

# **KAPILLARELEKTROPHORESE VON NUKLEINSÄUREN**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich

Biochemie, Chemie und Pharmazie

der Johann Wolfgang Goethe - Universität

in Frankfurt am Main

von

Christa Edling

Heltau

Frankfurt am Main 2006

D30

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der  
Johann Wolfgang Goethe – Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: .....

Gutachter:.....

Datum der Disputation:.....

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazeutische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main angefertigt.

Herrn Prof. Dr. C. R. Noe danke ich herzlichst für die Auswahl des Themas, für seine Unterstützung sowie die Möglichkeit am Institut für Pharmazeutische Chemie in Wien, für einige Monate zu arbeiten.

Herrn B. Lachmann danke ich für die geduldige Einführung in das Thema, das Begleiten dieser Arbeit und die immer wiederkehrende Aufmunterung weiterzumachen. Desweiteren danke ich ihm für die Durchsicht dieser Arbeit.

Jürgen Becker und Michael Walther danke ich für die Einführung in das molekularbiologische Arbeiten.

Dem Rest der Arbeitsgruppe Andrea Sommer, Doris Werner, Ina Frank, Birgit Linz und Ulrike Hemmrich, Jens Kruse, Thomas Pöhler, Carsten Siebert, Oliver Schadt, Michael Kock, Adil Duran, Muhammed Jasic, Sven Möllenbeck, Ralf Lyssy, Wolfgang Schlags danke ich für die nette Atmosphäre und gute Laune und die nicht immer fachlichen Gespräche.

Den Professoren Dr. H. Hoffmann und Dr. H. Stark sowie den Kolleginnen Kerstin Gräfe, Marlene Geider, Sieglinde Überall und Anneke Hackling danke ich für die gute Zusammenarbeit in dem Semester Arzneibuch-Analytik.

Allen guten Geister des Instituts, unter anderen den Herren R. Becht, U. Moelter und B. Rosenmeyer, Frau C. Lober, Frau B. Hütter, danke ich für ihre Unterstützung.

Den Kollegen aus Wien möchte ich für die nette Aufnahme am Institut danken, ein besonders herzliches Dankeschön geht an Dr. Inge Schuster, ohne Sie wären die Arbeiten zu Vitamin D nicht zustande gekommen.

Meinen jetzigen Kollegen Dirk Lochmann und Anke Rohmann danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Finalisierung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, Jan und allen meinen Freunden, für ihre Geduld und dass Sie immer da waren, wenn es nötig war.

## INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	1
Abbildungen.....	7
Abkürzungen.....	10
Einleitung.....	12
Grundlagen kapillarelektrophoretischer Trennungen.....	12
Theorie elektrophoretischer Trennungen in den Kapillaren.....	14
Apparatur.....	20
Spannungsquelle.....	20
Kapillaren.....	20
Injektion.....	22
Detektion.....	24
Kapillarelektrophoretische Verfahren.....	26
Kapillarzonenelektrophorese CZE.....	26
Micellarelektrokinetische Chromatographie MEKC.....	26
Chirale Kapillarelektrophorese.....	27
Kapillargelelektrophorese CGE.....	28
Isoelektrische Fokussierung IEF.....	28
Isotachophorese ITP.....	29
Elektrochromatographie CEC.....	29
Nukleinsäuren.....	30
Elektrophoretische Mobilität von Nukleinsäuren in polymeren Netzwerken.....	33
Polymere Trennmatrices für die CGE.....	38
Gele.....	38
Grundlagen der Veränderungen im DNA-Muster von Zellen.....	45
Material und Methoden.....	54

Kapillarelektrophorese.....	54
Gel-Kapillaren der Fa. Beckman.....	54
Trennkapillaren.....	54
Herstellung des Detektionsfensters .....	54
Permanente Beschichtung der Kapillaroberfläche nach Hjerten <sup>[35]</sup> .....	55
Herstellung von Pufferlösungen für die CE .....	60
Etablierung eines internen Standards .....	65
LIF-Detektion mit YOPRO .....	70
Zellkultur .....	72
Material.....	72
Medien.....	72
Routinemethoden zur Subkultivierung von Zellen.....	73
Apoptoseinduktion .....	80
Etoposid:.....	80
Proliferationstest.....	81
Viabilitätstest von Zellen.....	82
Zellkernanfärbung mit Hoechst No. 33258 .....	83
Isolierung genomischer DNA.....	84
DNA-Quantifizierung.....	85
Apoptoseinduktion in C6-Glioma-Zellen und MCF 7 Zellen.....	85
Aufgabenstellung.....	89
Ergebnisse und Diskussion.....	91
Etablierung einer Standardmethode.....	91
Einfluss verschiedener Parameter auf die Nukleinsäure-Trennung in Polymerlösungen .....	91
Standardmethode .....	95

Testung verschiedener Cellulosederivate auf Eignung als Trennmatrix in der Kapillargelelektrophorese .....	96
Molekularbiologische Anwendungen der CE .....	108
Charakterisierung von Antisense-Oligonukleotiden .....	108
Detektion von Genmutation .....	112
Reinheitsprüfung von Oligonukleotiden .....	115
Detektion von DNA-Fragmenten während der Apoptose.....	117
Erfassung der DNA-Fragmentation an apoptotischen und nekrotischen Zellen.....	120
Zusammenfassung.....	130
Literatur.....	132
Lebenslauf.....	144
Präsentationen .....	146

# ABBILDUNGEN

<i>Abbildung 1: Schematischer Aufbau einer Kapillarelektrophorese (HV Hochspannungsversorgung) nach[5]</i>	14
<i>Abbildung 2: Ladungsverteilung an der Kapillaroberfläche; a: Kapillaroberfläche; b: starre Schicht (Helmholz-Schicht); c: diffuse Grenzschicht (Debye-Hückel-Schicht); ● Kationen; ● Anionen</i>	17
<i>Abbildung 3: Verlauf des Zeta-Potentials</i>	17
<i>Abbildung 4: Strömungsprofil durch EOF A und durch Druck B</i>	18
<i>Abbildung 5: Wanderungsrichtung von verschiedenen geladenen Analyten</i>	19
<i>Abbildung 6: Desoxyadenosin - Desoxythymidin</i>	30
<i>Abbildung 7: Desoxycytidin – Desoxyguanosin</i>	31
<i>Abbildung 8: Struktur der DNA-Doppelhelix Typ B</i>	32
<i>Abbildung 9: Uridin</i>	32
<i>Abbildung 10: Konformation der wandernden Biopolymere; A: entspannte Form; B: gestreckte Form; C: U-Konformation; D: partiell gestreckte Form[6, 28]</i>	34
<i>Abbildung 11: Simulation der Mobilität des Analyten gegen die Segmentlänge des Analyten bei konstanter Porengröße des polymeren Netzwerks[6, 28]</i>	37
<i>Abbildung 12: Schematische Darstellung eines linearen Polyacrylamidgels (links) und eines quervernetzten Polyacrylamidgels (rechts)</i>	38
<i>Abbildung 13: Struktur eines quervernetzten Polyacrylamidgels</i>	39
<i>Abbildung 14: Lineares Polyacrylamid</i>	41
<i>Abbildung 15: Verschiedene Typen von Polymerlösungen, A: verdünnte Lösung; B: halbverdünnte Lösungen; C: konzentrierte Lösungen</i>	43
<i>Abbildung 16: Schematische Darstellung morphologischer Veränderungen einer Zelle bei Apoptose (Wyllie et al. (1998). (verändert nach Produktkatalog Boehringer Mannheim)</i>	48
<i>Abbildung 17: Schematische Darstellung morphologischer Veränderungen einer Zelle bei Nekrose (Wyllie et al. (1998). (verändert nach Produktkatalog Boehringer Mannheim)</i>	49
<i>Abbildung 18: Fragmentierung eines DNA-Stranges in den Linker-Regionen</i>	50
<i>Abbildung 19: Die DNA-Fragmentierung während der Apoptose erzeugt Fragmente in zwei verschiedenen Größenordnungen (Abbildung modifiziert nach Hughes und Cidlowski, 2000)</i>	50
<i>Abbildung 20: Vitamin D3 (Colecalciferol) und Vitamin D2 (Ergocalciferol)</i>	52
<i>Abbildung 21: Glasrack zur Anfertigung von Detektionsfenster in Kapillaren</i>	55
<i>Abbildung 22: Kapillarbeschichtung nach Hjerten; a Silanisierung; b Copolymerisation der Methacryl-Doppelbindungen mit Acrylamid</i>	57
<i>Abbildung 23: Beschichtungsapparatur</i>	58
<i>Abbildung 24: Änderung der Migrationszeit von einem 20-er Oligomer, beim zweiten Lauf war zusätzlich ein 12-er Oligomer präsent</i>	59
<i>Abbildung 25: UV-Spektrum einer 0,001 % Pyromellitsäurelösung in Wasser und in TBE-Puffer</i>	66
<i>Abbildung 26: YOPRO I</i>	70

---

Abbildung 27: Elektropherogramm von einer $10^{-7}$ M Fluorescein-Na Lösung, 5kV, 5 sec .....	71
Abbildung 28: Mykoplasmenfreie Zellkultur.....	75
Abbildung 29: Mykoplasmenverseuchte Zellkultur.....	76
Abbildung 30: Beispiel eines Gels mit Positivkontrolle und MCF-7 Mykoplasmenverseucht, Marker .....	78
Abbildung 31: Beispiel eines Gels mit MCF-7 Antibiotikabehandlung 1Woche, 2 Wochen, 3 Wochen; Marker .....	79
Abbildung 32: Etoposid .....	80
Abbildung 33: Neutral Rot.....	81
Abbildung 34: Mikroskopieaufnahme mit Neutral Rot angefärbten Zellen .....	81
Abbildung 35: Trypanblau.....	82
Abbildung 36: Neubauer Zählkammer.....	82
Abbildung 37: Fluoreszenzfarbstoff Hoechst No. 33258 .....	83
Abbildung 38: Mikroskopische Aufnahmen vom: Links apoptotische Zellkerne, sie erscheinen geschrumpft und hell leuchtend, Rechts Zellkerne vitaler Zellen, Vergrößerung 400X.....	83
Abbildung 39: Schema Isolierung DNA mit Invisorb®Spin Cell Mini Kit.....	84
Abbildung 40: Trennung von 20-er und 40-er Oligomeren im 1 % HEC-TAPS-Puffer.....	91
Abbildung 41: Trennung von 20-er und 40-er Oligomeren im 1 % HEC-TBE-Puffer.....	92
Abbildung 42: Verkürzung der Migrationszeiten durch Zugabe von Harnstoff.....	93
Abbildung 43: Verkürzung der Analysenzeit durch Erhöhung der Spannung bei 4 kV und 10 kV .....	94
Abbildung 44: Einfluss der Temperatur auf die elektrophoretische Trennung bei 20 °C und 25 °C.....	94
Abbildung 45: Kinematische Viskosität von verschiedenen HEC-Polymer-Lösungen in Abhängigkeit von der Konzentration, dazugehörige potentielle Trendlinien.....	98
Abbildung 46: Kinematische Viskosität von verschiedenen HPMC-Polymer-Lösungen in Abhängigkeit von der Konzentration, dazugehörige potentielle Trendlinien.....	99
Abbildung 47: Überlappungskonzentration $c^*$ von HPMC.....	99
Abbildung 48: Kinematische Viskosität von verschiedenen MC-Polymer-Lösungen in Abhängigkeit von der Konzentration, dazugehörige potentielle Trendlinien.....	100
Abbildung 49: Kinematische Viskosität von verschiedenen CMC-Polymer-Lösungen in Abhängigkeit von der Konzentration, dazugehörige potentielle Trendlinien.....	101
Abbildung 50: Trenneffizienz von HEC Trennpuffer mit Harnstoff .....	103
Abbildung 51: Trenneffizienz von HEC Trennpuffer ohne Harnstoff.....	103
Abbildung 52: Trenneffizienz von HPMC Trennpuffer mit Harnstoff.....	104
Abbildung 53: Trenneffizienz von HPMC Trennpuffer ohne Harnstoff .....	104
Abbildung 54: Trenneffizienz von MC Trennpuffer ohne Harnstoff.....	105
Abbildung 56: Vergleich HEC 1 % o.U.; HPMC 0,6 % o.U. und MC 0,4 % o.U.; Viskosität von ca. $14,4 \text{ mm}^2$ /s.....	106
Abbildung 57: 2'-O-Modifikationen des Adenosins, die für diese Untersuchung in Oligonukleotiden eingeführt wurden. ....	109
Abbildung 58: Kapillarelektropherogramme von A12-Dodecameren mit 2 und 6 Modifikationen. ....	110

---

Abbildung 59: Relative Elektrophoretische Mobilitäten einer A12-Reihe mit zunehmendem Modifikationsgrad.....	111
Abbildung 60: DEL gereinigt.....	113
Abbildung 61: INS gereinigt.....	113
Abbildung 62: DEL und INS gereinigt.....	114
Abbildung 63: DEL mit beiden Größenmarker.....	114
Abbildung 64: Reinheitsprüfung eines Oligonukleotides; Zielsequenz bei 39,64 min.....	116
Abbildung 65: Elektropherogramm des DNA-Längenstandard II und dazugehörige Kalibrationswerte aus sieben Messungen.....	118
Abbildung 66: Auftrennung der 14 ds-DNA Fragmenten einer 1 KB Leiter.....	118
Abbildung 67: Auflösung der 11 Fragmenten des HAE III Marker.....	119
Abbildung 68: DNA von C6 Gliomazellen in Medium mit 1% Serum (Kontrolle).....	121
Abbildung 69: DNA von C6 Gliomazellen 48 h Behandlung mit 20 $\mu$ M Etoposid.....	121
Abbildung 70: Elektropherogramm von DNA aus C6 Zellen in Normalserum.....	122
Abbildung 71: Elektropherogramm von DNA aus C6 Zellen mit 20 $\mu$ l Etoposidlösung inkubiert.....	122
Abbildung 72: Elektropherogramm von DNA aus C6 Zellen mit 30 $\mu$ l Etoposidlösung inkubiert.....	123
Abbildung 73: Elektropherogramm von DNA aus C6 Zellen mit 40 $\mu$ l Etoposidlösung inkubiert.....	123
Abbildung 74: Elektropherogramm von DNA aus C6 Zellen mit 60 $\mu$ l Etoposidlösung inkubiert.....	124
Abbildung 75: Elektropherogramm von DNA aus C6 Zellen ohne Serum inkubiert.....	124
Abbildung 76: Elektropherogramm von DNA aus MCF 7 Zellen mit Etoposid inkubiert.....	125
Abbildung 77: Elektropherogramm von DNA aus MCF 7 Zellen ohne Serum inkubiert.....	126
Abbildung 78: Elektropherogramme eines DNA-Standards (100 – 1000 bp in 100-er Schritten) und DNA-Extrakt von C6 Zellen, mit Etoposid für 118.5 h inkubiert, als Positivkontrolle.....	127
Abbildung 79: Elektropherogramme des DNA-Standards [A] und der DNA-Extrakte von C6 Zellen inkubiert mit 90 nM $1\alpha,25-(OH)_2-3-epi-D_3$ [B] and $1\alpha,25-(OH)_2-16-ene-23-yne-26,27-F_6-D_3$ [C] für 118.5h.....	128
Abbildung 80: Elektropherogramme von Standard [A] und DNA-Extrakt von C6 Zellen inkubiert mit 90 nM $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ [B] für 118.5 h.....	129

## ABKÜRZUNGEN

CE	Kapillarelektrophorese
CZE	Kapillarzonenelektrophorese
MEKC	Micellarelektrokinetische Chromatographie
CGE	Kapillargelelektrophorese
IEF	Isoelektrische Fokussierung
ITP	Isotachophorese
CEC	Elektrochromatographie
EOF	Elektroosmotischer Fluss
DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
APS	Ammoniumpersulfat
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
NaCl	Natriumchlorid
KCL	Kaliumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriummonohydrogenphosphat
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-triphosphat
TBE	Trisborat-EDTA Puffer
PAA	Polyacrylamid
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Ph.Eur.	Europäisches Arzneibuch
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
RT	Raumtemperatur
i.D.	Innendurchmesser
HEC	Hydroxyethylcellulose
MC	Methylcellulose
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose
CMC	Carboxymethylcellulose
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum

---

LDL	Low density Lipoprotein
Apo B	Apolipoprotein B
ss-DNA	Einzelstrang DNA
ds-DNA	Doppelsträngige DNA
OD	Optische Dichte
LIF	Laserinduzierte Fluoreszenz
TAPS	Tris(hydroxymethyl)-methylaminopropansulfonsäure
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion

# **EINLEITUNG**

## **Grundlagen kapillarelektrophoretischer Trennungen**

„For many applications such as DNA separation, capillary electrophoresis (CE) is superior over classical slab gel electrophoresis”

Christoph Heller, 1999

Elektrophorese nennt man die Wanderung von geladenen Teilchen in Lösung im elektrischen Feld. Die Ladung der Ionen gibt dabei die Richtung an, die unterschiedliche Geschwindigkeit resultiert aus Anzahl vorhandener Ladung und der unterschiedlich hohen Reibungswiderstand aufgrund verschiedener Größe bei gleicher effektiver Ladung.

