembled peptide nanoarrays: An approach to studying protein-protein interactions*, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **46**, 17 (2007), 3051-4.
- [64] P. W. K. Rothemund, *Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns*, *Nature*, **440**, 7082 (2006), 297-302.
- [65] A. Kuzuya, M. Kimura, K. Numajiri, N. Koshi, T. Ohnishi, F. Okada, M. Komiyama, *Precisely Programmed and Robust 2D Streptavidin Nanoarrays by Using Periodical Nanometer-Scale Wells Embedded in DNA Origami Assembly*, *ChemBioChem*, **10**, 11 (2009), 1811-5.
- [66] W. Shen, H. Zhong, D. Neff, M. L. Norton, *NTA Directed Protein Nanopatterning on DNA Origami Nanoconstructs*, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 19 (2009), 6660-+.
- [67] B. Sacca, R. Meyer, M. Erkelenz, K. Kiko, A. Arndt, H. Schroeder, K. S. Rabe, C. M. Niemeyer, *Orthogonal Protein Decoration of DNA Origami*, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **49**, 49 (2010), 9378-83.
- [68] C. M. Erben, R. P. Goodman, A. J. Turberfield, *Single-molecule protein encapsulation in a rigid DNA cage*, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **45**, 44 (2006), 7414-7.
- [69] L. Fruk, C. M. Niemeyer, *Covalent hemin-DNA adducts for generating a novel class of artificial heme enzymes*, *Angew. Chem.-Int. Edit.*, **44**, 17 (2005), 2603-6.
- [70] L. Fruk, J. Mueller, C. M. Niemeyer, *Kinetic analysis of semisynthetic peroxidase enzymes containing a covalent DNA-heme adduct as the cofactor*, *Chem. Eur. J.*, **12**, 28 (2006), 7448-57.
- [71] M. Glettenberg, C. M. Niemeyer, *Tuning of Peroxidase Activity by Covalently Tethered DNA Oligonucleotides*, *Bioconjugate Chem.*, **20**, 5 (2009), 969-75.
- [72] C.-H. Kuo, L. Fruk, C. M. Niemeyer, *Addressable DNA-Myoglobin Photocatalysis*, *Chem. Asian J.*, **4**, 7 (2009), 1064-9.

- [73] M. Erkelenz, C.-H. Kuo, C. M. Niemeyer, *DNA-Mediated Assembly of Cytochrome P450 BM3 Subdomains*, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 40 (2011), 16111-8.
- [74] C. M. Niemeyer, J. Koehler, C. Wuerdemann, *DNA-directed assembly of bienzymic complexes from in vivo biotinylated NAD(P)H : FMN oxidoreductase and luciferase*, *ChemBioChem*, **3**, 2-3 (2002), 242-5.
- [75] J. Mueller, C. M. Niemeyer, *DNA-directed assembly of artificial multienzyme complexes*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **377**, 1 (2008), 62-7.
- [76] J. Fu, M. Liu, Y. Liu, N. W. Woodbury, H. Yan, *Interenzyme Substrate Diffusion for an Enzyme Cascade Organized on Spatially Addressable DNA Nanostructures*, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 12 (2012), 5516-9.
- [77] P. Hazarika, B. Ceyhan, C. M. Niemeyer, *Sensitive detection of proteins using difunctional DNA-gold nanoparticles*, *Small*, **1**, 8-9 (2005), 844-8.
- [78] P. Hazarika, F. Kukolka, C. M. Niemeyer, *Reversible binding of fluorescent proteins at DNA-gold nanoparticles*, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **45**, 41 (2006), 6827-30.
- [79] V. Lapiene, F. Kukolka, K. Kiko, A. Arndt, C. M. Niemeyer, *Conjugation of Fluorescent Proteins with DNA Oligonucleotides*, *Bioconjugate Chem.*, **21**, 5 (2010), 921-7.
- [80] M. Hadorn, E. Boenzli, K. T. Sorensen, H. Fellermann, P. E. Hotz, M. M. Hanczyc, *Specific and reversible DNA-directed self-assembly of oil-in-water emulsion droplets*, *PNAS*, **109**, 50 (2012), 20320-5.
- [81] M. Hadorn, P. E. Hotz, *DNA-Mediated Self-Assembly of Artificial Vesicles*, *Plos One*, **5**, 3 (2010).
- [82] R. Pei, S. K. Taylor, D. Stefanovic, S. Rudchenko, T. E. Mitchell, M. N. Stojanovic, *Behavior of Polycatalytic Assemblies in a Substrate-Displaying Matrix*, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 39 (2006), 12693-9.
- [83] O. H. Laitinen, V. P. Hytonen, H. R. Nordlund, M. S. Kulomaa, *Genetically engineered avidins and streptavidins*, *Cell. Mol. Life Sci.*, **63**, 24 (2006), 2992-3017.
- [84] M. Wilchek, E. A. Bayer, *Applications of avidin-biotin technology: literature survey*, *Methods Enzymol.*, **184** (1990), 14-45.
- [85] E. A. Bayer, M. Wilchek, *Protein biotinylation*, *Methods Enzymol.*, **184** (1990), 138-60.
- [86] M. Wilchek, E. A. Bayer, *Biotin-containing reagents* *Methods Enzymol.*, **184** (1990), 123-38.
- [87] G. D. Meredith, H. Y. Wu, N. L. Allbritton, *Targeted protein functionalization using His-tags*, *Bioconjugate Chem.*, **15**, 5 (2004), 969-82.
- [88] R. P. Goodman, C. M. Erben, J. Malo, W. M. Ho, M. L. McKee, A. N. Kapanidis, A. J. Turberfield, *A Facile Method for Reversibly Linking a Recombinant Protein to DNA*, *ChemBioChem*, **10**, 9 (2009), 1551-7.
- [89] G. Mayer, *The Chemical Biology of Aptamers*, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **48**, 15 (2009), 2672-89.
- [90] L. Fruk, C.-H. Kuo, E. Torres, C. M. Niemeyer, *Apoenzyme Reconstitution as a Chemical Tool for Structural Enzymology and Biotechnology*, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **48**, 9 (2009), 1550-74.
- [91] P. M. Schaeffer, N. E. Dixon, *Synthesis and Applications of Covalent Protein-DNA Conjugates*, *Aust. J. Chem.*, **62**, 10 (2009), 1328-32.
- [92] M. Renz, C. Kurz, *A colorimetric method for DNA hybridization*, *Nucleic Acids Res.*, **12**, 8 (1984), 3435-44.
- [93] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques, 2nd Edition*; Academic press, 2008.
- [94] F. Kukolka, M. Lovrinovic, R. Wacker, C. M. Niemeyer In *Methods in Molecular Biology*; C. M. Niemeyer, Ed., 2004; Vol. 283, 181-96.
- [95] F. Kukolka, C. M. Niemeyer, *Synthesis of fluorescent oligonucleotide-EYFP conjugate: Towards supramolecular construction of semisynthetic biomolecular antennae*, *Org. Biomol. Chem.*, **2**, 15 (2004), 2203-6.
- [96] D. R. Corey, P. G. Schultz, *Generation of a hybrid sequence-specific single-stranded deoxyribonuclease*, *Science*, **238**, 4832 (1987), 1401-3.
- [97] R. S. Goody, K. Alexandrov, M. Engelhard, *Combining chemical and biological techniques to produce modified proteins*, *ChemBioChem*, **3**, 5 (2002), 399-403.
- [98] R. M. Hofmann, T. W. Muir, *Recent advances in the application of expressed protein ligation to protein engineering*, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13**, 4 (2002), 297-303.
- [99] C. F. W. Becker, R. Wacker, W. Bouschen, R. Seidel, B. Kolaric, P. Lang, H. Schroeder, O. Muller, C. M. Niemeyer, B. Spengler, R. S. Goody, M. Engelhard, *Direct*

- readout of protein-protein interactions by mass spectrometry from protein-DNA microarrays, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **44**, 46 (2005), 7635-9.
- [100] M. Lovrinovic, L. Fruk, H. Schroeder, C. M. Niemeyer, *Site-specific labeling of DNA-protein conjugates by means of expressed protein ligation*, *Chem. Commun.*, 4 (2007), 353-5.
- [101] M. Kohn, R. Breinbauer, *The Staudinger ligation - A gift to chemical biology*, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **43**, 24 (2004), 3106-16.
- [102] J.-F. Lutz, *1,3-dipolar cycloadditions of azides and alkynes: A universal ligation tool in polymer and materials science*, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **46**, 7 (2007), 1018-25.
- [103] R. A. Chandra, E. S. Douglas, R. A. Mathies, C. R. Bertozzi, M. B. Francis, *Programmable cell adhesion encoded by DNA hybridization*, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **45**, 6 (2006), 896-901.
- [104] E. S. Douglas, R. A. Chandra, C. R. Bertozzi, R. A. Mathies, M. B. Francis, *Self-assembled cellular microarrays patterned using DNA barcodes*, *Lab Chip*, **7**, 11 (2007), 1442-8.
- [105] S. C. Hsiao, A. K. Crow, W. A. Lam, C. R. Bertozzi, D. A. Fletcher, M. B. Francis, *DNA-Coated AFM Cantilevers for the Investigation of Cell Adhesion and the Patterning of Live Cells*, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **47**, 44 (2008), 8473-7.
- [106] B. P. Duckworth, Y. Chen, J. W. Wollack, Y. Sham, J. D. Mueller, T. A. Taton, M. D. Distefano, *A universal method for the preparation of covalent protein-DNA conjugates for use in creating protein nanostructures*, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **46**, 46 (2007), 8819-22.
- [107] P. M. E. Gramlich, C. T. Wirges, A. Manetto, T. Carell, *Postsynthetic DNA Modification through the Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition Reaction*, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **47**, 44 (2008), 8350-8.
- [108] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality*, *Angew. Chem.-Int. Edit.*, **48**, 38 (2009), 6974-98.
- [109] P. R. Chen, D. Groff, J. Guo, W. Ou, S. Cellitti, B. H. Geierstanger, P. G. Schultz, *A Facile System for Encoding Unnatural Amino Acids in Mammalian Cells*, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **48**, 22 (2009), 4052-5.
- [110] L. Wang, P. G. Schultz, *Expanding the genetic code*, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **44**, 1 (2005), 34-66.
- [111] Z. W. Zhang, L. Wang, A. Brock, P. G. Schultz, *The selective incorporation of alkenes into proteins in Escherichia coli*, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **41**, 15 (2002), 2840-+.
- [112] B. M. Hutchins, S. A. Kazane, K. Staflin, J. S. Forsyth, B. Felding-Habermann, P. G. Schultz, V. V. Smider, *Site-Specific Coupling and Sterically Controlled Formation of Multimeric Antibody Fab Fragments with Unnatural Amino Acids*, *J. Mol. Biol.*, **406**, 4 (2011), 595-603.
- [113] N. Johnsson, K. Johnsson, *Chemical tools for biomolecular imaging*, *ACS Chem. Biol.*, **2**, 1 (2007), 31-8.
- [114] A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel, K. Johnsson, *A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo*, *Nat. Biotechnol.*, **21**, 1 (2003), 86-9.
- [115] G. V. Los, K. Wood, *The HaloTag (TM) - A novel technology for cell imaging and protein analysis*, *High Content Screening*, **356** (2007), 195-208.
- [116] W. M. Albers, J. M. Pelto, C. Suspene, J. A. Maatta, A. Yassar, V. P. Hytonen, I. M. Vikholm-Lundin, K. Tappura, *Structural and Functional Characteristics of Chimeric Avidins Physically Adsorbed onto Functionalized Polythiophene Thin Films*, *ACS Appl. Mater.*, **4**, 8 (2012), 4067-77.
- [117] T. Matsumoto, T. Tanaka, A. Kondo, *Sortase A-Catalyzed Site-Specific Coimmobilization on Microparticles via Streptavidin*, *Langmuir*, **28**, 7 (2012), 3553-7.
- [118] P. Ringler, G. E. Schulz, *Self-assembly of proteins into designed networks*, *Science*, **302**, 5642 (2003), 106-9.
- [119] Y. Pazy, T. Kulik, E. A. Bayer, M. Wilchek, O. Livnah, *Ligand exchange between proteins - Exchange of biotin and biotin derivatives between avidin and streptavidin*, *J. Biol. Chem.*, **277**, 34 (2002), 30892-900.
- [120] M. Gonzalez, C. E. Argarana, G. D. Fidelio, *Extremely high thermal stability of streptavidin and avidin upon biotin binding*, *Biochem. Eng. J.*, **16**, 1-4 (1999), 67-72.
- [121] S. E. Ross, S. D. Carson, L. M. Fink, *Effects of Detergents on Avidin-Biotin Interaction*, *Biotechniques*, **4**, 4 (1986), 350-4.