Die ersten Ionenwanderungen wurden durch Kohlrausch 1897 untersucht, der auch die physikalischen Gesetzmäßigkeiten dafür beschrieb. Der Begriff Elektrophorese wurde nach den Arbeiten von Kohlrausch ziemlich schnell geprägt. Die Einführung als analytische Methode gelang allerdings erst, als eine effektive Ableitung der entstehenden Jouleschen Wärme möglich war. Die Wärmeableitung gelang durch Verwendung von stabilisierenden Gelen, die auf Glasplatten gegossen wurden (Gelelektrophorese/Flachbettgelelektrophorese) oder mit Papierstreifen, die mit Puffer getränkt wurden.

1930 hat Tiselius, ein schwedischer Chemiker, die Elektrophorese zur Trennung von Serumproteinen<sup>[1]</sup> etabliert und seither entwickelte sie sich zur verbreitetsten analytischen Methode in der Biochemie. Später wurde Tiselius für seine Arbeiten mit dem Nobelpreis ausgezeichnet.

Die feste Gelmatrix wirkt antikonvektiv, reduziert die Diffusion und Konvektion der Analyten, so dass die einzelnen Analytenzonen als scharfe Banden zu erkennen sind. Die in den meisten biologischen Laboren etablierte Flachbettgelelektrophorese zur Trennung von Peptiden, Proteinen oder Polynukleotiden bis zu  $10^5$  Dalton und mehr hat jedoch

---

einige Nachteile. Die reproduzierbare Herstellung und die Handhabung der gegossenen Gele ist schwierig. Die Joulesche Erwärmung wächst quadratisch mit der Spannung über die Trennstrecke an, so dass eine effektive Kühlung unerlässlich ist, damit die Gele während der Analyse nicht austrocknen. Kleinere Feldstärken führen zu langen Analysenzeiten. Den gravierensten Nachteil der Elektrophorese stellt aber die Auswertung dar. Die Proben können nicht direkt analysiert werden, es muß immer ein interner Standard eingesetzt werden. Zusätzlich müssen die erhaltenen Banden durch verschiedene Färbemethoden erst visualisiert werden, die eine Auswertung der Ergebnisse ermöglichen.

Um diese Probleme zu beseitigen, wurde schon bald nach Alternativen gesucht. Da in dünnen Röhren, bedingt durch den kleinen Innendurchmesser, die Konvektionsströme relativ gering sind, wurde versucht, Elektrophorese in solche zu übertragen. Die erste Trennung in einer offenen Röhre wurde durch Hjerten 1967 beschrieben, der die Stabilisierung der Lösung durch Rotation der Röhre erreichte<sup>[2]</sup>. In der folgenden Dekade wurden von Virtanen und Mikkers et al. elektrophoretische Experimente in Teflon- und Glaskapillaren mit einem Innendurchmesser von 200 µm durchgeführt<sup>[3]</sup>. Durch Verwendung unempfindlicher Detektoren und zu großer Injektionsvolumina, gelang es zunächst nicht die hohen Trenneffizienzen zu erreichen, die theoretisch berechnet wurden, so dass das Interesse an dieser Technik genannt Kapillarelektrophorese nicht sehr groß war.

Der eigentliche Durchbruch dieser Technik, begann Anfang der 80er Jahre. 1981, 1983 etablierten Jorgeson und Lukacs<sup>[4]</sup> die, auch heute noch übliche, instrumentelle Anordnung der Kapillarelektrophorese. Wichtigster Fortschritt war vor allem die geringe Probenmenge, was diese Methode für die Biotechnologie, klinische, diagnostische und forensische Anwendungen sehr interessant machte. Vorteile bieten außerdem die leichte Handhabung, die hohe Auflösung und Geschwindigkeit, die online-Detektion und die Automatisierung.

Die wichtigsten Bausteine einer Kapillarelektrophoreseeinheit sind eine Hochspannungsquelle, eine Kapillare, die durch ein Detektorsystem führt, zwei inerte Elektroden, meist aus Platin, zwei Puffergefäße und eine Datenstation, meist ein PC. Vor einer Trennung wird die Kapillare mit Puffer gespült, dann die Probe aufgetragen und Spannung angelegt. Die angelegte Spannung bewirkt eine unterschiedliche elektrophoretische und elektroosmotische Bewegung der Ionen in der Probe. In

Abhängigkeit von ihrem Ladungs-Masse-Quotienten erfolgt die Wanderung mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten zum Detektor. Die erhaltene Aufnahme der Absorption gegen die Zeit nennt man Elektropherogramm. Abbildung 1 zeigt eine schematische Darstellung einer Kapillarelektrophoreseeinheit.

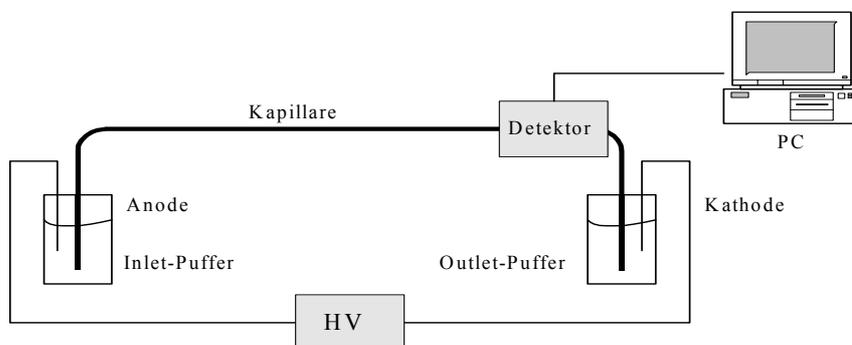


Abbildung 1: Schematischer Aufbau einer Kapillarelektrophorese (HV Hochspannungsversorgung) nach<sup>[5]</sup>

## Theorie elektrophoretischer Trennungen in den Kapillaren

Elektrophorese allgemein beruht auf der unterschiedlichen Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld. Die beschleunigende Kraft, die ein geladenes Teilchen in Richtung der entsprechenden Elektrode treibt, wird durch folgende Gleichung festgelegt:

$$F = z \cdot e_0 \cdot E \quad \text{Gleichung 1}$$

$z$ : Anzahl der Ladungen,  $e_0$ : elektrische Elementarladung,  $E$ : elektrische Feldstärke

Dieser Kraft steht die entgegengesetzt wirkende Reibungskraft gegenüber, die für kleine, kugelförmige Teilchen nach dem Stokesschen Gesetz durch folgende Gleichung charakterisiert wird:

$$F_R = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_A \cdot v_{ep} = f \cdot v_{ep} \quad \text{Gleichung 2}$$

$\eta$ : Viskosität;  $r_A$ : Radius des Analyten;  $v_{ep}$ : Geschwindigkeit des Analyten;  $f$ : Reibungskoeffizient

Die Wanderungsgeschwindigkeit ist durch das Verhältnis zwischen elektrischer Beschleunigung und der Reibung gegeben:

$$v_{ep} = \frac{z \cdot e_0}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_A} \cdot E \quad \text{Gleichung 3}$$

$z$ : Anzahl der Ladungen,  $e_0$ : elektrische Elementarladung,  $E$ : elektrische Feldstärke,  $\eta$ : Viskosität;  $r_A$ : Radius des Analyten

Aus dieser Gleichung folgt, dass die Wanderungsgeschwindigkeit  $v_{ep}$  proportional zur Feldstärke ist. Die Proportionalitätskonstante wird als elektrophoretische Mobilität  $\mu_{ep}$  bezeichnet:

$$v_{ep} = \mu_{ep} \cdot E \quad \text{Gleichung 4}$$

$E$ : elektrische Feldstärke

Der Vergleich der Gleichungen 3 und 4 ergibt für die elektrophoretische Mobilität:

$$\mu_{ep} = \frac{z \cdot e_0}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r_A} \quad \text{Gleichung 5}$$

$z$ : Anzahl der Ladungen,  $e_0$ : elektrische Elementarladung,  $\eta$ : Viskosität;  $r_A$ : Radius des Analyten

Die elektrophoretische Mobilität hängt somit von Ladung und Radius des Ions ab und von der Viskosität des Puffermediums. Diese Beziehungen gelten jedoch nur für kugelförmige Moleküle in unendlich verdünnter Lösung.

Zur analytischen Auswertung eines Elektropherogramms werden weitere Parameter benötigt. Die Zeit, die ein Analyt zur Erreichen des Detektors benötigt, wird als Migrationszeit bezeichnet:

$$t_M = \frac{l}{v_{ep}} \quad \text{Gleichung 6}$$

$l$ : Kapillarlänge bis Detektorfenster;  $v_{ep}$  Wanderungsgeschwindigkeit

Daraus ergibt sich für die Wanderungsgeschwindigkeit  $v_{ep}$  folgende Gleichung:

$$v_{ep} = \frac{l}{t_M} \quad \text{Gleichung 7}$$

$l$ : Kapillarlänge bis Detektorfenster;  $t_M$ : Migrationszeit

Die angelegte Feldstärke ist der Quotient aus Spannung und Gesamtkapillarlänge  $L$ :

$$E = \frac{U}{L} \quad \text{Gleichung 8}$$

$U$ : Spannung;  $L$ : Gesamtlänge Kapillare

Die Gleichungen 6 und 7 ergeben für die elektrophoretische Mobilität:

$$\mu = \frac{l \cdot L}{t_M \cdot U} \quad \text{Gleichung 9}$$

$l$ : Kapillarlänge bis Detektorfenster;  $L$ : Gesamtlänge Kapillare;  $t_M$ : Migrationszeit;  $U$ : Spannung

Hieraus folgt, dass je höher die angelegte Spannung ist, um so größer die Mobilität der Teilchen und um so weniger Zeit wird für die Elektrophorese benötigt. Allerdings steigt auch die Stromstärke nach dem Ohmschen Gesetz direkt proportional zur Spannung an:

$$I = \frac{U}{R} \quad \text{Gleichung 10}$$

$U$ : Spannung;  $R$ : elektrische Widerstand

Wenn der Strom keine mechanische oder chemische Arbeit leistet, wird über die Zeit die von der Stromquelle aufgenommene Energie als Wärme abgegeben:

$$W = U \cdot I \cdot t \quad \text{Gleichung 11}$$

$U$ : Spannung;  $I$ : Stromstärke;  $t$ : Zeit

Diese Wärme muss abgeführt werden, was selbst bei aktiver Kühlung nur in begrenztem Maße möglich ist. Generell gilt deshalb, dass die Wärmeabführung der limitierende Faktor für die schnelle Durchführung der Elektrophorese ist, da eine zu starke Erwärmung zu einer ungleichmäßigen Trennung mit geringer Trennschärfe führt.

Erheblich größere Bedeutung, im Vergleich zu anderen elektrophoretischen Verfahren, haben in der Kapillarelektrophorese die Grenzphänomene, die besonders in dünnen Schichten einen enormen Einfluss auf die Trennung haben. Die üblich eingesetzten Trennkapillaren in der Kapillarelektrophorese sind aus amorphem Siliciumdioxid auch „fused silica“, üblicherweise nicht ganz korrekt als Quarzglas bezeichnet. Bei höheren pH-Werten liegen die freien Silanol-Gruppen von unbeschichteten Kapillaren teilweise dissoziiert vor, so dass die Kapillarwand negativ geladen ist. Diese negativen Ladungen werden durch Kationen aus dem Puffer ausgeglichen. Diese Doppelschicht setzt sich auch einer starren und einer diffusen Schicht zusammen. In der ersten Schicht

(Helmholz-Schicht) sind die Kationen weitgehend immobil, in der anschließenden Debye-Hückel-Schicht dagegen beweglich. Der Potentialabfall in der starren Schicht ist linear, in der diffusen Schicht, jenseits von 10 nm, fällt das Zetapotential (Potential in der Scherebene) exponentiell ab.

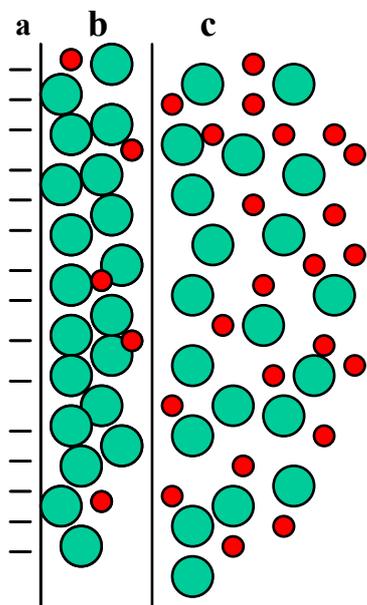


Abbildung 2: Ladungsverteilung an der Kapillaroberfläche; a: Kapillaroberfläche; b: starre Schicht (Helmholz-Schicht); c: diffuse Grenzschicht (Debye-Hückel-Schicht); ● Kationen; ● Anionen

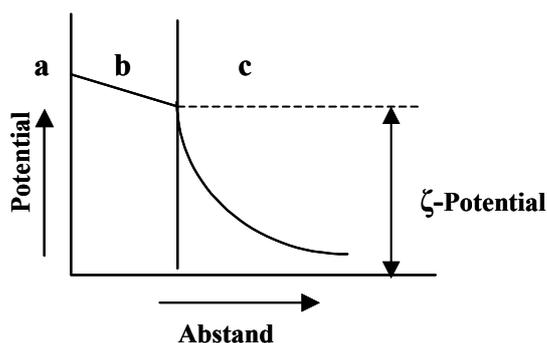


Abbildung 3: Verlauf des Zeta-Potentials

Bei angelegter Spannung wandern die beweglichen positiven Gegenionen zur Kathode und ziehen durch ihre Solvathüllen die gesamte Pufferlösung im Inneren der Kapillare mit. Dieser Fluss Richtung Kathode wird als elektroosmotischer Fluss EOF bezeichnet:

$$v_{eo} = \varepsilon \cdot \zeta \cdot \frac{E}{\eta}$$

Gleichung 12

$\varepsilon$ : Dielektrizitätskonstante;  $\zeta$ : Zeta-Potential

Das Flussprofil des EOF ist ein extrem flaches, stempelförmiges Profil, die Geschwindigkeit ist über den gesamten Querschnitt der Kapillare konstant, so dass die Peakverbreiterung wesentlich geringer ist, als bei einer parabolischen Strömung erzeugt durch Druck z.B. in der HPLC.

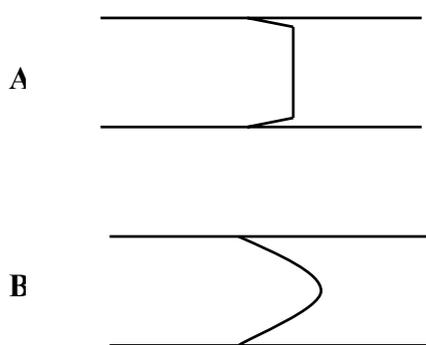


Abbildung 4: Strömungsprofil durch EOF A und durch Druck B

Der EOF kann experimentell einfach bestimmt werden, indem man eine ungeladene Substanz injiziert und die Zeitdauer misst, bis die Substanz am Detektor detektiert werden kann.

Der EOF wird weiterhin durch die Ionenstärke des Puffers beeinflusst, je höher die Ionenstärke, desto steiler der Potentialabfall zwischen starrer und diffuser Schicht, desto geringer ist die Schichtdicke der Doppelschicht, desto niedriger der EOF.

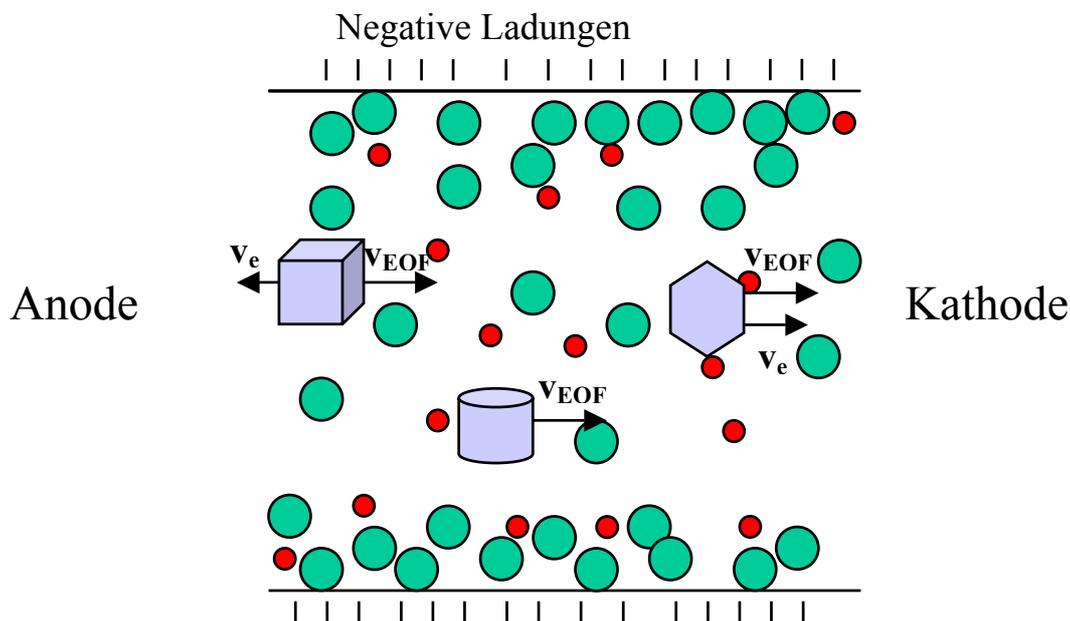
Der EOF ist stark pH abhängig, hoch bei alkalischen, niedrig bei sauren pH Werten.

Allgemein gilt, dass die Geschwindigkeit, mit der sich ein Teilchen in der Kapillare bewegt, die Summe aus der Geschwindigkeit des EOF und seiner Migrationsgeschwindigkeit ist:

$$v = v_{EOF} + v_{ep}$$

Gleichung 13

$v_{ep}$  Wanderungsgeschwindigkeit eines Analyten;  $v_{EOF}$  Geschwindigkeit des EOFs



■ negativ geladener Analyt; ⬡ positiv geladener Analyt; ▭ neutraler Analyt; ● Kationen; ● Anionen

Abbildung 5: Wanderungsrichtung von verschiedenen geladenen Analyten

Ist die Geschwindigkeit des EOFs größer als die Geschwindigkeit eines Analyten im elektrischen Feld ( $v_{EOF} \geq v_{ep}$ ), wandern auch negativ geladene Teilchen zur Kathode, d.h. dass bei stark alkalischem pH der EOF so hoch ist, dass neben Kationen auch Neutalmoleküle und Anionen kathodenseitig detektiert werden.

Durch chemische Modifikationen der Kapillaroberfläche kann der EOF kontrolliert, ausgeschaltet oder umgekehrt werden. Durch Modifikationen lassen sich Wechselwirkungen der Probebestandteile mit der Wand unterdrücken, die immer zu einer Verschlechterung der Trenneffizienz führen.

Der Zusatz von z. B. langkettigen kationischen Detergenzien „chemical modifier“ führt zu einem Umkehr des EOF. Somit kann man schnelle und langsam wandernde Anionen in einem Lauf trennen.

Jeder Zusatz organischer Komponenten zum Puffer beeinflusst den EOF, z.B. führt ein Zusatz von 20% Acetonitril zu einer Erhöhung des EOFs um ca. 15% während Isopropanol

eine drastische Verkleinerung bewirkt. Leider gibt es kein einheitliches Verhalten des EOFs bei Zusatz von organischen Lösungsmittel zum Puffer, der Einfluss muss individuell ermittelt werden<sup>[6]</sup>.

## **Apparatur**

Seit 1988 sind kommerziell erwerbbar Kapillarelektrophoresen erhältlich. Trotz der hohen Zahl der Anbieter unterscheiden sich die Geräte nicht stark in ihren Grundbausteinen, eher in deren Ausstattung, da das Trennsystem relativ einfach ist. Wie bereits erwähnt sind die wichtigsten Bausteine einer Kapillarelektrophoreseeinheit eine Hochspannungsquelle, eine Kapillare, die durch ein Detektorsystem führt, zwei inerte Elektroden, meist aus Platin, zwei Puffergefäße und eine Datenstation, meist ein PC.

## **Spannungsquelle**

Um die hohe Feldstärke zu liefern, die diese Technik benötigt, ist eine bis zu 30 kV regelbare Gleichspannungsquelle erforderlich. Sie sollte bei konstanter Spannung aber auch bei konstanter Stromstärke betrieben werden können. Die Polarität sollte wählbar sein, da man je nach Detektionsart, kathodenseitig oder anodenseitig detektiert werden muss. Je nach Anbieter geschieht dies manuell oder durch die elektronische Steuerung. Über abgeschirmte Kabel wird die Hochspannung an die Platinelektroden geleitet.

## **Kapillaren**

In den meisten Fällen werden Kapillaren, die aus amorphem Siliciumdioxid gezogen werden, verwendet. Theoretisch können auch Kapillaren aus Glas oder Kunststoff verwendet werden, diese besitzen aber im kurzwelligen UV-Bereich keine ausreichende Durchlässigkeit. Da die Quarzkapillaren extrem brüchig sind, werden sie mit einer 10µm dicken Polyimidschicht überzogen. Da diese Schicht nicht UV-transparent ist muss sie für die online Detektion entfernt werden. Dieses kann mechanisch oder durch Ätzen mit Säuren geschehen. In der Regel werden Kapillaren als Meterware gekauft und je nach Bedarf in die Kapillarkassetten eingebaut. Die Fixierung der Kapillare garantiert zum einen den richtigen Sitz im Detektorfenster und zum anderen wird die entstandene Wärme sehr effektiv abgeleitet. Einige Geräte verwenden hierfür fluorierte Kohlenwasserstoffe, andere Wasser oder Luft. Wichtig ist, dass die Enden planar geschnitten sind, um eine einwandfreie Injektion zu gewährleisten.

Da die Qualität von Kapillaren unterschiedlicher Hersteller auch im Hydroxylierungsgrad sehr schwanken kann, sollten vor dem ersten Gebrauch unbehandelte Kapillaren durch Spülen mit Natronlauge und Salzsäure auf einen einheitlichen Hydroxylierungsgrad der Oberfläche gebracht werden<sup>[6]</sup>.

Volumenberechnung von Kapillaren:

$$V = \frac{\pi \cdot L \cdot d^2}{4} \quad \text{Gleichung 14}$$

$L$ : Gesamtlänge Kapillare;  $d$ : Durchmesser Kapillare

Je dünner die Kapillaren sind, desto leichter erfolgt der Wärmeabtransport, da das Verhältnis zwischen Volumen und Oberfläche kleiner wird. Dadurch kann man höhere Spannungen anlegen, um die Trennung zu beschleunigen. Allerdings sollte man bedenken, dass Kapillaren mit kleinem Innendurchmesser wesentlich längere Zeiten zum Spülen oder zum Pufferaustausch benötigen.

Innendurchmesser [ $\mu\text{m}$ ]	Kapillarvolumen (1m Länge)	Oberfläche pro Meter	Verhältnis Oberfläche/Volumen	Zeit zum Spülen mit dem 5-fachen des Kapillarvolumens
100	7,9 $\mu\text{l}$	314 $\text{mm}^2$	40 $\mu\text{m}^{-1}$	2 min 34 s
75	4,4 $\mu\text{l}$	236 $\text{mm}^2$	54 $\mu\text{m}^{-1}$	4 min 33 s
50	2,0 $\mu\text{l}$	157 $\text{mm}^2$	79 $\mu\text{m}^{-1}$	10 min 14 s

Tabelle 1: Kenngrößen von Kapillaren<sup>[6]</sup>

Modifizierte Oberflächen in den Kapillaren dienen dazu, den EOF zu beeinflussen oder eine Adsorption von Probenmolekülen zu verhindern. Prinzipiell stehen hierfür zwei unterschiedliche Verfahren zur Verfügung. Einerseits kann die Kapillaroberfläche mehr oder weniger dauerhaft chemisch modifiziert werden, andererseits können im Sinne eines dynamischen Coatings dem Puffersystem verschiedene Substanzen zugesetzt werden. Die einfachste Möglichkeit besteht darin, dem Trennpuffer Substanzen zuzusetzen, die an Silanol-Gruppen adsorbieren. Eine gute Übersicht über die Variabilität der zugesetzten Substanzen erhält man aus den Übersichtsartikel von Chiari et al<sup>[7]</sup>, Horvath et al<sup>[8]</sup> und Rigehtti et al<sup>[9]</sup>. Bei Verwendung von verschiedenen quartären Ammoniumverbindungen<sup>[10]</sup> kann so z. B. eine Umkehr des elektroosmotischen Flusses erreicht werden. Zur Trennung von Proteinen werden sehr oft Substanzen eingesetzt, die eine Absorption der verschiedenen basischen Proteinkomponenten an die Silanol-Gruppen

verhindern sollen. So gelingt unter Zusatz von Polyethylenglykol 8000 die CZE-Trennung der humanen Serumproteine in einer unbeschichteten Kapillare<sup>[11]</sup>. Auch zwitterionische Tenside verhindern die Adsorption von Proteinen an der Kapillarwand<sup>[12]</sup>. Auch der Zusatz von niedermolekularen Polyaminen, wie 1,2-Diaminopropan führt zu sehr hohen Trenneffizienzen, jedoch kommt es hier zu irreversiblen Bindungen des Polyamins an die Kapillarwand.

Bei der stationären Belegung der Kapillaroberfläche werden die Silanol-Gruppen des Quarzglas es entweder direkt oder über „Linker“-Moleküle chemisch modifiziert. Bei den Verfahren der traditionellen Silanchemie, wie sie unter anderem in der Gaschromatographie verwendet werden, werden teilderivatisierte Silane mittels einer Siloxanbindung an die Silanol-Gruppen des Quarzglas es gebunden. Die vorhandenen Seitenketten können dann in einem zweiten Schritt weiter derivatisiert werden. Nachteilig an diesem Verfahren ist die geringe Stabilität der Belegung bei pH-Werten über 8. Bei neueren Verfahren wird entweder eine sogenannte Linkergruppe über ein Silan eingeführt oder auf den Träger wird eine polymerisierbare Funktionalität (z. B. Polyethylenimin) aufgebracht und anschließend vernetzt<sup>[13]</sup>. Vorteilhaft ist die höhere pH-Stabilität, so können Kapillaren mit einem Polyacrylamidcoating bis zu pH-Werten von ca. 10 eingesetzt werden. Für eine Übersicht der wichtigsten Belegungsverfahren siehe Deyl et al.<sup>[14]</sup>. Da allerdings die Reproduzierbarkeit und die Charakterisierung der verschiedenen Belegungen äußerst schwierig ist, werden inzwischen verstärkt kommerziell erhältliche Kapillaren mit unterschiedlichen Belegungsarten eingesetzt. Angewendet werden sowohl klassische GC-Phasen, wie DB 1 oder DB 17, als auch speziell für die Kapillarelektrophorese entwickelte Amin- oder Neutralkapillaren.

## **Injektion**

Die Probenaufgabe stellt einen nicht unwesentlichen Aspekt in der Kapillarelektrophorese dar, denn je kleiner die Probenzone gehalten wird, desto geringer ist die Gefahr der Bandenverbreiterung. Bei einem Gesamtvolumen der Kapillare von einigen  $\mu\text{l}$  beträgt das Injektionsvolumen nur einige nl. Die reproduzierbare Injektion von diesen kleinsten Mengen ist eine wichtige Forderung für den Einsatz der CE in der Routine. Es existieren zwei unterschiedliche Injektionsarten. Am gebräuchlichsten ist die Druckinjektion. Hierbei erfolgt die Aufgabe der Probe durch Anlegen einer Druckdifferenz zwischen Probengefäß

und Kapillarende. Dieses geschieht durch Druckerhöhung am Probengefäß oder durch Druckverminderung am Kapillarende. Die aufgetragene Menge berechnet sich aus:

$$Q = \frac{\Delta p \cdot \pi \cdot r^4 \cdot t \cdot c}{8 \cdot \eta \cdot L} \quad \text{Gleichung 15}$$

$Q$ : aufgebrauchte Probenvolumen;  $\Delta p$ : Druckdifferenz;  $t$ : Injektionszeit;  $\eta$ : Viskosität,  $L$ : Länge der Kapillare;  $c$ : Konzentration der Probelösung;  $r$ : Radius

Ähnlich der Druckinjektion ist die Vakuuminjektion. Hier wird am Ende der Kapillare Vakuum angelegt, die Probe wird in die Kapillare durch den entstehenden Unterdruck eingesogen.

Eine weitere verbreitete Methode zur Probenaufgabe ist die elektrokinetische Injektion. Hier wird an das Probengefäß Spannung angelegt, wodurch die Ionen durch Eigenmobilität und EOF in die Kapillare wandern. Diese Methode wird auch als diskriminierende Methode bezeichnet, da geladene Moleküle, die mit dem EOF wandern, bevorzugt werden, während Moleküle mit einer Wanderungsgeschwindigkeit gegen den EOF diskriminiert werden. Die Auftragsmenge bei dieser Methode ist nicht so leicht zu errechnen und hängt von vielen Faktoren ab:

$$Q = \frac{[(\mu_{ep} + \mu_{EOF}) \cdot U \cdot \pi \cdot r^2 \cdot c \cdot t]}{L} \quad \text{Gleichung 16}$$

$Q$ : aufgebrauchte Probenvolumen;  $U$ : angelegte Spannung;  $t$ : Injektionszeit;  $\eta$ : Viskosität,  $L$ : Länge der Kapillare;  $c$ : Konzentration der Probelösung;  $\mu_{ep}$  Wanderungsgeschwindigkeit eines Analyten;  $\mu_{EOF}$  Geschwindigkeit des EOFs

Der Einfluss der Probenmatrix ist bei dieser Methode enorm, trotzdem wird diese Methode bei gelgefüllten Kapillaren eingesetzt, da eine Druckinjektion nicht stattfinden kann. Die Reproduzierbarkeit kann durch Einsatz eines internen Standards deutlich verbessert werden.

## Detektion

Von wesentlichem Interesse in der Kapillarelektrophorese ist die Detektion. Bedingt durch die kleinen Dimensionen der Kapillare und der Probenzonen, erfolgt die Detektion meist direkt in der Kapillare. Im Gegensatz zu der Chromatographie wandern die Proben mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das Detektorfenster, was bei der Auswertung über die Peakflächen zu berücksichtigen ist. Die am häufigsten eingesetzten Detektoren sind UV-Detektoren. Diese verfügen über feste oder variable Wellenlängen (Festwellendetektor, Diodenarray oder schnellscannender UV-Detektor). Da für die Detektion nur die Schichtdicke entsprechend dem Kapillarinne Durchmesser zur Verfügung steht, ist die Nachweisempfindlichkeit begrenzt. Laut dem Lambert-Beerschen-Gesetz ist die Absorption proportional der molaren Konzentration und der Schichtdicke:

$$A = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot b$$

Gleichung 17

$A$ =Absorption;  $\varepsilon(\lambda)$ =molarer Absorptionskoeffizient;  $c$ =molare Konzentration;  $b$ =Schichtdicke

Bei geringer molarer Konzentration des zu detektierenden Stoffes versucht man daher die Schichtdicke zu vergrößern. Der Einsatz von „bubble cells“<sup>[15]</sup> oder Z-Zellen<sup>[16]</sup> ermöglicht so eine deutliche Erhöhung der Empfindlichkeit. Die bubble cells werden durch Ätzen der Kapillare mit Flusssäure und punktueller Erwärmung an der Stelle des Fensters erzeugt. Die Empfindlichkeit wird um das drei bis vierfache erhöht. Die Z-Zellen bieten einen längeren Lichtweg, durch Formung der Kapillare zu einem Z, problematisch ist dabei das zusätzlich auftretende Streulicht an den Knicken der Kapillare. Die Empfindlichkeit steigt bei den Z-Zellen bis zum 10-fachen an. Leider bringt die Erhöhung der Empfindlichkeit in vergrößerten Messzellen eine Verminderung der Trenneffizienz mit sich.

Proben ohne UV-Absorption lassen sich mittels indirekter UV-Detektion erfassen. Man gibt in den Laufpuffer ein Elektrolyt mit hoher UV-Absorption, und ähnlicher Mobilität wie der Analyt, wie aromatische Carbonsäuren oder Chromationen. Es wird der Einbruch der UV-Absorption des Hintergrundelektrolyten gemessen, wenn die Probe durch das Detektorfenster wandert. Der negative Peak kann direkt ausgewertet werden oder auch mit entsprechender Software in ein positives Signal umgewandelt werden.

Die Detektion mit LIF-Detektoren (Laser Induced Fluorescence) stellt zur Zeit die empfindlichste Online-Detektion dar. Zur Verfügung stehen Laser mit einer festen

---

Emissionswellenlänge und hoher Energie oder mittels einer Deuterium- oder gepulsten Xenonlampe betriebene Fluoreszenzdetektoren. Diese bieten zwar freie Wahl der Wellenlänge, aber leider mit geringerer Energie. Da sehr wenige Substanzen selbst fluoreszieren, kommen eine Reihe von Derivatisierungsreagenzien zum Einsatz, die eine LIF-Detektion ermöglichen. Zum Beispiel wird Fluoresceinisothiocyanat (FITC) zur Detektion von DNA und Proteinen unter Verwendung eines Argon-Ionen-Lasers mit der Emissionswellenlänge von 488 nm verwendet. Für den kommerziell erwerbbaaren Helium-Cadmium-Laser mit der Emissionswellenlänge von 325 nm eignet sich Dansylchlorid (Dns-Cl) zur Detektion von Aminosäuren und 8-Aminonaphthalin-1,3,6-trisulfonsäure (ANTS) zum Nachweis von Oligosacchariden<sup>[17]</sup>. Indirekte Fluoreszenzdetektion ist auch möglich. Geeignete Hintergrundelektrolyte sind 9-Aminoacridin zur Trennung von Alkaliionen (Anregungswellenlänge 247 nm, Emissionswellenlänge 440 nm)<sup>[6]</sup>, Natriumsalicylat (Anregungswellenlänge 229 nm, Emissionswellenlänge 415 nm) für Anionen u.a., wobei die eingesetzte Konzentration nicht zu hoch gewählt werden darf, da auftretende Quenching-Effekte die Nachweisempfindlichkeit stören.