- [122] J. N. Rybak, S. B. Scheurer, D. Neri, G. Elia, *Purification of biotinylated proteins on streptavidin resin: A protocol for quantitative elution*, *Proteomics*, **4**, 8 (2004), 2296-9.
- [123] N. M. Green, *Avidin and Streptavidin*, *Methods Enzymol.*, **184** (1990), 51-67.
- [124] D. Ellison, J. Hinton, S. J. Hubbard, R. J. Beynon, *Limited proteolysis of native proteins: the interaction between avidin and proteinase K*, *Protein Sci.*, **4**, 7 (1995), 1337-45.
- [125] P. C. Weber, D. H. Ohlendorf, J. J. Wendoloski, F. R. Salemme, *Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin*, *Science*, **243**, 4887 (1989), 85-8.
- [126] I. Le Trong, Z. Wang, D. E. Hyre, T. P. Lybrand, P. S. Stayton, R. E. Stenkamp, *Streptavidin and its biotin complex at atomic resolution*, *Acta Crystallogr. Sect. D*, **67** (2011), 813-21.
- [127] S. Freitag, I. LeTrong, L. Klumb, P. S. Stayton, R. E. Stenkamp, *Structural studies of the streptavidin binding loop*, *Protein Sci.*, **6**, 6 (1997), 1157-66.
- [128] O. Livnah, E. A. Bayer, M. Wilchek, J. L. Sussman, *three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex*, *PNAS*, **90**, 11 (1993), 5076-80.
- [129] M. Gonzalez, L. A. Bagatolli, I. Echabe, J. L. R. Arrondo, C. E. Argarana, C. R. Cantor, G. D. Fidelio, *Interaction of biotin with streptavidin - Thermostability and conformational changes upon binding*, *J. Biol. Chem.*, **272**, 17 (1997), 11288-94.
- [130] D. H. Williams, E. Stephens, M. Zhou, *Ligand binding energy and catalytic efficiency from improved packing within receptors and enzymes*, *J. Mol. Biol.*, **329**, 2 (2003), 389-99.
- [131] O. H. Laitinen, H. R. Nordlund, V. P. Hytoenen, M. S. Kulomaa, *Brave new (strept)avidins in biotechnology*, *Trends Biotechnol.*, **25**, 6 (2007), 269-77.
- [132] K. H. Lim, H. Huang, A. Pralle, S. Park, *Engineered Streptavidin Monomer and Dimer with Improved Stability and Function*, *Biochemistry*, **50**, 40 (2011), 8682-91.
- [133] K. H. Lim, H. Huang, A. Pralle, S. Park, *Stable, high-affinity streptavidin monomer for protein labeling and monovalent biotin detection*, *Biotechnol. Bioeng.*, **110**, 1 (2013), 57-67.
- [134] A. Sardo, T. Wohlschlager, C. Lo, H. Zoller, T. R. Ward, M. Creus, *Burkavidin: A novel secreted biotin-binding protein from the human pathogen Burkholderia pseudomallei*, *Protein Express. Purif.*, **77**, 2 (2011), 131-9.
- [135] M. Howarth, D. J. F. Chinnapen, K. Gerrow, P. C. Dorrestein, M. R. Grandy, N. L. Kelleher, A. El-Husseini, A. Y. Ting, *A monovalent streptavidin with a single femtomolar biotin binding site*, *Nat. Methods*, **3**, 4 (2006), 267-73.
- [136] M. Howarth, A. Y. Ting, *Imaging proteins in live mammalian cells with biotin ligase and monovalent streptavidin*, *Nat. Protoc.*, **3**, 3 (2008), 534-45.
- [137] M. Howarth, W. H. Liu, S. Puthenveetil, Y. Zheng, L. F. Marshall, M. M. Schmidt, K. D. Wittrup, M. G. Bawendi, A. Y. Ting, *Monovalent, reduced-size quantum dots for imaging receptors on living cells*, *Nat. Methods*, **5**, 5 (2008), 397-9.
- [138] K. Schröder, *Untersuchung von enzymatischen Spaltungsreaktionen auf Mikroarray-Oberflächen*; Dissertation, TU-Dortmund, 2012.
- [139] C. E. Chivers, E. Crozat, C. Chu, V. T. Moy, D. J. Sherratt, M. Howarth, *A streptavidin variant with slower biotin dissociation and increased mechanostability*, *Nat. Methods*, **7**, 5 (2010), 391-U76.
- [140] C. E. Chivers, A. L. Koner, E. D. Lowe, M. Howarth, *How the biotin-streptavidin interaction was made even stronger: investigation via crystallography and a chimaeric tetramer*, *Biochem. J.*, **435** (2011), 55-63.
- [141] T. Klein, E. Moldenhauer, *Feldflussfraktionierung - Trennung und Charakterisierung von Proteinen, Polymeren und Partikeln*, *Instrumentelle Analytik*, **6** (2008), 2.
- [142] J. C. Giddings, *A New Separation Concept Based on a Coupling of Concentration and Flow Nonuniformities*, *J. Sep. Sci.*, **1**, 1 (1966), 123-5.
- [143] K.-G. Wahlund, *Flow field-flow fractionation: Critical overview*, *J. Chromatogr. A*, **1287** (2013), 97-112.
- [144] A. Einstein, *Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen*, *Ann. Phys.*, **322**, 8 (1905), 549-60.
- [145] S. K. R. Williams, J. R. Runyon, A. A. Ashames, *Field-Flow Fractionation: Addressing the Nano Challenge*, *Anal. Biochem.*, **83**, 3 (2011), 634-42.

- [146] K. Rebolj, D. Pahovnik, E. Zagar, *Characterization of a Protein Conjugate Using an Asymmetrical-Flow Field-Flow Fractionation and a Size-Exclusion Chromatography with Multi-Detection System*, *Anal. Biochem.*, **84**, 17 (2012), 7374-83.
- [147] J. Liu, J. D. Andya, S. J. Shire, *A critical review of analytical ultracentrifugation and field flow fractionation methods for measuring protein aggregation*, *AAPS J.*, **8**, 3 (2006), E580-E9.
- [148] B. Roda, A. Zattoni, P. Reschiglian, M. H. Moon, M. Mirasoli, E. Micheline, A. Roda, *Field-flow fractionation in bioanalysis: A review of recent trends*, *Anal. Chim. Acta.*, **635**, 2 (2009), 132-43.
- [149] S. Schachermeyer, J. Ashby, W. Zhong, *Advances in field-flow fractionation for the analysis of biomolecules: instrument design and hyphenation*, *Anal. Bioanal. Chem.*, **404**, 4 (2012), 1151-8.
- [150] P. Reschiglian, A. Zattoni, B. Roda, E. Micheline, A. Roda, *Field-flow fractionation and biotechnology*, *Trends Biotechnol.*, **23**, 9 (2005), 475-83.
- [151] G. Yohannes, M. Jussila, K. Hartonen, M. L. Riekkola, *Asymmetrical flow field-flow fractionation technique for separation and characterization of biopolymers and bioparticles*, *J. Chromatogr. A*, **1218**, 27 (2011), 4104-16.
- [152] J. Luo, M. Leeman, A. Ballagi, A. Elfving, Z. Su, J.-C. Janson, K.-G. Wahlund, *Size characterization of green fluorescent protein inclusion bodies in E. coli using asymmetrical flow field-flow fractionation–multi-angle light scattering*, *J. Chromatogr. A*, **1120**, 1–2 (2006), 158-64.
- [153] J. Gigault, T. J. Cho, R. I. MacCusprie, V. A. Hackley, *Gold nanorod separation and characterization by asymmetric-flow field flow fractionation with UV-Vis detection*, *Anal. Bioanal. Chem.*, **405**, 4 (2013), 1191-202.
- [154] L. Calzolari, D. Gilliland, C. P. Garcia, F. Rossi, *Separation and characterization of gold nanoparticle mixtures by flow-field-flow fractionation*, *J. Chromatogr. A*, **1218**, 27 (2011), 4234-9.
- [155] Y. Li, Y. D. Tseng, S. Y. Kwon, L. D'Espaux, J. S. Bunch, P. L. McEuen, D. Luo, *Controlled assembly of dendrimer-like DNA*, *Nature Mater.*, **3**, 1 (2004), 38-42.
- [156] E. Bruendermann, M. Havenith In *Annual Reports on the Progress of Chemistry 2008, Vol 104, Section C: Physical Chemistry*; G. A. Webb, Ed., 2008; Vol. 104, 235-55.
- [157] H. G. von Ribbeck, M. Brehm, D. W. van der Weide, S. Winnerl, O. Drachenko, M. Helm, F. Keilmann, *Spectroscopic THz near-field microscope*, *Opt. Express*, **16**, 5 (2008), 3430-8.
- [158] C. Liberale, P. Minzioni, F. Bragheri, F. De Angelis, E. Di Fabrizio, I. Cristiani, *Miniaturized all-fibre probe for three-dimensional optical trapping and manipulation*, *Nature Photon.*, **1**, 12 (2007), 723-7.
- [159] D. Graham, K. Faulds, *Quantitative SERRS for DNA sequence analysis*, *Chem. Soc. Rev.*, **37**, 5 (2008), 1042-51.
- [160] D. Graham, R. Goodacre, *Chemical and bioanalytical applications of surface enhanced Raman scattering spectroscopy*, *Chem. Soc. Rev.*, **37**, 5 (2008), 883-4.
- [161] D. Graham, D. G. Thompson, W. E. Smith, K. Faulds, *Control of enhanced Raman scattering using a DNA-based assembly process of dye-coded nanoparticles*, *Nat. Nanotechnol.*, **3**, 9 (2008), 548-51.
- [162] M. Lillich, X. Chen, T. Weil, H. Barth, J. Fahrner, *Streptavidin-Conjugated C3 Protein Mediates the Delivery of Mono-Biotinylated RNase A into Macrophages*, *Bioconjugate Chem.*, **23**, 7 (2012), 1426-36.
- [163] F. Kukolka, M. Lovrinovic, C. M. Niemeyer, R. Wacker In *Chemical Biology - A Practical Course*; H. Waldmann, P. Janning, Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 2004, 45-59.
- [164] T. G. M. Schmidt, A. Skerra, *One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the "Strep tag" and immobilized recombinant core streptavidin*, *J. Chromatogr. A*, **676**, 2 (1994), 337-45.
- [165] U. Feldkamp, R. Wacker, W. Banzhaf, C. M. Niemeyer, *Microarray-based in vitro evaluation of DNA oligomer libraries designed in silico*, *ChemPhysChem*, **5** (2004), 367-72.
- [166] R. S. Tuma, M. P. Beaudet, X. K. Jin, L. J. Jones, C. Y. Cheung, S. Yue, V. L. Singer, *Characterization of SYBR gold nucleic acid gel stain: A dye optimized for use with 300-nm ultraviolet transilluminators*, *Anal. Biochem.*, **268**, 2 (1999), 278-88.

- [167] R. B. Kapust, J. Tozser, J. D. Fox, D. E. Anderson, S. Cherry, T. D. Copeland, D. S. Waugh, *Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency*, Protein Eng., **14**, 12 (2001), 993-1000.
- [168] A. A. Mamedova, P. J. Holt, J. Carroll, L. A. Sazanov, *Substrate-induced conformational change in bacterial complex I*, J. Biol. Chem., **279**, 22 (2004), 23830-6.
- [169] F. Martin, D. Papahadjopoulos, *Irreversible coupling of immunoglobulin fragments to preformed vesicles. An improved method for liposome targeting*, Biophys. J., **37**, 2 (1982), A28-A.
- [170] J. K. Weltman, *N-Succinimidyl (4-iodoacetyl) aminobenzoate: a new heterobifunctional crosslinker*, 1983.
- [171] A. J. Cumber, J. A. Forrester, B. M. J. Foxwell, W. C. J. Ross, P. E. Thorpe, *Preparation of antibody-toxin conjugates*, Methods Enzymol., **112** (1985), 207-25.
- [172] A. R. Neurath, N. Strick, *Enzyme-linked fluorescence immunoassays using β -galactosidase and antibodies covalently bound to polystyrene plates*, J. Virol. Methods, **3**, 3 (1981), 155-65.
- [173] J. Carlsson, H. Drevin, R. Axen, *Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate, a new heterobifunctional reagent*, Biochem. J., **173**, 3 (1978), 723-37.
- [174] T. P. King, Y. Li, L. Kochoumian, *Preparation of protein conjugates via intermolecular disulfide bond formation*, Biochemistry, **17**, 8 (1978), 1499-506.
- [175] J. Kim, H. Y. Nam, T.-i. Kim, P.-H. Kim, J. Ryu, C.-O. Yun, S. W. Kim, *Active targeting of RGD-conjugated bioreducible polymer for delivery of oncolytic adenovirus expressing shRNA against IL-8 mRNA*, Biomaterials, **32**, 22 (2011), 5158-66.
- [176] R. Toita, M. Murata, S. Tabata, K. Abe, S. Narahara, J. S. Piao, J.-H. Kang, M. Hashizume, *Development of Human Hepatocellular Carcinoma Cell-Targeted Protein Cages*, Bioconjugate Chem., **23**, 7 (2012), 1494-501.
- [177] F. Lottspeich, *Bioanalytik*; Springer - Spektrum, 2012.
- [178] G. Healthcare, *Gel filtration - Principles and Methods*, 2010.
- [179] Tosoh Catalog - SEC-SW Series Columns, 2013
- [180] T. Otte, T. Klein, E. Moldenhauer; analytik-news.de, 2010.
- [181] C. F. Brewer, J. P. Riehm, *Evidence for possible nonspecific reactions between N-ethylmaleimide and proteins*, Anal. Biochem., **18**, 2 (1967), 248-&.
- [182] Pierce Instructions: SMCC and Sulfo - SMCC; Thermo Fisher Scientific Inc.: Rochford, 2011
- [183] A. J. Lomant, G. Fairbanks, *Chemical probes of extended biological structures: Synthesis and properties of the cleavable protein cross-linking reagent dithiobis(succinimidyl propionate)*, J. Mol. Biol., **104**, 1 (1976), 243-61.
- [184] J. R. Heitz, C. D. Anderson, B. M. Anderson, *Inactivation of yeast alcohol dehydrogenase by N-alkylmaleimides*, Arch. Biochem. Biophys., **127**, 1-3 (1968), 627.
- [185] Sharples, Ne, M. Flavin, *The Reactions of Amines and Amino Acids with Maleimides. Structure of the Reaction Products Deduced from Infrared and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, Biochemistry, **5**, 9 (1966), 2963-&.
- [186] J. D. Gregory, *The Stability of N-Ethylmaleimide and its Reaction with Sulfhydryl Groups*, J. Am. Chem. Soc., **77**, 14 (1955), 3922-3.
- [187] E. Ishikawa, M. Imagawa, S. Hashida, S. Yoshitake, Y. Hamaguchi, T. Ueno, *Enzyme-labeling of antibodies and their fragments for enzyme immunoassay and immunohistochemical studies*, J. Immunoassay Immunochem., **4**, 3 (1983), 209-327.
- [188] F. R. N. Gurd In *Methods in Enzymology*; C. H. W. Hirs, Ed.; Academic Press, 1967; Vol. Volume 11, 532-41.
- [189] R. D. Cole, W. H. Stein, S. Moore, *On the Cysteine Content of Human Hemoglobin*, J. Biol. Chem., **233**, 6 (1958), 1359-63.
- [190] A. M. Crestfield, W. H. Stein, S. Moore, *On the Preparation of Bovine Pancreatic Ribonuclease A*, J. Biol. Chem., **238**, 2 (1963), 618-&.
- [191] P. J. Vithayathil, F. M. Richards, *Modification of the Methionine Residue in the Peptide Component of Ribonuclease-S*, J. Biol. Chem., **235**, 8 (1960), 2343-51.
- [192] Pierce Instructions: PEG-SPDP Crosslinker; Thermo Fisher Scientific Inc.: Rochford, 2011

- [193] L. Zhang, C. P. Chou, M. Moo-Young, *Disulfide bond formation and its impact on the biological activity and stability of recombinant therapeutic proteins produced by Escherichia coli expression system*, *Biotechnol. Adv.*, **29**, 6 (2011), 923-9.
- [194] L. D. Cabrita, D. Gilis, A. L. Robertson, Y. Dehouck, M. Rooman, S. P. Bottomley, *Enhancing the stability and solubility of TEV protease using in silico design*, *Protein Sci.*, **16**, 11 (2007), 2360-7.
- [195] U. Feldkamp, C. M. Niemeyer, *Rational design of DNA nanoarchitectures*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 12 (2006), 1856-76.
- [196] G. M. Whitesides, J. P. Mathias, C. T. Seto, *Molecular self-assembly and nanochemistry: a chemical strategy for the synthesis of nanostructures*, *Science*, **254**, 5036 (1991), 1312-9.
- [197] S. Neidle, *DNA minor-groove recognition by small molecules*, *Nat. Prod. Rep.*, **18**, 3 (2001), 291-309.
- [198] P. L. Hamilton, D. P. Arya, *Natural product DNA major groove binders*, *Nat. Prod. Rep.*, **29**, 2 (2012), 134-43.
- [199] E. Pazos, J. Mosquera, M. E. Vazquez, J. L. Mascarenas, *DNA Recognition by Synthetic Constructs*, *ChemBioChem*, **12**, 13 (2011), 1958-73.
- [200] J. E. Hearst, *Photochemistry of the psoralens*, *Chem. Res. Toxicol.*, **2**, 2 (1989), 69-75.
- [201] J. Jose Serrano-Perez, M. Merchan, L. Serrano-Andres, *Photoreactivity of Furocoumarins and DNA in PUVA Therapy: Formation of Psoralen-Thymine Adducts*, *J. Phys. Chem. B*, **112**, 44 (2008), 14002-10.
- [202] D. Kanne, H. Rapoport, J. E. Hearst, *8-Methoxypsoralen-nucleic acid photoreaction. Effect of methyl substitution on pyrone vs. furan photoaddition.*, *J. Med. Chem.*, **27**, 4 (1984), 531-4.
- [203] I. Kutyavin, S. Lokhov, E. Lukhtanov, M. W. Reed, *Chemistry of minor groove binder-oligonucleotide conjugates*, *Curr Protoc Nucleic Acid Chem.*, **Chapter 8** (2003), Unit 8.4-Unit 8.4.
- [204] C. Zimmer, U. Wahnert, *Nonintercalating DNA-binding ligands: Specificity of the interaction and their use as tools in biophysical, biochemical and biological investigations of the genetic material*, *Prog. Biophys. molec. Biol.*, **47**, 1 (1986), 31-112.
- [205] C. L. Kielkopf, S. White, J. W. Szewczyk, J. M. Turner, E. E. Baird, P. B. Dervan, D. C. Rees, *A structural basis for recognition of A center dot T and T center dot A base pairs in the minor groove of B-DNA*, *Science*, **282**, 5386 (1998), 111-5.
- [206] C. M. Niemeyer, M. Adler, S. Gao, L. F. Chi, *Nanostructured DNA-protein aggregates consisting of covalent oligonucleotide-streptavidin conjugates*, *Bioconjugate Chem.*, **12**, 3 (2001), 364-71.
- [207] J. Irrgang, *Charakterisierung Partikulärer Systeme auf Funktionalisierten Oberflächen*; Dissertation, TU-Dortmund, 2008.
- [208] A. Bellina, *Abschlussbericht EU-Projekt (Reference: 229375): Single or few molecules detection by combined enhanced spectroscopies*; Consortium for the Centre of Molecular Biomedicine, University of Magna Graecia, Ruhr University Bochum, Technical University of Dortmund, University of Strathclyde, Glasgow, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Nanotech Electronica S.L., Fondazione Istituto Italiano di Tecnologia, : Brüssel, 2012.
- [209] F. De Angelis, G. Das, P. Candeloro, M. Patrini, M. Galli, A. Bek, M. Lazzarino, I. Maksymov, C. Liberale, L. C. Andreani, E. Di Fabrizio, *Nanoscale chemical mapping using three-dimensional adiabatic compression of surface plasmon polaritons*, *Nat. Nanotechnol.*, **5**, 1 (2010), 67-72.
- [210] G. U. Nienhaus, J. Wiedenmann, *Structure, dynamics and optical properties of fluorescent proteins: perspectives for marker development*, *ChemPhysChem*, **10**, 9-10 (2009), 1369-79.
- [211] F. Kukulka, B. K. Muller, S. Paternoster, A. Arndt, C. M. Niemeyer, C. Brauchle, D. C. Lamb, *A single-molecule Forster resonance energy transfer analysis of fluorescent DNA-protein conjugates for nanobiotechnology*, *Small*, **2**, 8-9 (2006), 1083-9.
- [212] J. L. Tubbs, J. A. Tainer, E. D. Getzoff, *Crystallographic structures of Discosoma red fluorescent protein with immature and mature chromophores: Linking peptide bond trans-cis isomerization and acylimine formation in chromophore maturation*, *Biochemistry*, **44**, 29 (2005), 9833-40.