Für eine gute Übersicht über weitere, nicht so verbreitete Detektionsmöglichkeiten in der Kapillarelektrophorese siehe Swinney et al<sup>[18]</sup>.

## **Kapillarelektrophoretische Verfahren**

### **Kapillarzonenelektrophorese CZE**

Die CZE ist die einfachste Kapillarelektrophorese-Technik. Sie ermöglicht die Trennung von kleinen anorganischen Ionen als auch von großen geladenen organischen Molekülen. Insbesondere ist sie für die Trennung von Peptiden und Proteinen interessant.

Charakteristisch für die CZE ist, dass die Trennung in Kapillaren, die nur mit Puffer gefüllt sind, bei hoher Spannung stattfindet. Die Analyte trennen sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe und Ladung in verschiedene Zonen auf, die getrennt durch Pufferzonen unterschiedlich schnell Richtung Detektor wandern. Der Puffer hält den pH-Wert stabil und ermöglicht den Stromfluss, kann aber auch die effektive Ladung der Analyte und somit ihre Wanderungsgeschwindigkeit beeinflussen. In der CZE können nur geladene Teilchen getrennt werden, neutrale wandern mit dem EOF. Anionen werden nur erfasst, wenn der EOF größer ist als ihre Eigenmobilität. Voraussetzung für eine gute Trennung ist eine unterschiedliche Mobilität der zu trennenden Teilchen und eine möglichst geringe Interaktion der Probenmoleküle mit der Kapillarwand. Verschiedene Pufferadditive können die Trennleistung der CZE verbessern. Sie beeinflussen die Migrationsgeschwindigkeit von Probemolekülen z.B. bilden Borat-Ionen mit vicinalen cis-Diolgruppen von Zucker negativ geladene Komplexe, die dann elektrophoretisch getrennt werden können<sup>[5]</sup>. Andere Pufferadditive verhindern die Adsorption von Probemolekülen an die Kapillarwand z.B. kationische Detergentien, die eine Umkehr der Oberfläche bewirken und somit den EOF umkehren. Positiv geladene Probenionen können getrennt werden, da sie nicht mehr mit der Kapillarwand wechselwirken.

In neuerer Zeit werden immer häufiger käuflich erwerbbar modifizierte Kapillaren verwendet, bei diesen stehen die freien Silanol-Gruppen nicht mehr für Interaktionen zur Verfügung.

### **Micellarelektrokinetische Chromatographie MEKC**

Die MEKC wurde durch Terabe et al. eingeführt und wird hauptsächlich zur Trennung von neutralen Substanzen verwendet. Diese Methode ist eine Kombination aus Elektrophorese und Chromatographie. Der Elektrophoresepuffer ist die mobile Phase, während die Micellen eine pseudostationäre Phase darstellen. Diese bestehen aus geladenen Tensiden,

die in dem Puffer in einer Konzentration über der kritischen micellaren Konzentration gelöst werden. Natriumdodecylsulfat SDS wird am häufigsten verwendet, es bildet negativ geladene Micellen, die unter Einfluss des EOF trotzdem langsam zur Kathode wandern. Die Trennung in der MEKC beruht auf unterschiedlich starker Wechselwirkung verschiedener Analyten mit den Micellen. Je nach Stärke dieser Wechselwirkungen wird die Migrationsgeschwindigkeit einzelner Probesteilchen Richtung Detektor mehr oder weniger retardiert. MEKC wird mit verschiedenen Detergentien durchgeführt, anionischen z.B. SDS oder verschiedenen Gallensäurederivaten, kationischen quartären Ammoniumverbindungen z.B. Cetyltrimethylammoniumbromid und nichtionische, wie Triton-X-100. Der Zusatz weiterer Additiven wie organische Lösungsmittel, Harnstoff oder anorganische Salze ist möglich und dient der Beeinflussung des EOF oder der Verteilung.

## Chirale Kapillarelektrophorese

Besondere Bedeutung hat die chirale CE in der Analytik pharmazeutischer Wirkstoffe<sup>[19]</sup>. Enantiomere haben die gleichen physikalische-chemischen Eigenschaften. Eine Trennung ist nur in einer chiralen Umgebung möglich. In der Kapillarelektrophorese wird diese Umgebung durch Zugabe einer optisch aktiven Substanz in den Puffer erzeugt. Als chirale Selektoren werden verschiedene Stoffe benutzt, die wichtigsten sind Cyclodextrine<sup>[20]</sup>, aber auch Salze der Gallensäure, Kronenether, Proteine, Antibiotika<sup>[21]</sup> u.v.a kommen zum Einsatz. Die Trennung beruht auf unterschiedlichen Interaktionen der chiralen Selektoren mit den einzelnen Enantiomeren eines Paares. Dies führt zu einer unterschiedlichen Migrationsgeschwindigkeit der Enantiomeren. Da die meisten Selektoren wasserlöslich sind und einfach dem Laufpuffer zugesetzt werden können, ist die Suche nach dem enantioselektivsten Zusatz relativ einfach. Universell einsetzbare chirale Selektoren stehen nicht zur Verfügung, somit muss für jedes Trennproblem der geeignete Selektor gefunden werden.

Cyclodextrine (CD) sind cyclische Oligosaccharide mit einer hydrophilen Außenseite und einer hydrophoben Kavität. Sechs, sieben bzw. acht Glukoseeinheiten bilden bei  $\alpha$ ,  $\beta$  bzw.  $\gamma$  Cyclodextrinen eine Einheit. Im CZE-Verfahren bildet ein Enantiomer einen Inklusionskomplex mit einem neutralen CD, dieser Komplex wandert langsamer Richtung Detektor als das freie Enantiomer. Bei dem CZE-Verfahren werden nur geladene Analyten getrennt, hier spielt also der pH-Wert eine große Rolle und kann die Trennung deutlich

beeinflussen. Durch Modifikation neutraler CD kann die Wasserlöslichkeit verbessert werden, aber auch die Enantioselektivität. Durch die Einführung von ionischen Gruppen an den Cyclodextrinring können auch neutrale Analyten getrennt werden. Durch die Ladung erhält das Cyclodextrin eine eigene Mobilität und kann so den neutralen Analyten Richtung Detektor bewegen.

Durch Zusatz von micellbildenden Komponenten kann man die Enantiomerentrennung verbessern, wobei entweder zusätzlich SDS oder Gallensäuren dem Laufpuffer zugesetzt werden können.

Eine ausführliche Übersicht über die gängigen Verfahren zur Enantiomerentrennungen sind in der Literatur gegeben so z.B. im Sonderband Journal of Chromatography A, aus dem Jahr 2000.

### **Kapillargelelektrophorese CGE**

Die Kapillargelelektrophorese ist eine Sonderform der CZE. Hier werden die Analyten aufgrund ihres unterschiedlichen Masse/Ladungsverhältnisses getrennt. Biopolymere wie DNA oder SDS-denaturierte Proteine besitzen auch bei unterschiedlichen Größen sehr ähnliche Ladungs-Masse-Verhältnisse. Dadurch ist eine Trennung im normalen elektrischen Feld ohne Hilfsmittel nicht möglich. In Anlehnung an die weit verbreitete Flachbettgelelektrophorese werden Gele als Hilfsmittel eingesetzt, die eine Trennung nach Größe ermöglichen. Proteine können nach ihrer Größe nur dann getrennt werden, wenn sie vorher mit SDS behandelt und die vorhandenen Disulfidbrücken mit 2-Mercaptoethanol gesprengt wurden. Statistisch lagert sich 1,4 g SDS an 1 g Protein an, so dass alle behandelten Proteine das gleiche Ladungs-Masse-Verhältnis aufweisen. Das Gel ermöglicht die Auftrennung nach Größe bzw. Molekulargewicht. Da der Logarithmus des Molekulargewichts mit der Migration linear zusammenhängt, kann man das Molekulargewicht unbekannter Proteine graphisch ermitteln.

### **Isoelektrische Fokussierung IEF**

Die IEF wird vorwiegend für zwitterionische und amphotere Proben wie Proteine und Peptide eingesetzt, die sich in ihren isoelektrischen Punkten unterscheiden. Der isoelektrische Punkt (pI-Wert) ist eine spezifische Größe amphoterer Substanzen und gibt an, bei welchem pH-Wert die amphotere Substanz elektrisch neutral ist und im elektrischen Feld nicht mehr wandert. Überlagert man einem elektrischen Feld einen

---

pH-Gradienten, werden amphotere Analyten entsprechend ihrem isoelektrischen Punkten in der Kapillare getrennt und fokussiert<sup>[22]</sup>. Da die Kapillare selbst als antikonvektives Medium dient, benötigt man keine speziellen Zusätze. Nachteilig ist die anschließend notwendige Mobilisierung um eine Detektion zu ermöglichen. Die Mobilisierung kann durch Druck oder Pufferwechsel erfolgen. Bei der IEF ist der EOF in der Regel ausgeschaltet, aber es wurde gezeigt, dass bei Vorhandensein des EOF eine gleichzeitige Fokussierung und Mobilisierung stattfinden kann<sup>[23]</sup>.

### **Isotachophorese ITP**

In der Isotachophorese wandert die zu trennende Probe zwischen zwei Elektrolyten unterschiedlicher Mobilität<sup>[6]</sup>. Dabei hat der Leitelektrolyt die größte und der Folgeelektrolyt die geringste elektrophoretische Mobilität. Die Probemoleküle verteilen sich in Banden gleicher Geschwindigkeit, die schnell Richtung Detektor wandern. Anders als bei den anderen kapillarelektrophoretischen Verfahren sind diese Zonen unterschiedlicher Mobilität nicht durch Puffer getrennt.

Anwendung findet diese Methode unter anderem zur Aufkonzentrierung verdünnter Proben in der Kapillarelektrophorese<sup>[24]</sup>.

### **Elektrochromatographie CEC**

Diese Methode ist eine Mischung aus HPLC und Kapillarelektrophorese. Die Trennung erfolgt in gepackten Säulen, die mit porösen Kieselgelteilchen gefüllt sind, z.B. C18 Material<sup>[25]</sup> durch Wechselwirkungen der Analyten mit der stationären Phase. Der elektroosmotische Fluss wird als „elektrische Pumpe“ zum Transport von Analyten Richtung Detektor genutzt. Durch sein stempelförmiges Flussprofil werden die Trennschärfe der Kapillarelektrophorese mit der hohen Selektivität der HPLC-Phasen optimal kombiniert. Gepackte Kapillaren mit chiralen stationären Phasen erlauben eine Enantiomerentrennung im CEC-Verfahren. Einen guten Überblick gibt der Review-Artikel von Altria<sup>[26]</sup>.

## Nukleinsäuren

### Natürliche Nukleinsäuren

Nukleotide sind für Lebensvorgänge in allen bekannten Organismen von enormer Bedeutung. Als energiereiche Nucleosidtriphosphate sind Mononukleotide an zellulären Energietransformationen beteiligt. Als Nukleinsäuren, Polymere von Mononukleotiden, dienen sie in Form von DNA als universeller Träger genetischer Information und nehmen als verschiedene RNA-Typen bei der DNA-Transkription und an der anschließenden Proteinbiosynthese teil.

Der einfache Aufbau der Nukleinsäuren lässt auf den ersten Blick nicht auf die komplexe und wichtige Aufgabe schließen. Die Abfolge der lediglich vier verschiedenen Nucleotide bestimmt die Speicherung und Übertragung (Replikation und Transkription) sowie die Übersetzung (Translation) der genetischen Information.

### DNA

Die vier Nucleoside der DNA Desoxyadenin (dA), Desoxycytidin (dC), Desoxyguanin (dG) und Desoxythymidin (dT) sind an den 3'- und 5'-Hydroxylgruppen der Desoxyribose über eine Phosphordiesterbindung verknüpft. Durch Ausbildung spezifischer Wasserstoffbrückenbindungen entstehen die sogenannten Watson-Crick-Basenpaare, aus denen die DNA aufgebaut ist.

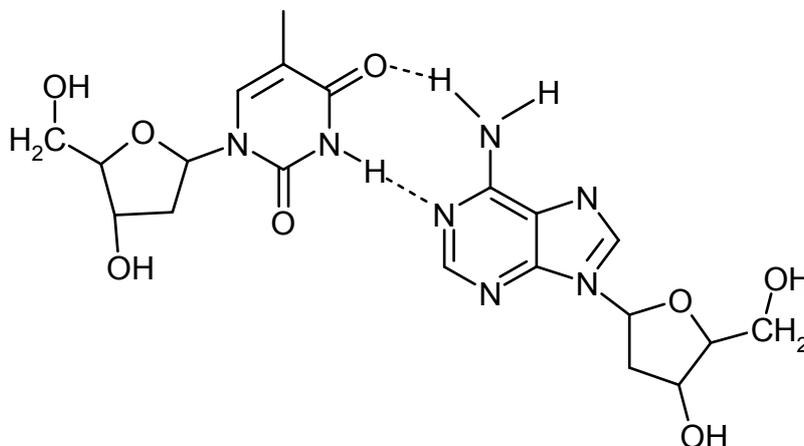


Abbildung 6: Desoxyadenosin - Desoxythymidin

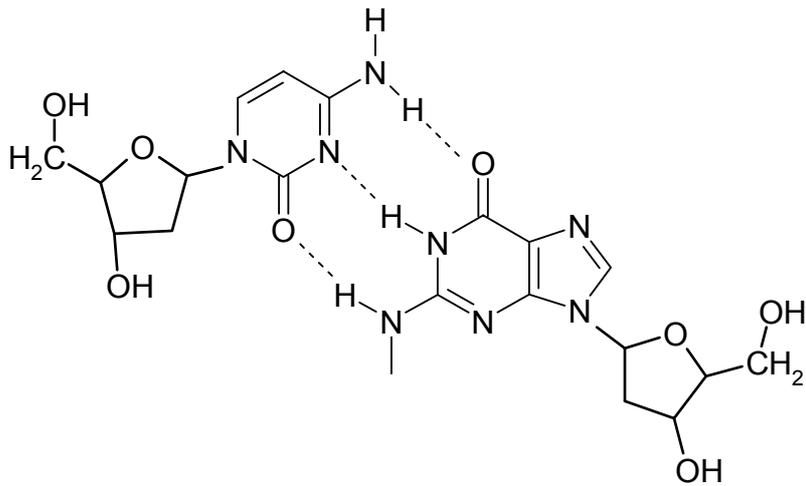


Abbildung 7: Desoxycytidin – Desoxyguanosin

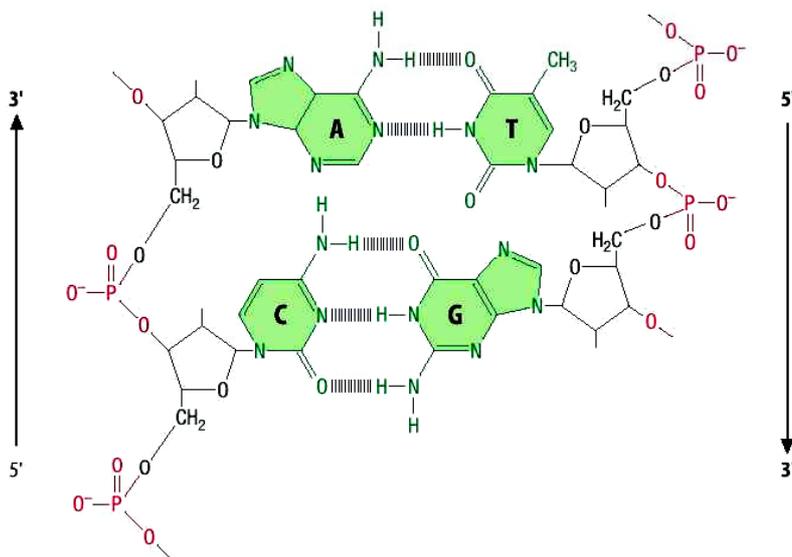


Abbildung 8: Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen zwei Polynukleotidsträngen

Aufgrund des konstanten Basenverhältnisses Adenin : Thymin bzw. Guanin : Cytosin von 1 : 1 ergibt sich die Anordnung eines DNA-Moleküls als Form eines Doppelstranges.

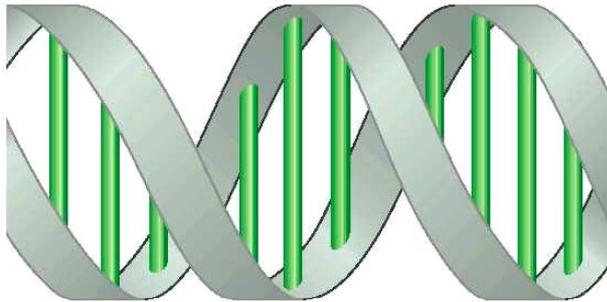


Abbildung 8: Struktur der DNA-Doppelhelix Typ B

Dieser Doppelstrang besteht aus zwei komplementären Polynukleotidsträngen, die gegenläufig um eine gemeinsame Achse gewunden sind. Die komplementären Basenpaare sind im Inneren dieser Helix übereinandergestapelt und bilden den Kern, wobei neben Wasserstoffbrückenbindungen auch  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen den Stickstoffbasen zur Stabilität beitragen. Das hydrophile Zucker-Phosphat-Gerüst bildet das „Rückgrat“ der DNA und liegt nach außen in wässriger Umgebung. Infolge der Phosphatgruppen sind Nucleinsäuren starke, mehrbasige Säuren, die bei pH-Werten über 4 vollständig dissoziiert vorliegen.