- [213] A. Royant, M. Noirclerc-Savoie, *Stabilizing role of glutamic acid 222 in the structure of Enhanced Green Fluorescent Protein*, J. Struct. Biol., **174**, 2 (2011), 385-90.
- [214] F. Kukolka, *Herstellung und Charakterisierung von DNA-basierten Energie-Transfer Systemen aus fluoreszenten Protein-DNA Konjugaten*; Dissertation, TU-Dortmund, 2006.
- [215] M. Moskovits, J. S. Suh, *Surface selection rules for surface-enhanced Raman spectroscopy: calculations and application to the surface-enhanced Raman spectrum of phthalazine on silver*, J. Phys. Chem. A, **88**, 23 (1984), 5526-30.
- [216] Y. C. Cao, R. Jin, C. A. Mirkin, *Nanoparticles with Raman Spectroscopic Fingerprints for DNA and RNA Detection*, Science, **297**, 5586 (2002), 1536-40.
- [217] G. Braun, S. J. Lee, M. Dante, T.-Q. Nguyen, M. Moskovits, N. Reich, *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for DNA Detection by Nanoparticle Assembly onto Smooth Metal Films*, J. Am. Chem. Soc., **129**, 20 (2007), 6378-9.
- [218] J. Turkevich, P. C. Stevenson, J. Hillier, *A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold*, Discuss. Faraday Soc., 11 (1951), 55-&.
- [219] G. Frens, *Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions*, Nature Phys. Scien., **241**, 105 (1973), 20-2.
- [220] P. Hazarika, *Biofunctionalized Gold Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Applications*; Dissertation, TU-Dortmund, 2006.
- [221] R. G. Nuzzo, D. L. Allara, *Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces*, J. Am. Chem. Soc., **105**, 13 (1983), 4481-3.
- [222] R. G. Nuzzo, B. R. Zegarski, L. H. Dubois, *Fundamental studies of the chemisorption of organosulfur compounds on gold(111). Implications for molecular self-assembly on gold surfaces*, J. Am. Chem. Soc., **109**, 3 (1987), 733-40.
- [223] C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhoff, *A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials*, Nature, **382**, 6592 (1996), 607-9.
- [224] C. M. Niemeyer, B. Ceyhan, S. Gao, L. Chi, S. Peschel, U. Simon, *Site-selective immobilization of gold nanoparticles functionalized with DNA oligomers*, Colloid Polym. Sci., **279**, 1 (2001), 68-72.
- [225] Z. Zhao, E. L. Jacovetty, Y. Liu, H. Yan, *Encapsulation of Gold Nanoparticles in a DNA Origami Cage*, Angew. Chem.-Int. Edit., **50**, 9 (2011), 2041-4.
- [226] R. C. Jin, G. S. Wu, Z. Li, C. A. Mirkin, G. C. Schatz, *What controls the melting properties of DNA-linked gold nanoparticle assemblies?*, J. Am. Chem. Soc., **125**, 6 (2003), 1643-54.
- [227] J. J. Storhoff, A. A. Lazarides, R. C. Mucic, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, G. C. Schatz, *What controls the optical properties of DNA-linked gold nanoparticle assemblies?*, J. Am. Chem. Soc., **122**, 19 (2000), 4640-50.
- [228] U. Kreibig, M. Vollmer, *Optical Properties of Metal Clusters*; Springer, 1995.
- [229] U. Kreibig, L. Genzel, *Optical absorption of small metallic particles*, Surf. Sci., **156**, JUN (1985), 678-700.
- [230] W. H. Yang, G. C. Schatz, R. P. Vanduyne, *Discrete dipole approximation for calculating extinction and Raman intensities for small particles with arbitrary shapes* J. Chem. Phys., **103**, 3 (1995), 869-75.
- [231] B. J. Frisken, *Revisiting the method of cumulants for the analysis of dynamic light-scattering data*, Appl. Opt., **40**, 24 (2001), 4087-91.
- [232] H. D. Dörfler, *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme*; Springer, 2002.
- [233] H. H. Rose, *Optics of high-performance electron microscopes*, Sci. Tech. Adv. Mater., **9**, 1 (2008).
- [234] C. Lin, H. Yan, *DNA nanotechnology: A cascade of activity*, Nat. Nanotechnol., **4**, 4 (2009), 211-2.
- [235] O. I. Wilner, Y. Weizmann, R. Gill, O. Lioubashevski, R. Freeman, I. Willner, *Enzyme cascades activated on topologically programmed DNA scaffolds*, Nat. Nanotechnol., **4**, 4 (2009), 249-54.
- [236] B. Ceyhan, *Difunktionale DNA-Gold-Nanopartikel: Synthese, Charakterisierung und Anwendungen als Bausteine für organisierte Systeme*; Dissertation, TU-Dortmund, 2004.

6 Abkürzungsverzeichnis

A_{260}/A_{280}	Verhältnis der Absorption bei $\lambda = 260$ nm zu $\lambda = 280$ nm
aAF4	Analytische Asymmetrischen-Feld-Flussfeldfraktionierung
A	Adenin
AF4	Asymmetrischen-Feld-Flussfeldfraktionierung
AFM	Rasterkraftmikroskopie
BSPP	Bis(p-sulfonatophenyl)phenylphosphin
C	Cytosin
CCP	Cytochrom C Peroxidase
Cys	Cystein
$\Delta\lambda_{\text{Red}}$	Rotverschiebung der Oberflächenplasmonen Bande
DDI	DNA-vermittelte Immobilisierung
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-Protein	Halbsynthetisch DNA-Protein-Konjugate
dPAGE	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese
dSTV	STV-Mutante mit reduzierter Biotinbinde-Affinität
DTT	Dithiothreitol
dsDNA	Doppelstrang Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Grün fluoreszierendes Protein der zweiten Generation
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPL	Ligation exprimierter Proteine
FFF	Feld-Fluss-Fraktionierung
FP	Fluoreszenzprotein
FPLC	„Fast Protein Liquid Chromatography
G	Guanin
GOx	Glucose-Oxidase
HALO-Tag	Haloalkan Dehalogenase
His	Histidin
His ₆ -Tag	Hexahistidinmarkierung
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IPCR	Immuno-Polymerasekettenreaktion
K_a	Dissoziationskonstante
K_a	Assoziationskonstante
Λ	Wellenlänge von Licht
L3/L4-Schlaufe	Schlaufe zwischen den β -Strängen drei und vier von STV
Lys	Lysin
m/z	Verhältnis von Masse zu Ladung
met	Methionin
mDsRed	Monomeres, rotes Fluoreszenzprotein von Discosoma
mKate	Rotes monovalentes Fluoreszenzprotein Katushka
mSTV	Streptavidin Mutante mit einer Biotin-Bindestelle
MWCO	„Molecular Weight Cut Off“
ndPAGE	Nicht denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese

NHS	N-Hydroxysuccinimid
nSTV	Natives Kernstreptavidin (ca. 62 kDa)
nSTV-SH	Streptavidin Mutante mit einem bis zu vier C-terminalen Cys
NP	Nanopartikel
NTA	Nitrilotriessigsäure
pAF4	Präparative Asymmetrischen-Feld-Flussfeldfraktionierung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDI	Polydispersität
Phe	Phenylalanin
PEG	Polyethylenglycol
PEG ₄ -SPDP	Heterobispezifischer Crosslinker mit PEG-Spacer
RC	Regenerierte Zellulose
R _h	Hydrodynamischer Radius
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese mit Natriumdodecylsulfat
SEC	Größenausschlusschromatographie
SERRS	Oberflächenverstärkte Resonanz-Raman-Spektroskopie
SLS	Statische Lichtstreuung
SM(PEG) ₄	Succinimidyl-[(<i>N</i> -Maleinsäureimidopropionamido) Tetraethyleneglycol] ester
SNAP-Tag	Humane O ₆ -Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase
SNIM	„Scanning Near Field Infrared Microscopy“
sSIAB	Sulfosuccinimidyl (4-iodoacetyl) aminobenzoat
sSMCC	Sulfosuccinimidyl-4-(<i>N</i> -Maleinsäureimidomethyl) Cyclohexan-1-Carboxylat
sSMPB	SulfoSuccinimidyl 4-(<i>p</i> -Maleinsäureimidophenyl) butyrat
ssDNA	Einzelstrang Desoxyribonukleinsäure
STV	Streptavidin
STV-TCH	Streptavidin Mutante mit einer TEV-Schnittstelle, einem His-Taq und einem C-terminalen Cys
T	Thymin
T _M	Schmelztemperatur
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEV-Schnittstelle	Schnittstelle für „Tobacco Etch Virus“-Protease
Trp	Tryptophan
TTV	Traptavidin
UV/Vis	Ultraviolettes Licht / sichtbares Licht