## RNA

Der Aufbau von Ribonucleinsäuren unterscheidet sich generell nicht von dem der DNA-Fragmenten. Als Zucker findet man bei RNA die Ribose und die vier vorkommenden Basen sind: Adenin, Cytosin, Guanin und Uridin, an Stelle von Thymin.

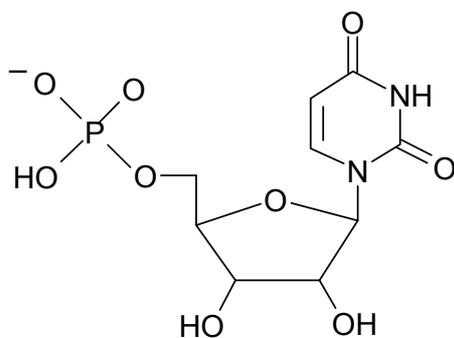


Abbildung 9: Uridin

Ribonukleinsäuren tragen in Zellen zur Transkription und Translation der genetischen Information bei. In der Regel sind sie Einzelstränge, neigen aber beim Vorkommen von komplementären Nukleotidfolgen auch zur Doppelstrangbildung.

### Synthetische Oligomere

Mittels DNA-Synthesizer kann man relativ leicht Oligonukleotide herstellen, die in der Molekularbiologie eine breite Verwendung finden. Die Synthese ist eine Abfolge von Entschützung, Aktivierung, Kopplung, Capping, und Oxidation. Die erhaltenen Oligomere werden mittels HPLC gereinigt und lyophilisiert. Hauptsächlich werden sie als Primer für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) eingesetzt, um einen Genabschnitt, der amplifiziert werden soll, zu definieren. Weitere Verwendungen von synthetische Oligomeren sind: Größenmarker, als Antisense Moleküle, als Markierungssonden für bestimmte Genabschnitte usw.

### Elektrophoretische Mobilität von Nukleinsäuren in polymeren Netzwerken

Homologe Polynukleotide haben unabhängig von ihrer Molekülgröße die gleiche Ladungsdichte, da jede hinzukommende Nukleotideinheit auch eine weitere Ladung enthält. Die elektrophoretische Mobilität von DNA-Molekülen in freier Lösung ist definiert durch:

$$\mu_{ep} = \frac{v_{ep}}{E} = \frac{q}{f} \quad \text{Gleichung 18}$$

$q$ : Ladung;  $f$ : Reibungskoeffizient;  $v_{ep}$  Wanderungsgeschwindigkeit;  $E$ : elektrische Feldstärke

Für freie Lösungen ergeben sich folgende Konsequenzen, zum Ersten ist der Beitrag eines jeden Basenpaares an der „Hemmung“ der Kette gleich; es gilt:

$$f \sim N \quad \text{Gleichung 19}$$

$N$ : Zahl der Basenpaare

Zum Zweiten ist die Nettoladung der DNA proportional der Zahl der Basenpaare  $N$ :

$$q \sim N \quad \text{Gleichung 20}$$

Daraus ergibt sich für DNA-Moleküle, unabhängig von ihrer Größe die gleiche elektrophoretische Mobilität:

$$\mu_{ep} = \frac{q}{f} \sim \frac{N}{N} = N^0$$

Gleichung 21

$q$ : Ladung;  $f$ : Reibungskoeffizient;  $N$ : Zahl der Basenpaare

Eine elektrophoretische Trennung nach Molekülgröße ist nur über unterschiedliche Reibungseffekte möglich. Diese, für die gröbenselektive Trennung wichtigen Reibungseffekte, können durch polymere Matrices verstärkt werden.

Diese Betrachtungen gelten auch für RNA oder Oligonukleotide unter denaturierenden Bedingungen<sup>[27]</sup>.

Zur Beschreibung der elektrophoretischen Migration eines Makromoleküls durch ein Gel gibt es mehrere Modelle, die die verschiedenen Konformationen eines DNA-Moleküls in der polymeren Matrix erklären.

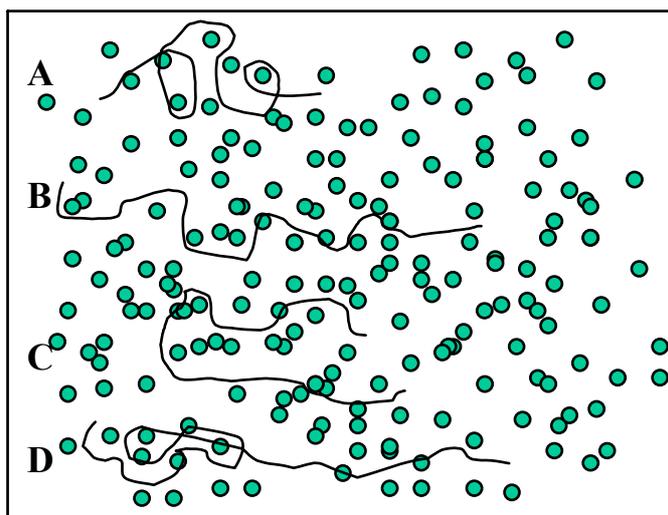


Abbildung 10: Konformation der wandernden Biopolymere; A: entspannte Form; B: gestreckte Form; C: U-Konformation; D: partiell gestreckte Form[6, 28]

## Ogston-Modell

Diese Theorie des molekularen Siebeffektes geht davon aus, dass das polymere Netzwerk Poren ausbildet, durch die der Analyt, als sphärischer, nicht deformierbarer Körper mit dem Radius  $R_g$  wandert. Die Wahrscheinlichkeit eine Pore mit entsprechender Größe zu finden ist für kleinere Analyten größer, also ist auch ihre Migrationsgeschwindigkeit größer.

Für die elektrophoretische Gesamtmobilität  $\mu_{ges}$  eines Analyten in diesem Modell gilt:

$$\mu_{ges} = \mu_0 + p(\beta > R_g) \quad \text{Gleichung 22}$$

$\mu_0$ : Mobilität in freier Lösung;  $p$ : Wahrscheinlichkeit, dass mittlere Porengröße  $\beta$  größer ist als der Radius des Analytes

Nach dieser Gleichung gilt, dass die elektrophoretische Mobilität gegen Null geht, wenn der Trägheitsradius  $R_g$  des Nukleotidknäuls größer ist als der mittlere Porenradius  $\beta$ . Experimentell wurden trotz dieser Voraussage auch Migrationen von Nukleinsäuren mit  $R_g \gg \beta$  beobachtet.

Zusammenfassend beschreibt das Ogston-Modell nur die Migration von kleineren DNA-Fragmenten in einem elektrischen Feld niedriger Stärke gut.

## Reptation-Modell

Um die beobachtete Wanderung größerer Fragmente durch ein polymers Netzwerk mit einer viel kleineren mittleren Porengröße zu erklären, entwickelten de Gennes, Doi und Edwards das Reptation-Modell.

Hier schlängelt sich die DNA „Kopf“ voran durch hypothetische Porenkanäle des Polymers und passt sich diesen durch Konformationsänderungen an. Die elektrophoretische Mobilität ist laut diesem Modell umgekehrt proportional zur Länge des DNA-Moleküls:

$$\mu \sim \frac{N}{N^2} = \frac{1}{N} \quad \text{Gleichung 23}$$

$N$ : Zahl der Basenpaare

Die lineare Abhängigkeit der Mobilität von der Molekülgröße ist durch zahlreiche Experimente belegt<sup>[29]</sup>.

## Biased-Reptation-Modell

Experimentelle Beobachtungen von großen DNA-Molekülen (>20 kbp), die mit konstanter elektrophoretischer Mobilität durch ein polymeres Netzwerk wandern, führte zu dem Biased-Reptation-Modell<sup>[30, 31]</sup>. Bei hoher Feldstärke wandern die DNA-Moleküle nicht mehr „Kopf“ voran, sondern richten sich parallel zum elektrischen Feld aus. Die Moleküle liegen gedehnt vor und wandern nicht mehr durch das Gel.

$$\mu = \frac{Q}{3f} \cdot \left( \frac{1}{N} + \left( \frac{q \cdot \beta \cdot E}{3 \cdot k \cdot T} \right)^2 - \right) \quad \text{Gleichung 24}$$

$f$ : Reibungskoeffizient;  $N$ : Anzahl der Basenpaare;  $Q$ : Gesamtladung der DNA;  $E$ : Feldstärke;  $kT$ : thermische Energie;  $\beta$ : Durchmesser des Porenkanals,  $q$ : Ladung pro Pore

Wird die oben genannte Gleichung etwas vereinfacht, erhält man:

$$\mu = \frac{Q}{3 \cdot f} \cdot \left( \frac{1}{N} + bE^2 \right) \quad \text{Gleichung 24}$$

$f$ : Reibungskoeffizient;  $N$ : Anzahl der Basenpaare;  $Q$ : Gesamtladung der DNA;  $E$ : Feldstärke;  $b$ : Funktion von Ladung und Segmentlänge der migrierenden Kette

Es können zwei Fälle eintreten:

1. für  $\frac{1}{N} \gg b E^2$  Gleichung 25

$N$ : Anzahl der Basenpaare;  $E$ : Feldstärke;  $b$ : Funktion von Ladung und Segmentlänge der migrierenden Kette

Bei geringen Feldstärken ist das Produkt  $b E^2$  vernachlässigbar, man erhält die Gleichung 23. Die Mobilität hängt linear von der Molekülgröße ab und die Migration folgt dem Reptation Modell.

2. für  $\frac{1}{N} \ll b E^2$  Gleichung 26

$N$ : Anzahl der Basenpaare;  $E$ : Feldstärke;  $b$ : Funktion von Ladung und Segmentlänge der migrierenden Kette

Bei hohen Feldstärken dominiert  $b E^2$  und die elektrophoretische Mobilität wird unabhängig von der Molekülgröße. Die Moleküle liegen parallel zum elektrischen Feld und die Migration ist eingestellt.

Die parallele Ausrichtung entspricht einer Sättigung, da eine weitere Erhöhung der Feldstärke ohne Einfluss auf die Konformation des DNA-Moleküls bleibt. Oberhalb dieser Sättigungsgrenze findet keine größenselektive Trennung mehr statt<sup>[29]</sup>.

Eine weiterführende Verbesserung des Biased-Reptation-Modells ergibt die Beachtung der Fluktuation der Poren im polymeren Netzwerk<sup>[32]</sup>.

Weitere Betrachtungen und Weiterentwicklungen zu der Bewegung von DNA-Molekülen in einem polymeren Netzwerk sind im Review von C. Heller nachzulesen<sup>[33]</sup>.

Zusammenfassend können alle vorgestellten Modelle in folgendem Schema dargestellt werden:

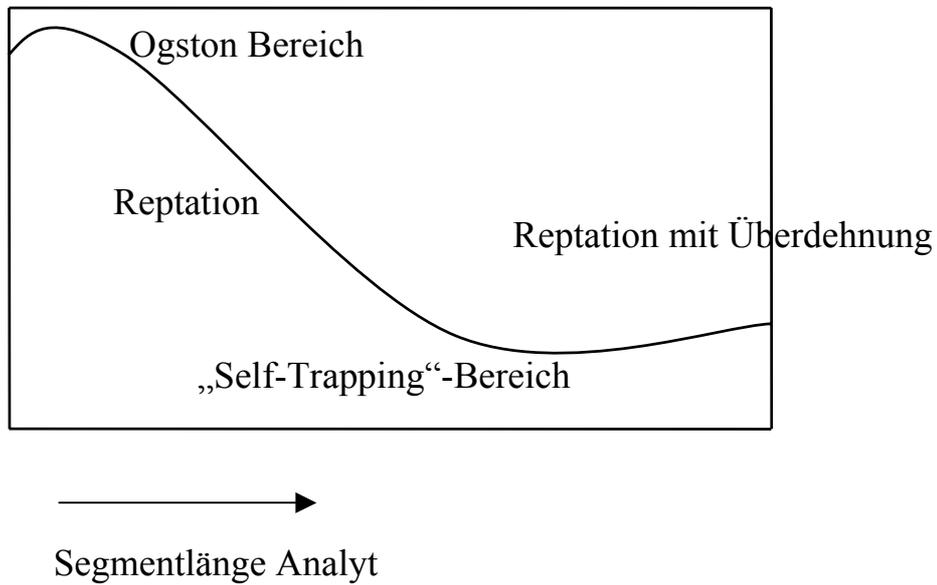


Abbildung 11: Simulation der Mobilität des Analyten gegen die Segmentlänge des Analyten bei konstanter Porengröße des polymeren Netzwerks[6, 28]

## Polymere Trennmatrices für die CGE

### Gele

Gele sind polymere, vernetzte, hochviskose Systeme. Sie bestehen aus geringen Mengen des gelbildenden Polymers und großer Menge Lösungsmittel, wobei die gelbildende Substanz das Lösungsmittel fest gebunden hält. In der CGE kommen Hydrogele zum Einsatz, die in Anlehnung an die Flachbettgelelektrophorese wässrige Lösungen aus Polysacchariden z. B. Agarose oder synthetischen Polymeren wie Polyacrylamid darstellen. Man unterscheidet quervernetzte Gele, bestehend aus zwei Monomerbausteinen und lineare Gele, die nur aus einem Monomerbaustein aufgebaut sind. Die linearen Gele sind aus einem Geflecht linearer Ketten aufgebaut, ihr Zusammenhalt basiert auf physikalische Wechselwirkungen, deshalb werden sie in der Regel auch „physikalische Gele“ genannt. Bei quervernetzten Gelen sind die einzelnen Polymerketten mit kovalenten, chemischen Bindungen fest fixiert, darum werden sie auch als „chemische Gele“ bezeichnet. Diese Gele besitzen wesentlich definierte Porengrößen im Vergleich zu physikalischen Gelen, die sich auf die Trennleistung der Gele auswirkt.

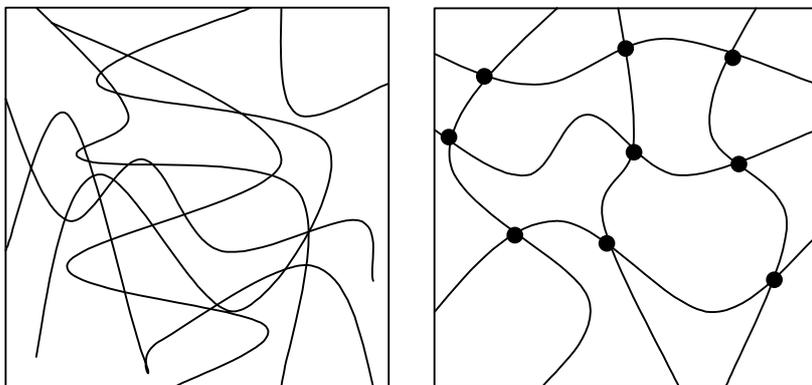


Abbildung 12: Schematische Darstellung eines linearen Polyacrylamidgels (links) und eines quervernetzten Polyacrylamidgels (rechts)

### Chemische Gele

Quervernetzte Polyacrylamidgele entstehen durch Copolymerisation von Acrylamid und Bisacrylamid. Die Polymerisation wird durch Ammoniumpersulfat (APS) initiiert und mittels N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) katalysiert. Es existieren noch

andere Möglichkeiten die Polymerisation einzuleiten, z. B.  $\gamma$ -Strahlen<sup>[34]</sup>,  $H_2O_2$  und mit Hilfe von Redoxsystemen wie  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ .

Die genaue Herstellung einer quervernetzten Gelkapillare wird von Hjerten<sup>[35]</sup> beschrieben. Er prägte auch die Nomenklatur zur Beschreibung solcher Gele<sup>[22]</sup> so wird der Gesamtmonomergehalt mit % *T* angegeben und die Konzentration der Quervernetzers mit % *C*.