7 Anhang

7.1 DNA-sSMPB-mSTV-Konjugatsynthese

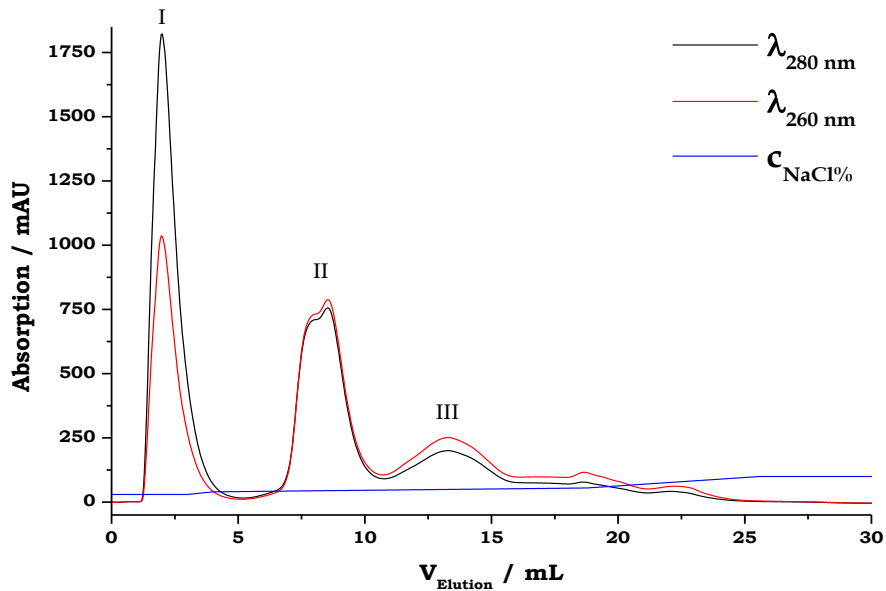


Abbildung 7.1: Repräsentatives Anionenaustauschchromatogramm von sSMPB verknüpftem F9-mSTV-Konjugat. Dabei sind I) Peak des nicht konjugiertes mSTV, II) **26**, III) **27**.

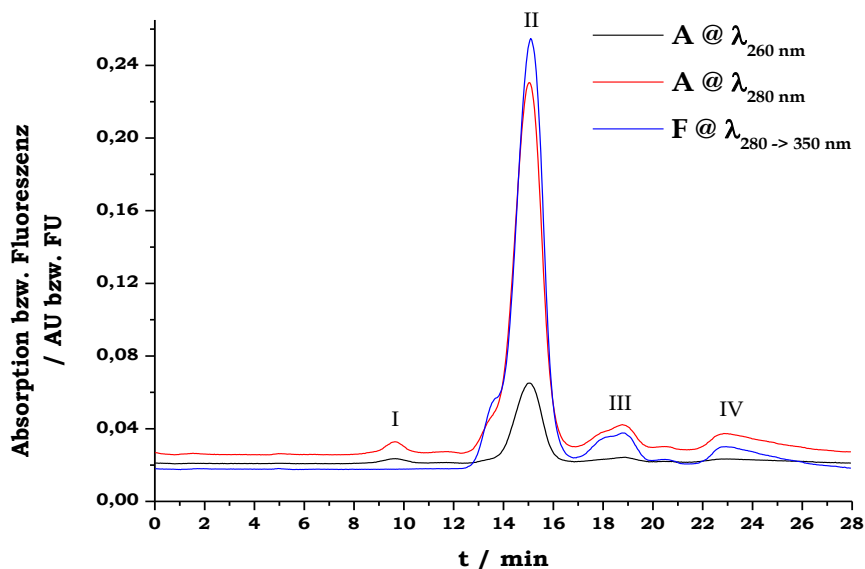


Abbildung 7.2: aAF4-Fraktogramm von sSMPB verknüpftem F9-mSTV-Monokonjugat; Peak I: freies Oligonucleotid, Peak II: **26**, Peak III: $(\mathbf{26})_2$ und Peak IV: aggregiertes Konjugat.

7.2 DNA-sSIAB-mSTV-Konjugatsynthese

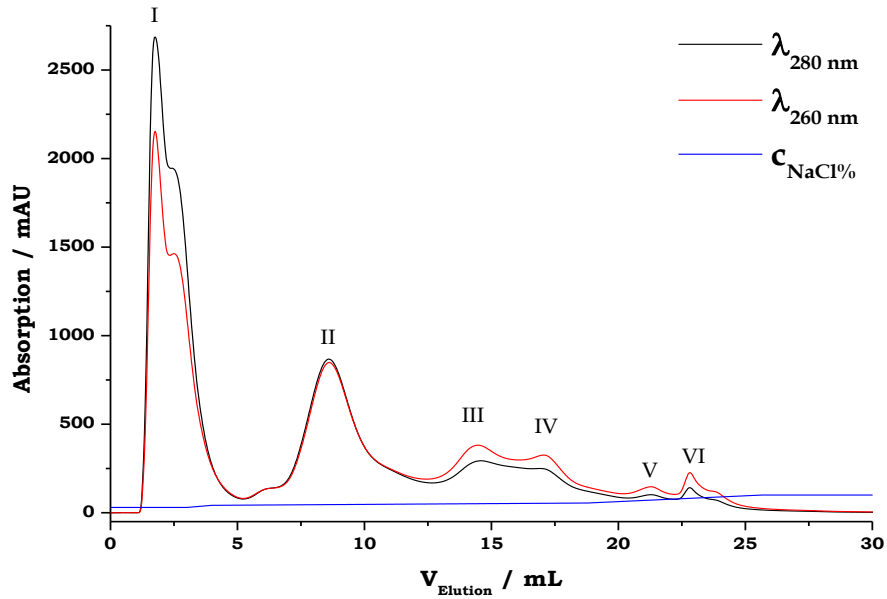


Abbildung 7.3: Repräsentatives Anionenaustauschchromatogramm von sSIAB verknüpftem F9-mSTV-Konjugat; I) nicht konjugiertes mSTV, II) **28**, III) **29** IV) F9₃-mSTV, V) F9₃-mSTV und VI) nicht konjugiertes F9.

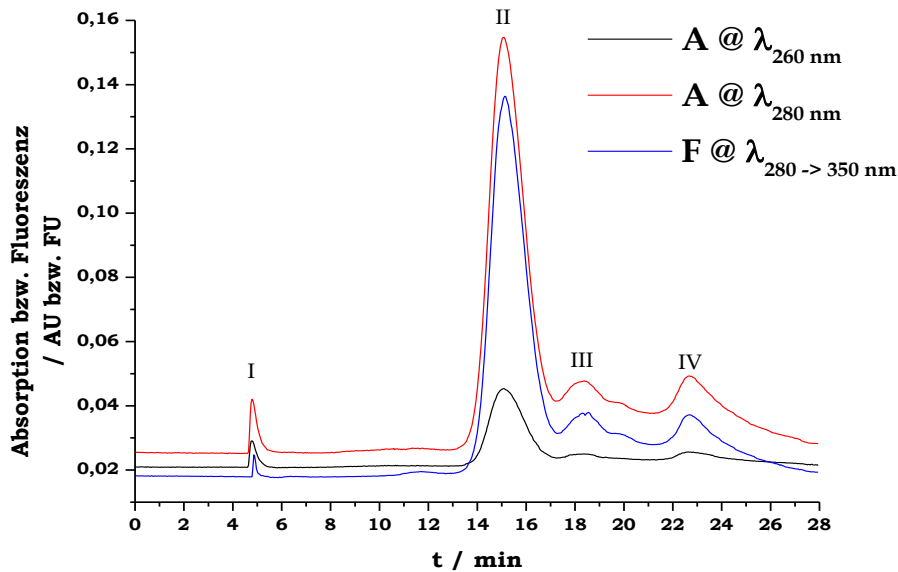


Abbildung 7.4: aAF4-Fraktogramm von sSIAB verknüpftem F9-mSTV-Monokonjugat; Dabei sind Peak I: Signal durch Fokusabbruch (Void-Peak), Peak II: **28**, Peak III: (**28**)₂ und Peak IV: aggregiertes Konjugat.

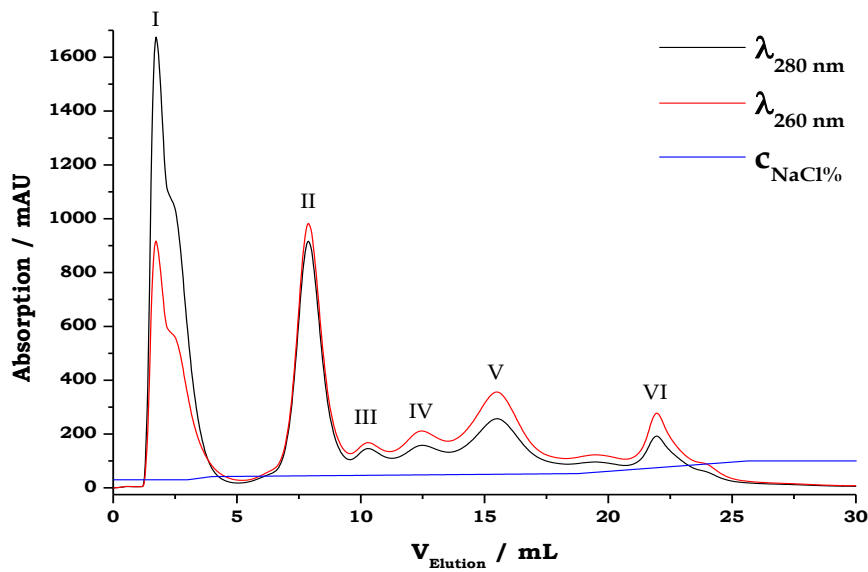
7.3 DNA-PEG₄-SPDP-mSTV-Konjugatsynthese

Abbildung 7.5: Repräsentatives Anionenaustauschchromatogramm von PEG₄-SPDP verknüpftem F9-mSTV-Konjugat; I) nicht konjugiertes mSTV, II) **30**, III) **31**, IV) F9₃-mSTV, V) F9₄-mSTV und VI) nicht konjugiertes F9.

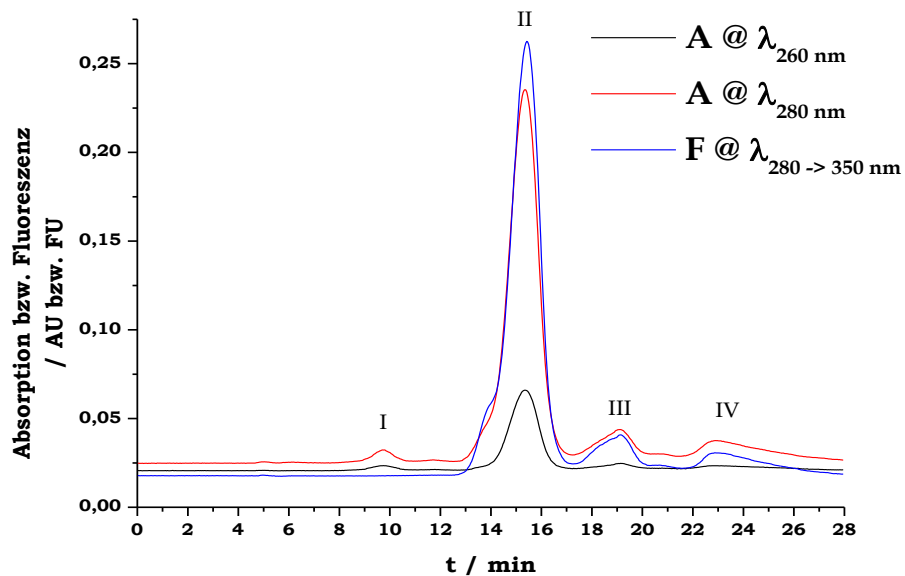


Abbildung 7.6: αAF4-Fraktogramm von PEG₄-SPDP verknüpftem F9-mSTV-Monokonjugat; Peak I: freies Oligonucleotid, Peak II: **30**, Peak III: (**30**)₂ und Peak IV: aggregiertes Konjugat.

7.4 ndPAGE von 18 mit drei unterschiedlichen Äquivalenten von bF5

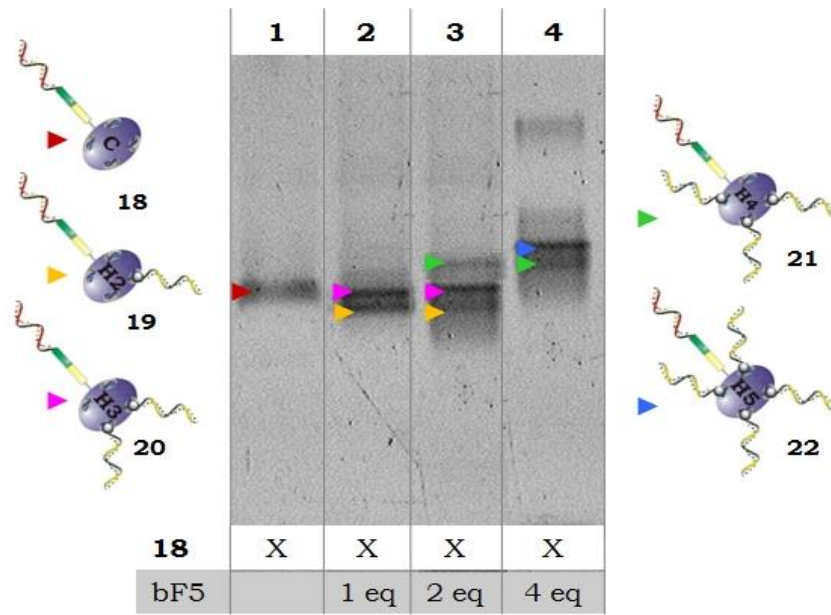


Abbildung 7.7: 7.5% ndPAGE von **18** nach Anfärben mit Sybr Gold; **Spur 1:** **18**, **Spur 2:** **18** + 1 eq bF5, **Spur 3:** **18** + 2 eq bF5, **Spur 4:** **18** + 4 eq bF5.

7.5 Fluoreszenzgel der ndPAGE Charakterisierung von kovalenten DNA-mSTV-Doppelhanteln und hybriden DNA-mSTV-Doppelhanteln

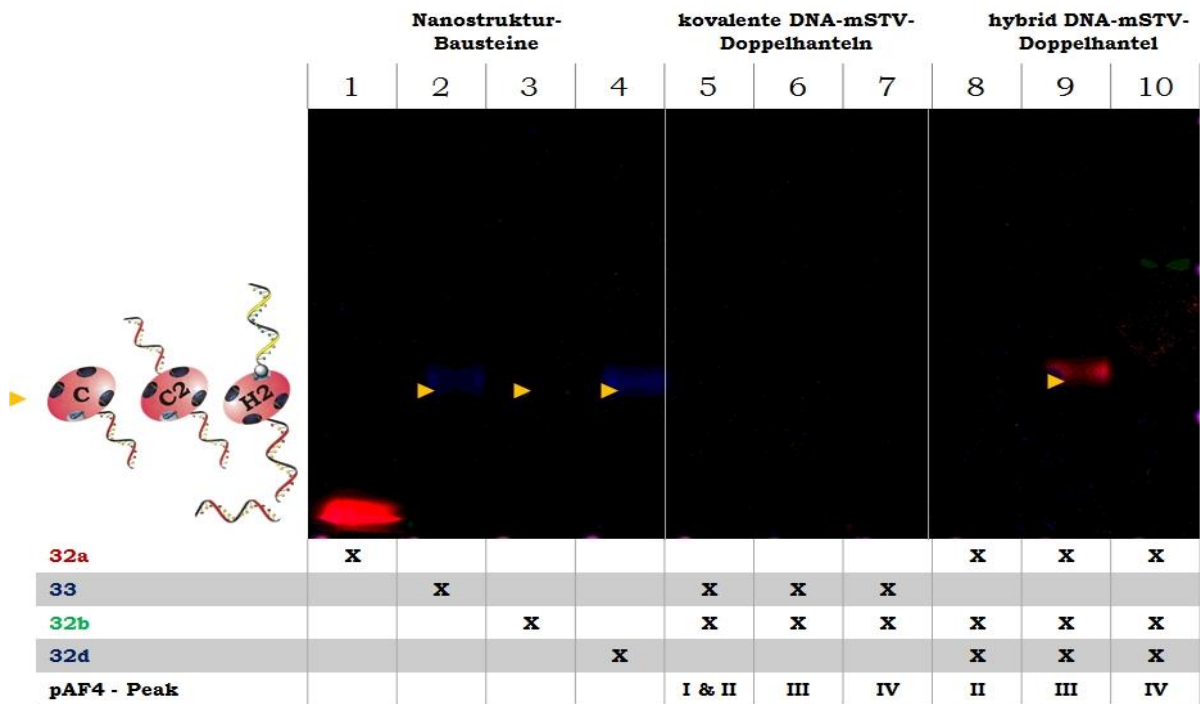


Abbildung 7.8: 8.5% ndPAGE von DNA-mSTV-Doppelhanteln **1** und **2** nach Fluoreszenzgelscannen mit Cy3-Filter für **bF10-Cy3**, Cy5-Filter für **bAtto 633** und FITC-Filter für **bAtto 488**; **Spur 1:** **32a**, **Spur 2:** **33**, **Spur 3:** **32b**, **Spur 4:** **32d**, **Spur 5, 6, 7:** Peak I + II, Peak III, Peak IV der pAF4 der kovalente DNA-mSTV-Doppelhanteln und **Spur 8, 9, 10:** Peak II, Peak III, Peak IV der pAF4 der hybrid DNA-mSTV-Doppelhanteln.

7.6 dPAGE von Y-DNA-Motiv Oligonucleotiden

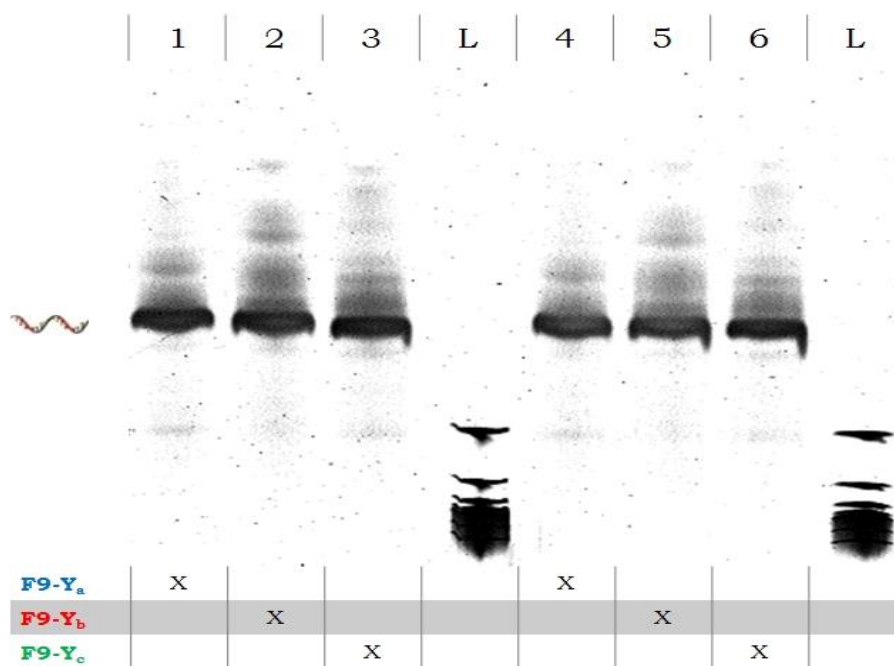


Abbildung 7.9: 15% Harnstoffgel der dPAGE der Y-DNA-Motiv Oligonucleotiden nach Anfärben mit Sybr Gold; **Spur 1 & 4: F9-Y_a**, **Spur 2 & 5: F9-Y_b**, **Spur 3 & 6: F9-Y_c** und **Spur L: 100 bp-Ladder**

7.7 Adsorption an Polyethersulfon Membran

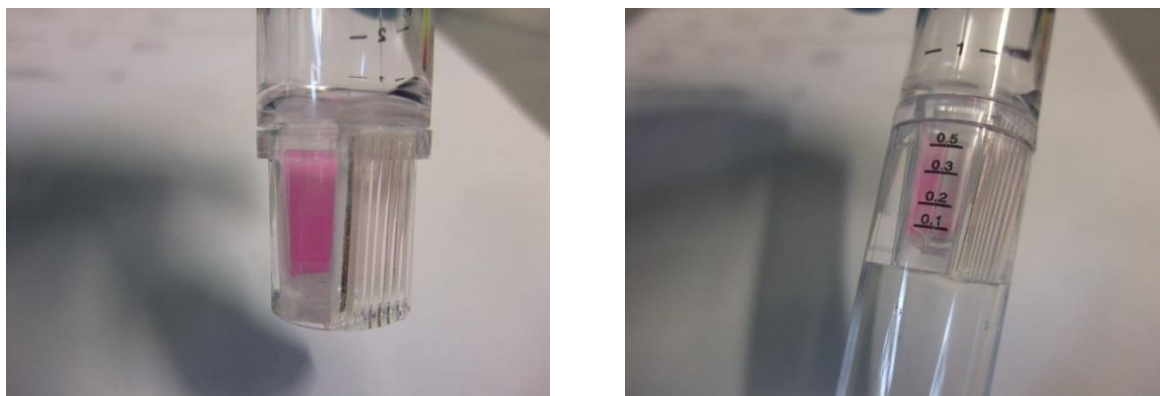


Abbildung 7.10: Fotos der Adsorption von Cy3-markierten **55** an die Polyethersulfon Membran von Vivaspin Ultrafiltrationseinheiten.