Gesamtmonomergehalt einer Acrylamidlösung:

$$\%T = \frac{g \text{ Acrylamid} + g \text{ Vernetzer}}{\text{Volumen der Lösung}} \times 100 \quad \text{Gleichung 27}$$

Konzentration des Quervernetzers:

$$\%C = \frac{g \text{ Vernetzer}}{\% T} \times 100 \quad \text{Gleichung 28}$$

Durch Reaktion beider Bestandteile entsteht ein Gel folgender Struktur:

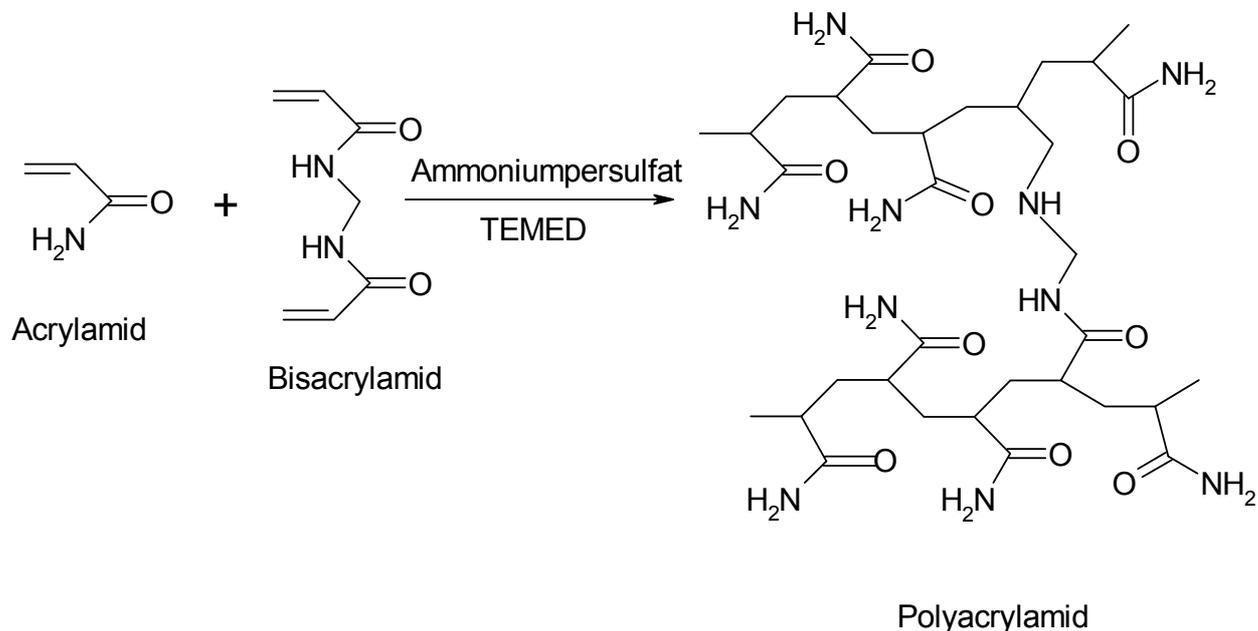


Abbildung 13: Struktur eines quervernetzten Polyacryamidgels

Durch Variation von % *T* und % *C* kann man Gele unterschiedlicher Eigenschaften herstellen. Gele mit niedrigen % *T* haben größere Poren und die Migrationsgeschwindigkeit der Analyten ist höher, aber die Auflösung schlechter. Je höher % *C*,

desto rigider/starrer wird das Gel und desto länger wird die Trennzeit, bedingt durch den höheren Migrationswiderstand.

Diese Gele müssen in der Kapillare bereits in dem benötigten Trennpuffer polymerisiert werden, da ein Austausch des Puffers problematisch ist. Voraussetzung für die optimale Trennung in gelgefüllten Kapillaren ist die Ausschaltung des EOF's. Dieses geschieht durch Beschichtung oder chemische Modifikation der Kapillarwand. In der Regel werden olefinische Doppelbindungen an die Si-OH Gruppen gebunden, die während der Polymerisation mit den Monomeren des Gels copolymerisieren und das Gel an die Kapillarwand fest fixieren. Eine sehr häufig verwendete Substanz zur Fixierung ist das 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan<sup>[35]</sup>.

So hergestellte Kapillaren wurden zuerst zur Trennung von SDS-Proteinkomplexen verwendet<sup>[36]</sup>. Gute Resultate lieferte auch die Trennung von Oligonukleotiden<sup>[37]</sup>, leider verlief die Trennung von größeren DNA-Fragmenten in solchen Gelkapillaren nur mit mäßigem Erfolg<sup>[38]</sup>. Als Hauptursache für die schlechte Trennung ist der hohe Vernetzungsgrad zu nennen.

Obwohl Gelkapillaren sehr gute Trennergebnisse von Biopolymeren liefern, spielen sie nur eine untergeordnete Rolle in der Laborroutine<sup>[27]</sup>. So erfordert das Herstellen solcher Kapillaren größte Sorgfalt, um das Entstehen von Blasen im Gel zu vermeiden. Die Enden der Kapillare müssen immer mit Puffer benetzt werden, sonst kommt es zum Eintrocknen des Geles, dies macht die Weiterverwendung der Kapillare unmöglich. Bei höheren Temperaturen können gelöste Gasanteile auch zur Blasenbildung führen, welche eine lokale Zerstörung des Gels zur Folge haben. Aber auch das Einbringen von Proben kann zur Blasenbildung führen oder durch Verunreinigungen zur Verstopfung der Gelkapillare beitragen<sup>[39-41]</sup>. Durch längeres Verwenden des gleichen Gels kommt es zum Altern des Gels und die Migrationszeiten der gleichen Probe verändern sich. Ein weiterer Nachteil dieser Kapillaren ist ihre beschränkte Nutzbarkeit bei pH-Werten über 9. Bei diesen hohen pH-Werten erfolgt eine Spaltung von chemischen Bindungen im Polyacrylamidgel.

## Physikalische Gele

Mit diesen Gelen versucht man die vorher genannten Probleme der quervernetzten Gele zu umgehen. In Anlehnung an die Flachbettgelelektrophorese wurde versucht, Agarose als Trennmedium in den Kapillaren zu etablieren. Agarose wird aus Rotalgen gewonnen und ist ein Polysaccharid, das aus  $\beta$ -1,3-verknüpften D-Galactopyranose und  $\alpha$ -1,4-verknüpfter Anhydrogalactopyranose besteht. Durch ionische Verunreinigungen wird ein elektroosmotischer Fluss induziert. Agarosegele fangen bei hohen Feldstärken an zu schmelzen, so dass die Verwendung als Trenngele in der Kapillarelektrophorese keinen Erfolg zeigt<sup>[38]</sup>. Gute Trennungen von großen DNA-Molekülen in Agarose zeigten Bocek und Chrambach<sup>[42, 43]</sup>. Sie setzten allerdings eine niedrigschmelzende Agarose in flüssiger Form ein. Trotz diesen Erfolgen hat sich die Agarose nicht sehr stark in der Kapillarelektrophorese durchgesetzt.

Eine weitaus größere Bedeutung als physikalische Gele in der Kapillarelektrophorese haben lineare Polyacrylamidgele. Diese wurden in der Flachbettgelelektrophorese selten verwendet, da die Thermokonvektion sehr hoch war<sup>[44, 45]</sup>. Sie entstehen durch Homopolymerisation von Acrylamidbausteinen.

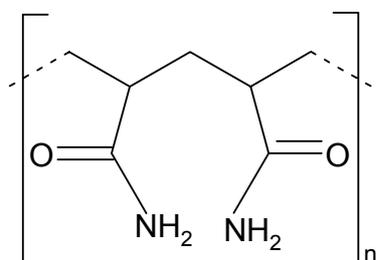


Abbildung 14: Lineares Polyacrylamid

Abhängig von der Monomerkonzentration ändert sich die Konsistenz der Gele, ab 9% T entstehen feste Gele, die in der Kapillare polymerisiert werden müssen. Gele mit geringeren Konzentrationen sind „flüssiger“, und können nach jeder Analyse mit Hilfe von niedrigem oder hohem Druck austauschen. Feste lineare Polyacrylamidgele werden heutzutage hauptsächlich zur Sequenzierung von DNA-Fragmenten eingesetzt.

Da die Ketten im Gel nicht fixiert sind, zeigt das Gel eine längere Lebensdauer, nachteilig ist ihre schlechte UV-Durchlässigkeit von Polyacrylamid unter 260 nm, was bei der Trennung von Proteinen von Nachteil ist<sup>[17]</sup>.

## Polymerlösungen

Polymerlösungen werden mittlerweile routinemäßig in der Laboranalytik von Nukleinsäuren eingesetzt und verdrängen die chemischen und physikalischen Gele, mit den oben genannten Nachteilen, immer mehr. Heutzutage wird eine vergleichbar hohe Trennungsqualität mit hoher Auflösung auch mit diesen Lösungen erreicht. Die leichte Herstellung und Handhabung dieser Lösungen rechtfertigt zusätzlich ihren häufigen Einsatz.

Ist der Unterschied zwischen chemischen Gelen und physikalischen Gelen noch leicht nachzuvollziehen, man kann sich an den fixen Verknüpfungspunkten orientieren, desto schwieriger ist die Differenzierung zwischen physikalischen Gelen und verdünnten Polymerlösungen.

Aus physikalischer Sicht unterscheidet man drei verschiedene Typen von Polymerlösungen, je nach erhaltener Konzentration. In verdünnten Lösungen liegen die einzelnen Polymerketten isoliert vor, deren Raumbedarf vom Polymertyp, der Kettenlänge und dem verwendeten Lösungsmittel abhängt. Dieser Raumbedarf ist durch die Grenzviskosität  $[\eta]$  beschrieben. Diese Grenzviskosität auch Staudinger-Index genannt, gibt an welches Volumen ein Gramm eines Polymeren in einem bestimmten Lösungsmittel einnimmt und ist ein Maß für die Erhöhung der Viskosität einer Lösung:

$$[\eta] = \frac{x \cdot ml}{g} \quad \text{Gleichung 29}$$

Dieser Wert steigt mit höheren Molekulargewichten innerhalb einer polymerhomologen Reihe an. Die Messung der Grenzviskosität  $[\eta]$  verschiedener Polymere führten zu folgender empirischer Formel, genannt Mark Houwink-Sakurada Gleichung<sup>[46]</sup>:

$$[\eta] = K \cdot M_w^a \quad \text{Gleichung 30}$$

$K$ : Konstante;  $a$ : Exponent der Mark-Houwink Gleichung ;  $M_w$ : Molekulargewicht

$K$  und  $a$  sind charakteristische Konstanten für ein gegebenes Polymer-Lösungsmittel System, die man in einschlägigen Tabellenwerken nachschlagen kann. Der Wert  $a$  für ein Polymer liegt in der Regel zwischen 0,5 im idealen Lösungsmittel und 0,8 für sogenannte gequollene Polymerketten.

Erhöht man die Konzentration eines Polymers in der Lösung erreicht man eine Konzentration  $c^*$ , bei der sich die einzelnen Polymerknäule erstmals berühren. Diese

Lösung nennt man halbverdünnte Polymerlösungen. Eine weitere Erhöhung der Konzentration über diesen Wert hinaus, führt zu konzentrierten Lösungen. Hier kommt es zu einer Überlappung der einzelnen Ketten und zur Ausbildung von Netzstrukturen, also einem physikalischen Gel.

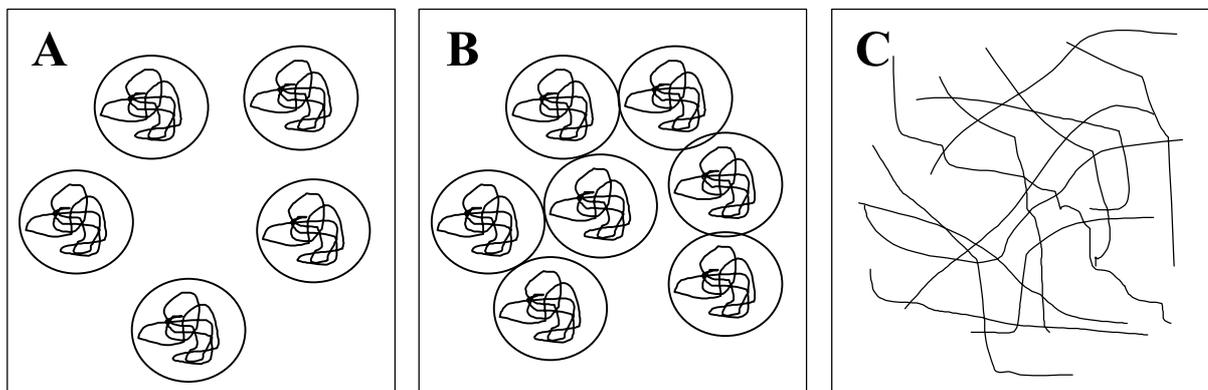


Abbildung 15: Verschiedene Typen von Polymerlösungen, A: verdünnte Lösung; B: halbverdünnte Lösungen; C: konzentrierte Lösungen

Kennt man den  $R_g$  (radius of gyration) und das Molekulargewicht  $M_w$  des Polymers, ist die Grenzkonzentration  $c^*$  definiert durch:

$$c^* = \frac{3 \cdot M_w}{4 \cdot \pi \cdot N_A \cdot R_g^3} \quad \text{Gleichung 31}$$

$M_w$ : Molekulargewicht;  $N_A$ : Anzahl Moleküle;  $R_g$ : radius of gyration

Da die meisten verwendeten Polymere keine einheitliche Kettenlänge aufweisen, gilt diese Formel nur bedingt, aber man kann die Grenzkonzentration  $c^*$  experimentell bestimmen<sup>[47, 48]</sup>. Hierbei wird die dynamische Viskosität gemessen und in einem Diagramm gegen die Konzentration aufgetragen. Bei einer verdünnten Lösung ergibt sich eine lineare Abhängigkeit, die beim Erreichen der Überlappungskonzentration in eine exponentielle Abhängigkeit übergeht.

Fasst man die Gleichungen 30 und 31 zusammen, ergibt sich folgende Formel für die Überlappungskonzentration:

$$c^* = \frac{1,5}{[\eta]} = \left( \frac{1,5}{K} \right) \cdot M_w^{-a} \quad \text{Gleichung 32}$$

$[\mu]$ : Grenzviskosität;  $K$ : Konstanten;  $M_w$ : Molekulargewicht;  $a$ : Exponent der Mark-Houwink Gleichung

Ein weiterer wichtiger Parameter von Polymerlösungen ist die Porengröße. Das Volumen, das ein Kettensegment zwischen zwei Überlappungszonen durch zufällig ausgeführte Bewegungen einnehmen kann, wird „blob“ genannt. Nach Viovy und Duke wird diese Porengröße definiert durch:

$$\xi = 1,43 \cdot R_g \left( \frac{c}{c^*} \right) - (1 + a) / 3a \quad \text{Gleichung 33}$$

$c^*$ : Überlappungskonzentration;  $R_g$ : radius of gyration;  $a$ : Exponent der Mark-Houwink Gleichung

Die Porengröße ist also abhängig von der Konzentration und den Eigenschaften des Polymers, nicht aber von dem Polymerisierungsgrad.

Für die Wanderung von DNA-Fragmenten durch Polymerlösungen steht im Gegensatz zu physikalischen Gelen kein Netzwerk zur Verfügung. Das erste Modell zur Wanderung in Polymerlösungen haben Barron et al.<sup>[49]</sup> entwickelt. Hierbei kollidieren die DNA-Fragmente mit Polymerketten, verwickeln sich mit diesen und ziehen die Ketten durch die Lösung. Dadurch erhöht sich der Einfluss der Reibungskraft auf das DNA-Fragment und die Migrationszeit wird verlängert. Trennungen gehen darauf zurück, dass größere Fragmente eine höhere Wahrscheinlichkeit zur Kollision und Verwicklung haben als kleinere. Eine mathematische Bearbeitung dieses frühen Modells machte Hubert<sup>[50]</sup>. Durch Videomikroskopie wurde dieses Modell verbessert und überarbeitet. Allerdings beobachtete man weit mehr „nonentangled“ Kollisionen, d. h. das DNA-Fragment wandert als Knäuel durch die Lösung und schiebt Polymerketten aus seinem Weg<sup>[51]</sup>.

---

## Grundlagen der Veränderungen im DNA-Muster von Zellen

### Mutationen

In den Zellen ist der genomische Code im Zellkern konserviert. Aufgrund der labilen Bestandteile der DNA ist ihre Struktur durch Noxen, hauptsächlich UV-Licht ständig gefährdet. Vererbare Veränderungen in der DNA nennt man Mutationen. Allerdings existieren im gesunden Organismus eine Reihe von natürlichen Reparaturmechanismen, die die Schäden der DNA ausgleichen und die Häufigkeit von Mutationen auf einen normalerweise geringen Wert einstellen. Zum Beispiel kann es zu einer Veränderung in der Proteinfunktion kommen, wenn ein Nukleotidaustausch bei der Replizierung der DNA auftritt. Der Verlust oder die Addition von Nukleotiden bedingt eine Änderung in der Codonfolge in einem Gen, was eine Deletion oder Insertion von Aminosäuren in den betreffenden Proteinen zur Folge hat.

### Apoptose und Nekrose

Massiv geschädigte Zellen müssen aus dem Organismus entfernt werden, um den Gesamtorganismus nicht zu gefährden. Man unterscheidet zwei unterschiedliche Arten solche Zellen aus dem Organismus zu entfernen.

Apoptose, ein geordnetes Muster von zytoplasmatischen und nukleären Veränderungen, die zu einer Selbstzerstörung einer einzelnen Zelle und deren Entfernung aus dem Gewebe führt. Dieser physiologische Prozess des Zellsterbens, verhindert Schäden im Organismus durch entartete, kranke und überflüssige Zellen und ermöglicht das Fortbestehen des Gesamtorganismus<sup>[52, 53]</sup>.

Nekrose dagegen als ein degenerativer, passiv-responsiver Prozess. Er wird durch schwere und plötzliche Schädigung der Zellen hervorgerufen, wie sie durch Ischämie, Hypoxie, Hyperthermie oder physikalische bzw. chemische Traumata erzeugt werden. Das umliegende Gewebe wird durch freigesetzte Zellbestandteile in Mitleidenschaft gezogen. Im Gegensatz zur Apoptose lässt die Nekrose keine Programmierung oder Steuerung erkennen.

Das Phänomen der Apoptose ist bereits seit dem 19. Jahrhundert bekannt. Carl Vogt beobachtete das neuronale System von Kröten-Embryonen und beschrieb sterbende Zellen

während deren Entwicklung. Den Begriff Apoptose prägten Kerr, Wyllie und Currie erst 1972<sup>[52]</sup>. Diese verglichen die Morphologie von Leberzellen, die mit Toxinen behandelt worden waren, mit der von Lymphozyten, die mit Hormonen behandelt wurden. Während im ersten Fall eine nekrotische Morphologie auftrat (- Tod, Tötung, Absterben), wiesen die Zellen im zweiten Fall eine andere Morphologie auf, die als apoptotisch bezeichnet und beschrieben wurde. Das griechische *αποπ οσις* bedeutet „Abfallen welcher Blätter“. Erst Jahre später wurde deutlich wie gut dieser Begriff zutrifft, als entdeckt wurde, dass alle multizellulären Organismen, sowohl Tiere als auch Pflanzen, diese hoch konservierte Art des Sterbens von Zellen benutzen; so ist sie auch Ursache für das Abfallen des Laubes im Herbst.

Kerr et al<sup>[52]</sup> definierten Apoptose als ein geordnetes Muster von zytoplasmatischen und nukleären Veränderungen, die zu einer Selbstzerstörung einer einzelnen Zelle und deren Entfernung aus dem Gewebe führen. Dieser physiologische Prozess des Zellsterbens, verhindert Schäden im Organismus durch entartete oder kranke und überflüssige Zellen und ermöglicht das Fortbestehen des Gesamtorganismus<sup>[52, 53]</sup>.

Ohne Apoptose wäre das Leben multizellulärer Organismen genauso wenig denkbar wie ohne Proliferation und Differenzierung von Zellen. So ist Apoptose sowohl in der Embryogenese und der Entwicklung des Fötus z.B. bei solch natürlichen Prozessen wie der Rückbildung der embryonal angelegten Schwimnhäuten zwischen Fingern<sup>[54]</sup> und der Ausbildung des Nervensystems, das seine komplexe Form und Funktion erst durch massive Apoptose erhält<sup>[55, 56]</sup> als auch im juvenilen Stadium z.B. in der Metamorphose der Insekten und Amphibien<sup>[57]</sup> zu finden. Zudem ist sie wichtiger Bestandteil im Immunsystem z.B. bei der Deletion autoreaktiver T-Zellklone während der Reifung im Thymus<sup>[58]</sup>, oder dem Absterben von Zielzellen durch die Aktion von zytotoxischen T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen<sup>[59]</sup>.

Gerät der Mechanismus der Apoptose aus seinem Gleichgewicht, kommt es zur Ausbildung von Krankheiten. Ein zuviel an Apoptose prägt neurodegenerative Krankheiten z.B. Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson<sup>[60, 61]</sup> und die HIV-Erkrankung<sup>[62]</sup>, ein zuwenig begünstigt die Entstehung von Tumoren<sup>[63]</sup>, Autoimmunkrankheiten<sup>[64]</sup> und virale Infektionen (z.B. mit Herpes- oder Adenoviren<sup>[65]</sup>). Vielleicht die faszinierendste Erkenntnis der Apoptose-Forschung ist, dass jede Zelle Zeit ihres Lebens ein jederzeit abrufbares Programm zu ihrer eigenen Zerstörung enthält<sup>[66]</sup>. Dieses ist, vermutlich um

---

eine sofortige Reaktion auf Veränderungen ermöglichen zu können, nicht nur genetisch manifestiert, sondern es existieren zahlreiche Vorläuferformen von zu aktivierenden Enzymen, eine ganze Reihe pro- und anti-apoptotischer Faktoren, die sich in der Zelle im Normalzustand in einem ausgeklügelten Gleichgewicht befinden. Eine Störung dieser Homöostase führt zum geordneten Absterben der Zelle<sup>[66]</sup>, basierend auf der Theorie von Purves<sup>[67]</sup> und Oppenheim<sup>[68]</sup>.

Viele heutige Erkenntnisse über diesen Vorgang resultieren aus Arbeiten von Hengartner und Horvitz<sup>[69]</sup> die Studien an der Nematode *Caenorhabditis elegans* durchführten. Hieraus konnten für genetische Prozesse im Menschen wichtige Erkenntnisse gewonnen werden<sup>[70,77,78]</sup>. Die Zellen sind jederzeit bereit zu sterben, ohne dass eine weitere Proteinsynthese erfolgen muss<sup>[71]</sup>. Der Tod der Zellen, in der Regel sind es nur einzelne oder wenige Zellen innerhalb eines Gewebes, die meist asynchron in Apoptose gehen<sup>[72, 73]</sup>, hinterlässt praktisch keine Spuren der einmal vorhandenen Zelle, sie wird von Nachbarzellen oder Makrophagen aufgenommen. Dabei kommt es weder zu einer inflammatorischen Reaktion, noch zu einer Beeinträchtigung der phagozytierenden Zellen<sup>[74]</sup>. Ist das Programm erst einmal gestartet, kommt es innerhalb recht kurzer Zeit zum geordneten Abbau der Zelle in ihre nahezu kleinsten und vor allem für den Rest des Organismus ungefährlichen Bestandteile<sup>[75]</sup>.

Es existieren eine ganze Reihe von Sicherungsmechanismen, welche die Bedeutung der Apoptose für das Leben eines Organismus zusätzlich unterstreichen.

## **Morphologie von apoptotischen und nekrotischen Zellen**

### **Apoptose**

Einmal gestartet führt die Apoptose zu koordinierten, auf verschiedenen Ebenen ablaufenden morphologischen und biochemischen Prozessen, die irreversibel zum Zelltod führen. Die wichtigsten morphologischen Prozesse während der Apoptose sind: Chromatinaggregation, Kondensation von Cytoplasma und Nukleinsäuren und in der Spätphase die Fragmentierung der DNA und Bildung von apoptotischen Körpern<sup>[52]</sup>.

Zu Beginn der Apoptose beobachtet man eine Verringerung des Zellvolumens, durch Wasserverlust und Verlust von Ionen (insbesondere K<sup>+</sup>) im Cytoplasma. Die Zellorganellen bleiben aber intakt und der Stoffwechsel der Zelle läuft über einen längeren Zeitraum noch normal weiter. Der Zellkern schrumpft und das Chromatingerüst verdichtet

sich am Rand des Zellkerns zu einer typischen halbmondförmigen Struktur (Pyknosis) und die Zytoskelett-Struktur kollabiert. Es folgt die Bildung von Ausstülpungen und Bläschen an der Cytoplasmamembran (membrane blebbing) und schließlich schnüren sich apoptotische Körperchen von der Zelle ab. Durch Präsentation sogenannter „eat me Signale“ werden diese von phagozytierenden Zellen aufgenommen, wodurch eine lokale Entzündungsreaktion verhindert wird. Im Zellkern werden spezifische Calcium- und Magnesiumabhängige DNasen aktiviert, die die genomische DNA in charakteristische Bruchstücke zerschneiden, die in der Gelelektrophorese die typische DNA-Leiter-Struktur zeigen<sup>[52]</sup>.

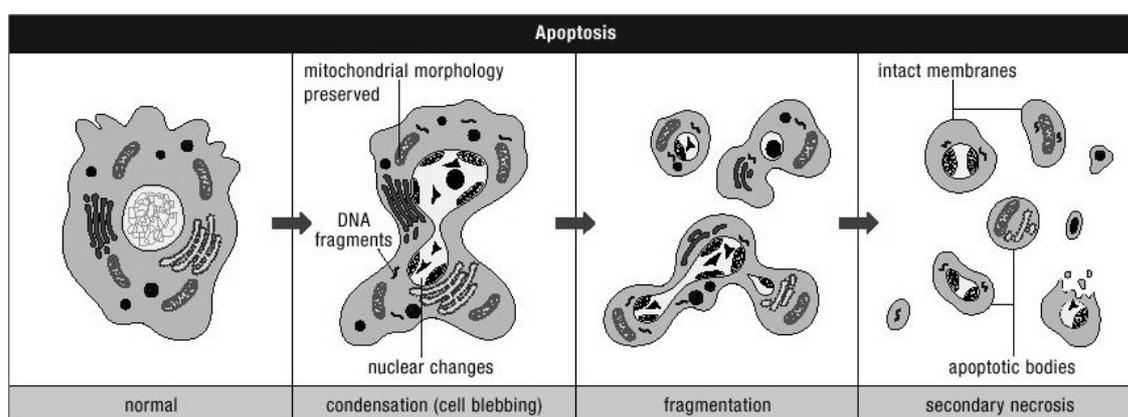


Abbildung 16: Schematische Darstellung morphologischer Veränderungen einer Zelle bei Apoptose (Wyllie et al. (1998). (verändert nach Produktkatalog Boehringer Mannheim)

## Nekrose

Die Nekrose ist eine unpezifische Art des Zelltodes, sie wird oft durch übermäßig hohe Giftstoffkonzentration induziert. Sie ist charakterisiert durch zellulären Stoffwechselkollaps und Schwellung der Organellen und der gesamten Zelle. Die ionische Homöostase an Membranen kann nicht aufrecht erhalten werden und das ATP-Niveau sinkt. Irgendwann reißt die Membran und es werden lysosomale Enzyme freigesetzt, was zu einer nichtspezifischen Aufblähung des umgebenden Gewebes führt.

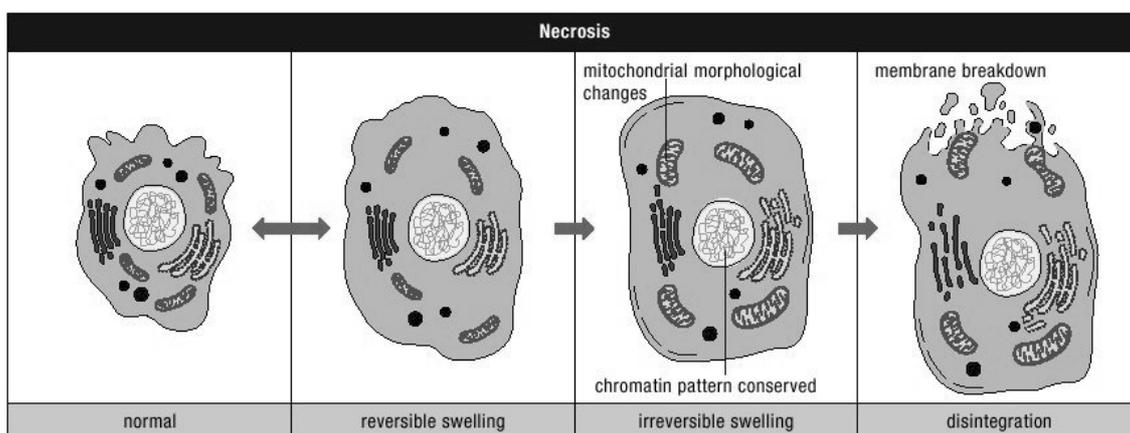


Abbildung 17: Schematische Darstellung morphologischer Veränderungen einer Zelle bei Nekrose (Wyllie et al. (1998). (verändert nach Produktkatalog Boehringer Mannheim)

## Zellulärer Signalweg der Apoptose

Der charakteristische Ablauf der Apoptose resultiert aus der Aktivierung eines intrinsischen Zelltod-Apparates, der über die Evolution hinweg hoch konserviert ist. Der Signalweg lässt sich einteilen in die Auslösung durch Effektoren, die Weiterleitung über Adaptoren und Regulatoren und die ausführenden Elemente, die zu den morphologischen und biochemischen Phänomenen der Apoptose führen. Im Zentrum der Signalkaskade stehen die Caspasen, Cystein-Proteasen, die eine Spaltungsspezifität für Peptidbindungen nach der Aminosäure Aspartat aufweisen<sup>[76]</sup>. Eine Vielzahl von Caspasen sind mittlerweile bekannt, und circa zwei Drittel dieser spielen eine Rolle bei der Apoptose. In der Zelle liegen sie schon als inaktive Vorläuferformen vor, die sich gegenseitig in einer Kaskade durch Spaltung an bestimmten Stellen aktivieren können. Ihre Bedeutung wird besonders deutlich bei Betrachtung der Caspase-Knockout-Mäusen<sup>[77]</sup> und durch die Wirkung der Caspase-Inhibitoren auf die Apoptose<sup>[78]</sup>. Auch bestimmte Krankheitsbilder können in direkten Zusammenhang mit Caspase-Aktivität gebracht werden (z.B. Morbus Alzheimer mit Caspase 3<sup>[79]</sup>).

Für die vorliegende Arbeit stand die Fragmentierung der nukleären DNA im Fokus. Die Kondensation des Chromatins ist ein passiver Prozess durch den Verlust der strukturellen Integrität der Kernmatrix und der Kernlamina<sup>[80, 81]</sup>. Verschiedene Untersuchungen der Gruppe um Nagata zeigen, dass die DNA-Fragmentierung wenigstens zum Teil auf die Aktivierung einer  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  abhängigen endogenen Nuclease zurückzuführen ist<sup>[82-85]</sup>. Sie kommt sowohl im Zytoplasma als auch im Kern in inaktiver Form im Komplex mit ICAD

vor. Durch Caspase 3 wird der Inhibitor abgespalten und die DNase aktiviert. Daher wird sie auch als CAD bezeichnet (Caspase Activated DNase). Ist CAD aktiviert, so kommt es zur internukleosomalen Spaltung der DNA am DNA-Linker zwischen den Nucleosomen. Diese Fragmentierung führt zu diskreten Bruchstücken, die Mehrfache der kleinsten Nucleosomeneinheit von ungefähr 180 Basenpaaren sind und in der elektrophoretischen Trennung eine sogenannte apoptotische Leiter ergeben<sup>[86, 87]</sup>. Diese DNA-Bruchstücke sind ein Indiz für die irreversible Schädigung der Zelle und treten unmittelbar vor Membranauflösung auf<sup>[88]</sup>.

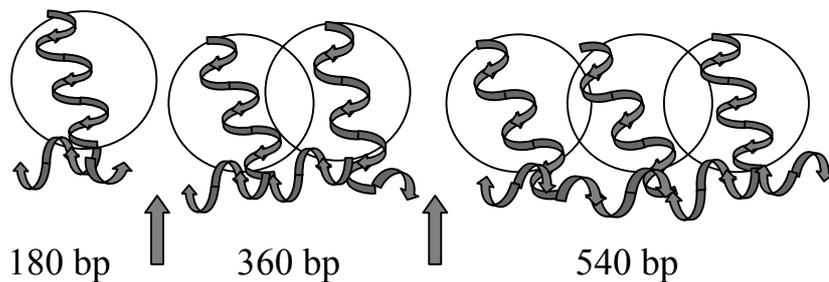


Abbildung 18: Fragmentierung eines DNA-Stranges in den Linker-Regionen

Während der Apoptose kommt es nicht nur zur DNA-Fragmenten dieser geringen Größen, sondern auch zu hochmolekularen Fragmenten, wahrscheinlich durch eine noch nicht identifizierte Endonuklease, deren Größe sich zwischen 50 und 300 kb bewegt.

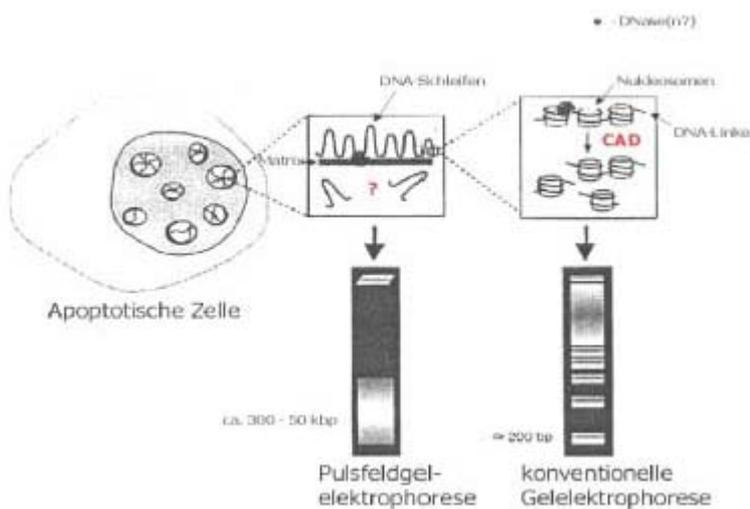


Abbildung 19: Die DNA-Fragmentierung während der Apoptose erzeugt Fragmente in zwei verschiedenen Größenordnungen (Abbildung modifiziert nach Hughes und Cidlowski, 2000)

---

## Topoisomerase-Inhibitoren

Topoisomerasen sind nukleäre Enzyme, die vorübergehend Einzel- oder Doppelstrangbrüche in der DNA erzeugen, wobei die Bruchstücke kovalent mit dem Protein verbunden bleiben. Neben der Transkription und der Reparatur der DNA sind sie an der DNA-Replikation beteiligt, indem sie die Torsionsspannung des DNA-Doppelstranges durch Strangbruch und Entdrillen lösen<sup>[89]</sup>.

Topoisomerase-Inhibitoren lösen Apoptose über eine Freisetzung von Cytochrom c<sup>[90]</sup> aus Mitochondrien aus. Aufgrund ihres Wirkmechanismus unterscheidet man zwei Arten dieser Inhibitoren.