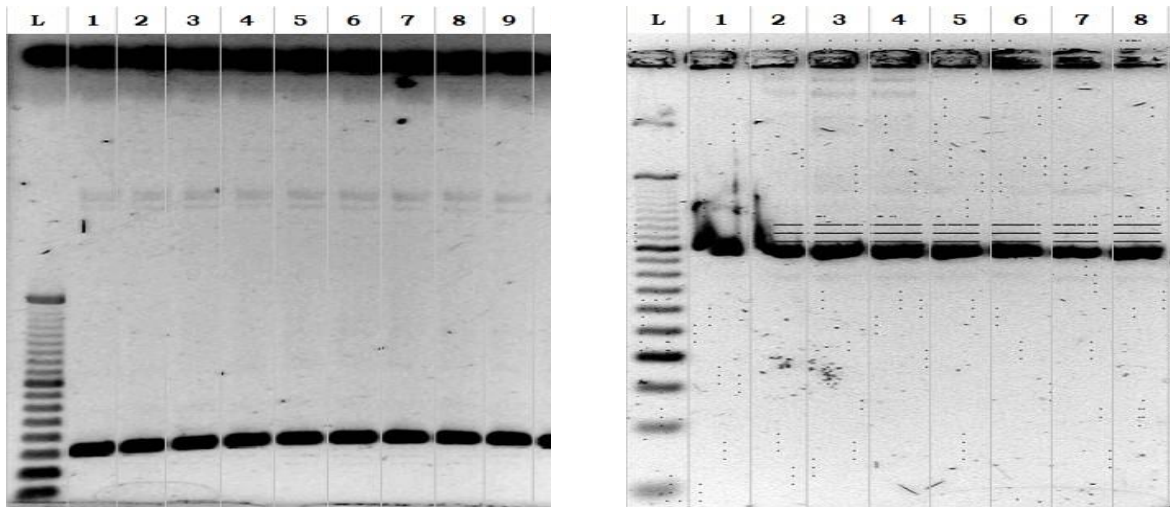
7.8 PCR Produkte von b_2255 und b_2486 

Abbildung 7.11: 1.2% Agarose Gel von b_2255 (links) und b_2486 (rechts) nach der PCR angefärbt mit Ethidiumbromid; L: 50 bp-Ladder und alle weitere Banden beladen mit PCR-Produkten.

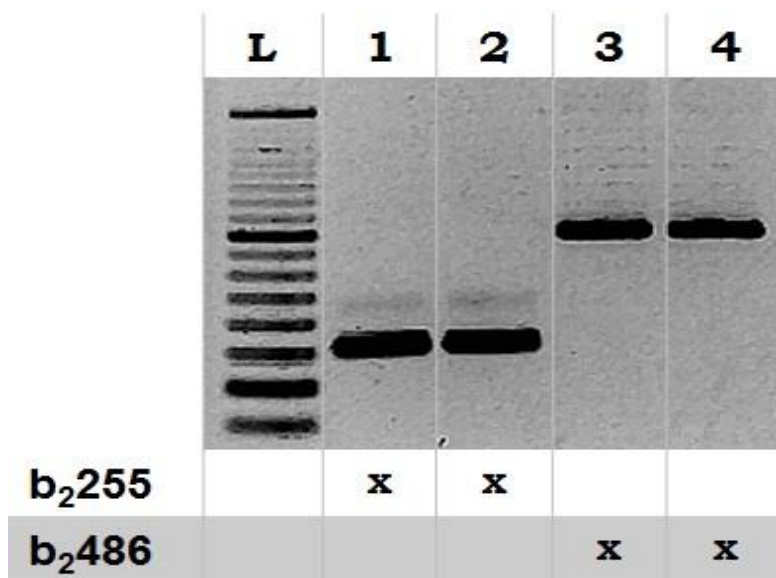
7.9 Aufreinigung der PCR-Produkte von b_2255 und b_2486 

Abbildung 7.12: 1.2% Agarose Gel von b_2255 und b_2486 nach Aufreinigung mittels ChIP der PCR-Produkte nach Färbung mit Ethidiumbromid; L: 50 bp-Ladder **1** und **2**: b_2255 , **3** und **4**: b_2486 .

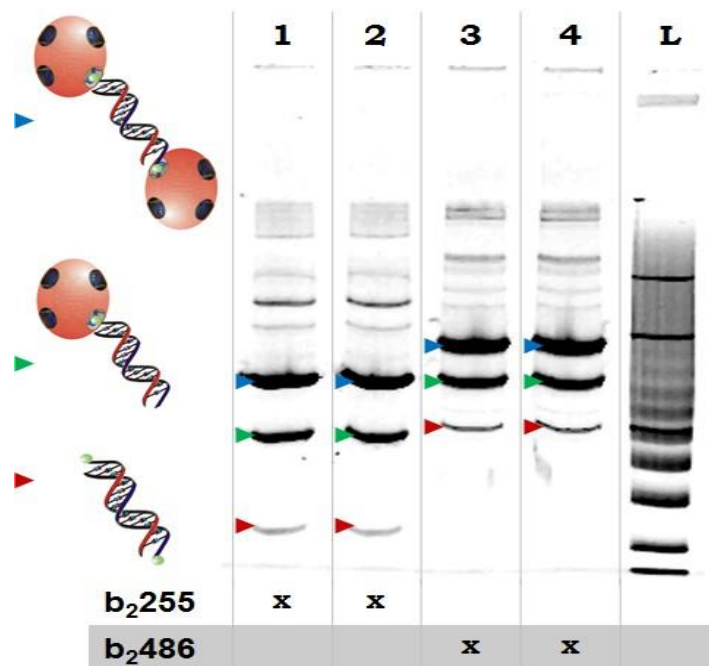
7.10 Assemblierung von b₂255-mSTV2 und b₂486-mSTV2

Abbildung 7.13: 8.5% ndPAGE von nicht kovalenten DNA-mSTV-Hanteln unmittelbar nach der Assemblierung von b₂255 bzw. b₂486 mit 4 eq mSTV nach Anfärben mit Sybr Gold; **1, 2: 75**, **3, 4: 77** und **L: 100 bp-Ladder**.

7.11 DNA-mDsRed-Konjugatsynthese

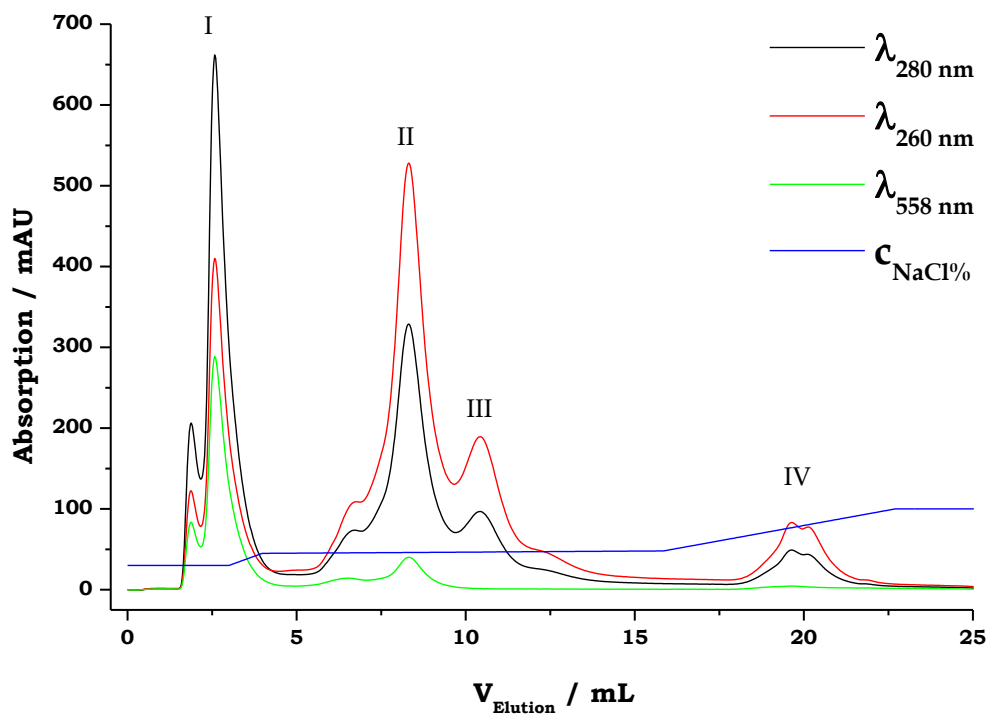


Abbildung 7.14: Repräsentatives Anionenaustauschchromatogramm von der F9-mDsRed-Konjugataufreinigung; I) nicht konjugierten mDsRed, II) **80a**, III) F9₂₋₃-mDsRed und IV) freies F9.

7.12 Rotverschiebung bei der Au-NP-Aggregation

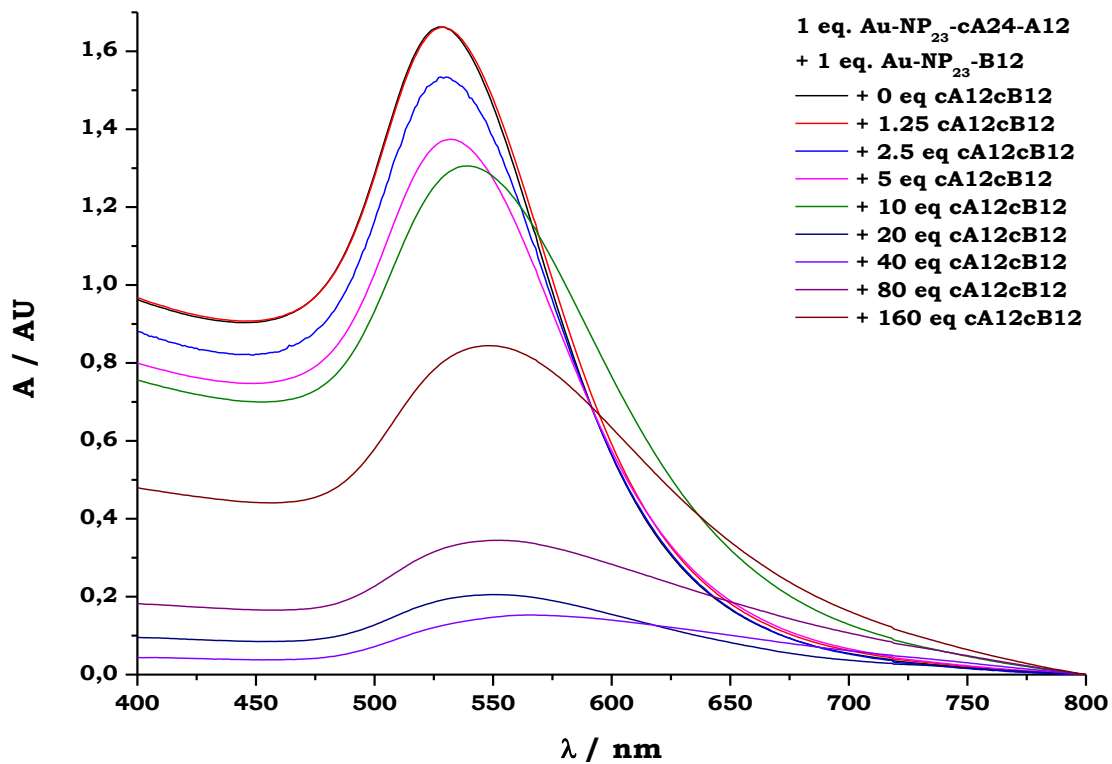



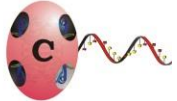


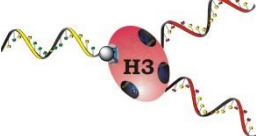

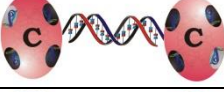
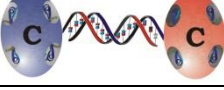
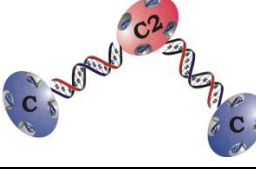
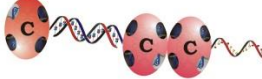
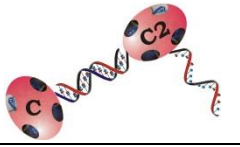


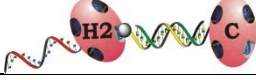


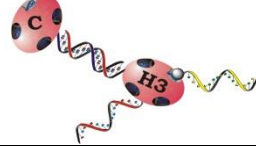

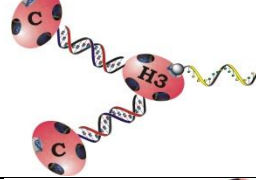
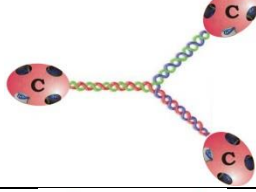

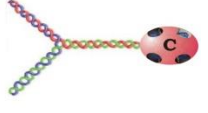
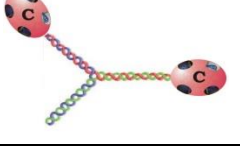
Abbildung 7.15: UV/Vis-Absorptionsspektren zur Bestimmung der $\Delta\lambda_{Red}$ bei der Assemblierung von **84** und **86** unter Verwendung unterschiedlicher Äquivalente des verbrückenden Oligonucleotids: cA12cB12.



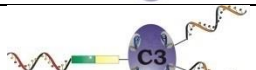
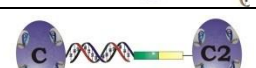













8 DNA-STV-Konjugate und -Nanostruktur Nomenklaturen














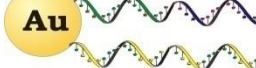



In den folgenden schematischen Abbildungen sind STV-Mutanten mit vier Biotinbindestellen in blau dargestellt. mSTV ist rot abgebildet. Die Buchstaben der Beschriftung auf den STV-Mutanten beziehen sich auf den Bindungstyp zu den gebundenen Oligonucleotiden (C = kovalente Bindung, H = kovalente und nicht kovalente Bindungen, NC = nicht kovalente Bindungen). Die Zahlen der Beschriftung auf den STV-Mutanten beschreiben die Anzahl der gebundenen Oligonucleotide (keine Zahl entspricht einer Bindung). Ist ein DNA-STV-Konjugat in Klammern mit einem Index versehen, weist dieses auf ein Dimer (5a)₂, Trimer (5a)₃ oder Oligomer (5a)_x hin.

Nomenklatur	Sequenz	Bausteine	Schematische Abbildung
1	2 x F9 2 x cF9	33a 2 x 32b	
2	F9 cF9 bF10 cF10	35a 32b 32d	
3	2 x F9 2 x cF9 bF10 cF10	36 2 x 32b 32d	
4	F9 cF9 F1 cF1 bF10 cF10	65 32b 32c 32d	
5a	F9	sSMCC nSTV oder nSTV-SH	
5b	cF9		
5c	F1		
5d	cF1		
5e	F10		
5f	cF10		
6	2 x F9	sSMCC nSTV oder nSTV-SH	
7	3 x F9	sSMCC nSTV	
8	4 x F9	sSMCC nSTV	
9	F9 bF5	sSMCC nSTV	
10	F9 2 x bF5	sSMCC nSTV	
11	2 x F9 bF5	sSMCC nSTV	
12	2 x F9 2 x bF5	sSMCC nSTV	
13	F9 cF9	5a 5b	
14a	F9	sSMCC nSTV-SH	
14b	cF9		
15a	2 x F9	sSMCC nSTV-SH	
15b	2 x cF9		
16	F9 bF5	sSMCC nSTV-SH	
17	F9 2 x bF5	sSMCC nSTV-SH	
18	F1	sSMCC nSTV-TCH	
19	F1 bF10	sSMCC nSTV-TCH	
20	F1 2 x bF10	sSMCC nSTV-TCH	
21	F1 3 x bF10	sSMCC nSTV-TCH	
22	F1 4 x bF10	sSMCC nSTV-TCH	

23	F9	sSMCC mSTV	
24	2 x F9	sSMCC mSTV	
25	3 x F9	sSMCC mSTV	
26	F9	sSMPB mSTV	
28	F9	sSIAB mSTV	
30	F9	PEG ₄ -SPDP mSTV	
32a	F9	SM(PEG) ₄ mSTV	
32b	cF9		
32c	cF1		
32d	cF10		
27	2 x F9	sSMPB mSTV	
29	2 x F9	sSIAB mSTV	
31	2 x F9	PEG ₄ -SPDP mSTV	
33a	2 x F9	SM(PEG) ₄ mSTV	
33b	2 x cF9		
34	3 x F9	SM(PEG) ₄ mSTV	
35a	F9 bF10	SM(PEG) ₄ mSTV	
35b	F9 bF5		
36	2 x F9 bF5	SM(PEG) ₄ mSTV	
37	F9 cF9	SM(PEG) ₄ mSTV	
38	F9 cF9	32a 32b	
39	F9 cF9	32a 5b	
40	2 x F9 2 x cF9	33a 2 x 5b	
41	2 x F9 cF9	33a 5b	
42	2 x F9 cF9	33a 32b	

43	F9 bF10 cF10	35a 32d	
44	F9 cF9 bF10	35a 32b	
45	2 x F9 bF10 cF10	36 32d	
46	2 x F9 cF9 bF10	36 32b	
47	2 x F9 cF9 bF10 cF10	36 32b 32d	
48	2 x F9 2 x cF9 bF10	36 2 x 32b	
49	F9-Y _a F9-Y _b F9-Y _c 3 x cF9	50 3 x 32b	
50	F9-Y _a F9-Y _b F9-Y _c		
51a	F9-Y _a F9-Y _b 1 x cF9	32b	
51b	F9-Y _b F9-Y _c 1 x cF9		
51c	F9-Y _a F9-Y _c 1 x cF9		
52a	F9-Y _a F9-Y _b 2 x cF9	2 x 32b	
52b	F9-Y _b F9-Y _c 2 x cF9		
52c	F9-Y _a F9-Y _c 2 x cF9		
53	F9-Y _a F9-Y _b F9-Y _c cF9	50 1 x 32b	
54	F9-Y _a F9-Y _b F9-Y _c 2 x cF9	50 2 x 32b	

55	F1 F9	sSMCC SM(PEG) ₄ nSTV-TCH	
56	F1 F9 bF10	sSMCC SM(PEG) ₄ nSTV-TCH	
57	F1 2 x F9	sSMCC SM(PEG) ₄ nSTV-TCH	
58	F1 cF1	18 5d	
59	F1 cF1 F9	55 5d	
60	F1 cF1 2 x F9	57 5d	
61	F1 F9 cF9	55 5b	
62	F1 2 x F9 cF9	57 5b	
63	F1 cF1 F9 cF9	55 5b 5d	
64	F1 cF1 2 x F9 cF9	57 5b 5d	
65	F1 F9 2 x bF10	55	
66	F1 F9 3 x bF10	55	
67	F1 F9 bF10	57	
68	F1 F9 2 x bF10	57	
69	F1 F9 bF10 cF10	56 32d	
70	F1 cF1 F9 bF10	56 32c	
71	F1 F9 cF9 bF10	56 32b	

72	F1 cF1 F9 bF10 cF10	56 32c 32d	
73	F1 cF1 F9 cF9 bF10	56 32b 32d	
74	F1 F9 cF9 bF10 cF10	56 32b 32c	
75	b₂255	2 x mSTV	
76	b₂255	mSTV	
77	b₂486	2 x mSTV	
78	b₂486	mSTV	
79a	F9	sSMCC EGFP	
79b	cF9		
79c	A24		
80a	F9	sSMCC mDsRed	
80b	cF9		
81	F9 cF9	79a 79b	
82	F9 cF9	80a 80b	
83	B12	Ag-NP	
84	A12 cA24	Au-NP ₂₃	
85	A12 cA24 B12 A24	79c 83a 84a cA12cB12	
86	B12	Au-NP ₂₃	
87	A12 B12 cA24	84a 86a cA12cB12	
88	A12 A24 cA24	79c 85a	
89	A12 cA24 B12 A24	79c 84a 86a cA12cB12	