Topoisomerase I Inhibitoren z.B. Topotecan verursachen Einzelstrangbrüche, indem das Molekül kovalent irreversibel an den Komplex zwischen Enzym und DNA bindet. Durch das Fortschreiten der Replikationsgabel erfolgt ein proteinassoziierter Bruch des DNA-Einzelstranges<sup>[91, 92]</sup>.

Topoisomerase II Inhibitoren z.B. Etoposid verursachen Doppelstrangbrüche, wobei es auch hier nicht zu einer direkten Bindung des Moleküls an die DNA kommt, sondern es wird die Strangentdrillung und die DNA-Ligase-Aktivität inhibiert.

## Vitamin D

Im menschlichen Körper existieren zwei verschiedene Formen von Vitamin D, stammend aus unterschiedlichen Quellen. Vitamin D<sub>3</sub>, das endogen aus 7-Dehydrocholesterol in der Haut mit Hilfe von UV-Strahlen (270-300 nm) entsteht und Vitamin D<sub>2</sub> und/oder D<sub>3</sub> durch Nahrungszufuhr.

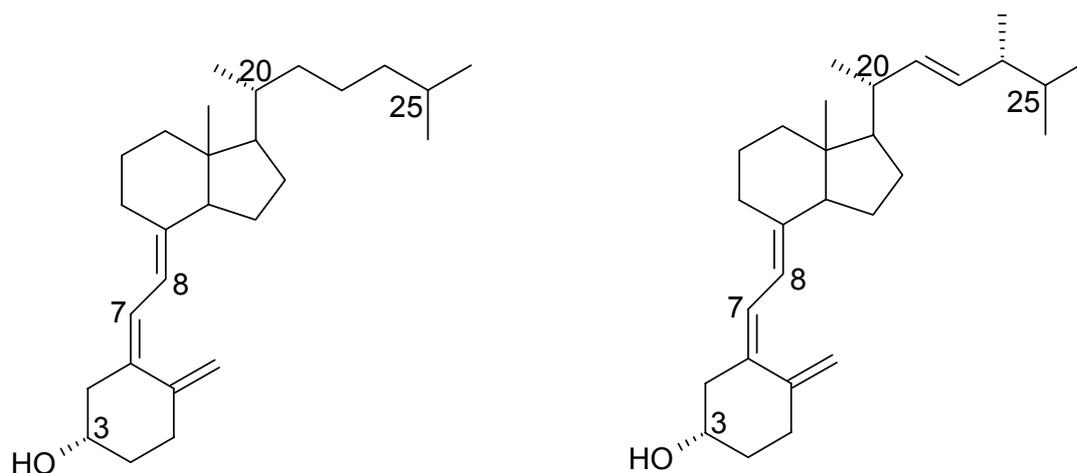


Abbildung 20: Vitamin D<sub>3</sub> (Colecalciferol) und Vitamin D<sub>2</sub> (Ergocalciferol)

Beide Formen sind Vorläufer von  $1\alpha, 25$  (OH)<sub>2</sub>-D<sub>2</sub> bzw. D<sub>3</sub>, den aktiven Formen der Hormone und entstehen durch enzymatische Schritte, an denen P450-spezifische Enzyme beteiligt sind. Für Vitamin D<sub>3</sub> sind das die D<sub>3</sub>-25-Hydroxylase (CYP 27A) und die 25-Hydroxyvitamin-D-1 $\alpha$ -Hydroxylase (CYP 27B1). Beide Enzyme sind in der Mitochondrienmembran der Zellen lokalisiert. Durch zahlreiche Studien wurde mittlerweile die ursprüngliche Theorie widerlegt, dass die Umwandlung der Vorläufermoleküle in die aktive Form nur in Leber (25-Hydroxylierung) und Niere (1 $\alpha$ -Hydroxylierung) stattfindet, im Gegenteil findet die Umwandlung in zahlreichen verschiedenen Zellen statt<sup>[93, 94]</sup>. Besonders durch die Aktivierung des Enzyms 25-Hydroxyvitamin-D<sub>24</sub>-Hydroxylase (CYP 24) kann in allen Zelltypen  $1\alpha, 25$  (OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> in die aktivierte Form überführt werden.

$1\alpha, 25$  (OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>, die wichtigste aktive Form von Vitamin D entfaltet seine Wirkung analog den anderen Steroidhormonen über einen im Kern lokalisierten Vitamin-D-Rezeptor (VDR). Vitamin D<sub>3</sub> und VDR bilden einen Komplex, der an

---

bestimmte DNA-Sequenzen (Vitamin-D-Responserelemente, VDRE) in der Promotorregion der einzelnen Gene bindet und durch eine up- oder down-Regulierung, die Zellfunktion vielschichtig beeinflusst<sup>[95]</sup>. Auch die Komplexbildung mit anderen nukleären Rezeptoren oder Kofaktoren ist bekannt, wobei es zu einer Modulation von Transkriptionsaktivitäten kommt<sup>[96]</sup>. Da viele Gene durch Vitamin D beeinflusst werden, resultieren daraus eine Vielzahl von Wirkungen. Die zentrale Rolle ist die Regulierung der Calcium Homöostase und die Knochenbildung, aber auch Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose in normalen und malignen Zellen ist bekannt<sup>[97]</sup>. Auch wichtige immunologische Prozesse werden beeinflusst, so ist die Inhibierung der Expression von Interferon  $\gamma$  und Interleukin 2 bekannt, aber auch die Modulation von antigenpräsentierenden Zellen<sup>[98]</sup>. Schlüsselfunktionen wurden auch für das ZNS gezeigt, besonders die Regulation von neurotrophen Faktoren und Neurotransmittern<sup>[99]</sup>.

## **MATERIAL UND METHODEN**

### **Kapillarelektrophorese**

#### **Gel-Kapillaren der Fa. Beckman**

Der verwendete Kit eCAP ssDNA Kit enthält eine Polyacrylamid-beschichtete Kapillare, von 47 cm Länge (40 cm effektiver Länge) und einem ID von 100  $\mu\text{m}$ , gefüllt mit einem hochviskosen, quervernetzten Polyacrylamidgel. Der Trennpuffer enthält 44 % TRIS, 56 % Borsäure and 7 M Harnstoff. Durch Zusatz von Harnstoff werden denaturierende Bedingungen eingestellt, die vorliegende DNA-Fragmente werden als Einzelsträngen getrennt. Die Trennung der Oligonukleotide erfolgt wegen des gleichen Ladungs/Masse Verhältnisses nach Größe der Analyten. Die Injektion erfolgt elektrokinetisch. Bei einer Druckinjektion würden zu geringe Mengen an Probe in die Kapillare gelangen, da der aufzuwendende Druck umgekehrt proportional zu der hohen Viskosität des Gels ist. Die Proben wurden mit 7,5 kV injiziert. Die Trennungen wurden mit inverser Polarität unter konstantem Stromfluß von 7  $\mu\text{A}$  durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit einem Diodenarray-Detektor bei 254 nm.

#### **Trennkapillaren**

Die unbeschichteten Trennkapillaren aus fused-silica-Material mit Innendurchmesser von 100  $\mu\text{m}$  stammen von der Fa. Macherey-Nagel. Die Kapillaren sind außen mit einem Polyimidmantel umhüllt. Durch diese Beschichtung erhalten die Kapillaren eine ausreichende Flexibilität, die das Handling mit ihnen wesentlich erleichtert, besonders hervorzuheben, der Einbau in die Kapillarkassette.

Die beschichteten Kapillaren, meist DB-1 Kapillaren, mit einem Innendurchmesser von 100  $\mu\text{m}$  wurden ebenfalls als Meterware von verschiedenen Anbieter bezogen. Die Oberfläche der DB-1 Kapillare ist nicht polar, sie ist 100% mit Dimethylpolysiloxan belegt, um den EOF zu unterdrücken.

#### **Herstellung des Detektionsfensters**

Die Entfernung der 3 mm dicken Polyimidschicht kann einfach durch konzentrierte Schwefelsäure erfolgen. Um das Detektionsfenster möglichst klein zu halten, gibt es die

Möglichkeit ein Glasrack der Fa. J&W Scientific zu benutzen. Dafür wird das Glasrack mit einem Tropfen konzentrierter Schwefelsäure auf einer Heizplatte erhitzt. Die Kapillare wird 2-3 min in die heiße Säure gehalten und das entstandene Fenster mit Ethanol gesäubert. Diese Methode konnte auch bei bereits permanent beschichteten Kapillaren angewendet werden. Durch die große Oberfläche der Kapillare wird die entstandene Hitze schnell verteilt. Eine Überhitzung oder Zerstörung der Innenschichtung wurde nicht beobachtet.



Abbildung 21: Glasrack zur Anfertigung von Detektionsfenster in Kapillaren

## **Permanente Beschichtung der Kapillaroberfläche nach Hjerten<sup>[35]</sup>**

Zu Beginn der Arbeit wurde versucht die Oberflächen von Kapillaren so zu modifizieren, dass es zu einer kompletten EOF-Unterdrückung kommt. Aus Literatur ist die Belegung nach Hjerten bekannt.

Die permanente Beschichtung aus linearem Polyacrylamid erfolgt bei Raumtemperatur in mehreren Schritten:

- Ätzung der Kapillaroberfläche mit NaOH

Die Kapillaroberfläche wird 1 Stunde mit 1 M NaOH behandelt. Es folgen 10 min Spülung mit Milli-Q Wasser, danach 15 min mit 0,1 M HCl und wieder Spülen für mind. 30 min mit Milli-Q Wasser. Diese Ätzung dient zur Erhöhung der Silanolgruppenkonzentration.

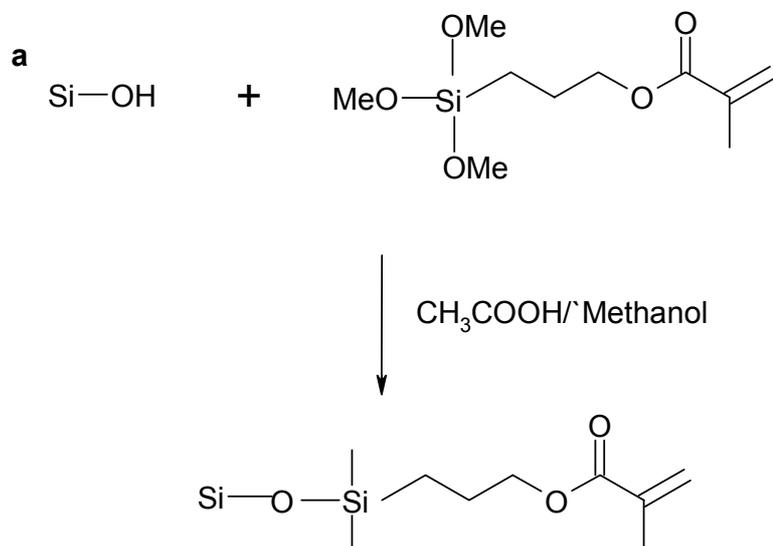
- Silanisierung der Oberfläche mit 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan

Dazu werden 80  $\mu$ l 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan mit 20 ml Wasser gemischt und mit konzentrierter Essigsäure auf pH 3,5 eingestellt. Die Lösung wird mit Überdruck in die Kapillare eingebracht, bis am anderen Ende der Kapillare Lösung austritt. Der benötigte Überdruck wurde mit Argon erzeugt, der durch seine

chemisch inerten Eigenschaften eine vorzeitige Polymerisierung verhindert. Das Ende der Kapillare wird mit einem Septum verschlossen und nach einer Einwirkzeit von einer Stunde bei RT wird die überschüssige Lösung mit Wasser bei ca. 1 bar Argon ausgespült.

- Copolymerisation der entstandenen Methacryl-Doppelbindungen mit Acrylamid

Die verwendete PAA-Lösung wurde nach der Vorschrift von Schmalzing et al.<sup>[100]</sup> hergestellt. 40 mg Acrylamid werden in 1 ml Wasser gelöst und 10 min im Ultraschallbad entgast. Nach Zugabe von 10 µl 10 %-iger TEMED-Lösung (Polymerisationskatalysator) und 10 %-iger Ammonium-persulfat-Lösung (Starter der radikalischen Vinylpolymerisation) erfolgt das sofortige Einbringen in die Kapillare mit ca. 1 bar Argon. Nach 30 min wird die Kapillare wieder in die Kassette eingebaut und mit Wasser in der CE-Apparatur gespült. Hierbei wird das lineare Polyacrylamid aus der Kapillare herausgedrückt nur ein dünner Film verbleibt an der Wand gebunden. Die Lagerung über Nacht erfolgte bei 35 °C im Trockenschrank.



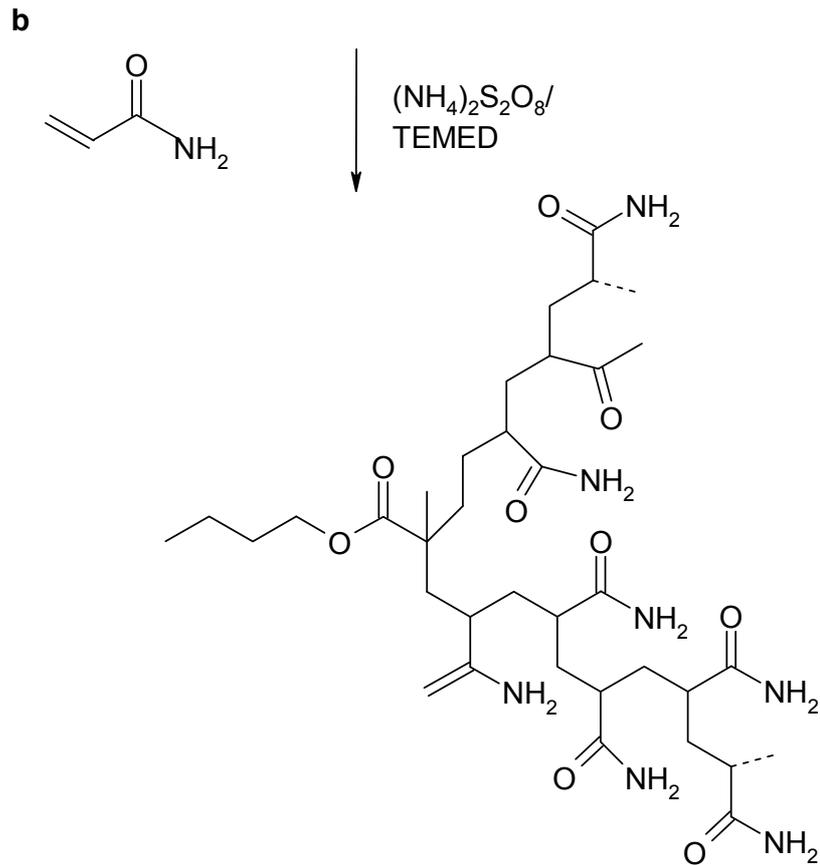


Abbildung 22: Kapillarbeschichtung nach Hjerten; a Silanisierung; b Copolymerisation der Methacryl-Doppelbindungen mit Acrylamid

Die Beschichtung der Kapillaren erfolgte in einer Apparatur, die in Anlehnung an eine Belegungsapparatur aus der Gaschromatographie angefertigt wurde.

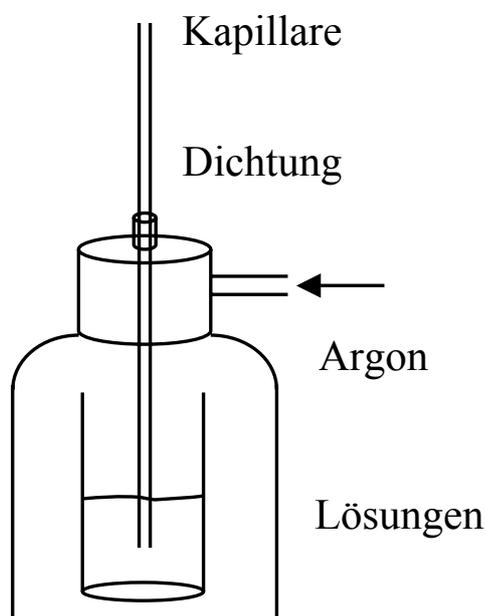


Abbildung 23: Beschichtungsapparatur

In den Deckel eines druckfesten Gefäßes wurde zwei Öffnungen angebracht. Durch die obere wurde die Kapillare geführt, mit einem Fitting abgedichtet. An der seitlichen Öffnung wurde ein Verbindungsstück angebracht, das als Anschlußrohr für die Zuleitung von Argon in das Gefäß dient. Argon wurde zum Druckaufbau benutzt um die jeweiligen Lösungen durch die Kapillare zu pressen. Das Austreten von Flüssigkeit am anderen Ende der Kapillare diente zur Überprüfung des Vorgangs.

Die Effizienz der so beschichteten Kapillaren wurde anschließend getestet. Als Proben dienten mehrere Oligonukleotide, mit der Länge von 12-, 20-, und 40- Basen. Die Auflösung zwischen den unterschiedlichen Längen wurde genauer untersucht.

Obwohl die Trennleistung gut war, zeigte es sich leider relativ früh, dass die Belegung nicht sehr stabil war. Nach kürzester Zeit kam es zur Degradation der Polyacrylamidschicht. Zum einen erkannte man das an der sehr unruhigen Basislinie zum anderen an der sich ständig verändernden Migrationszeiten durch Vorhandensein des EOF's.

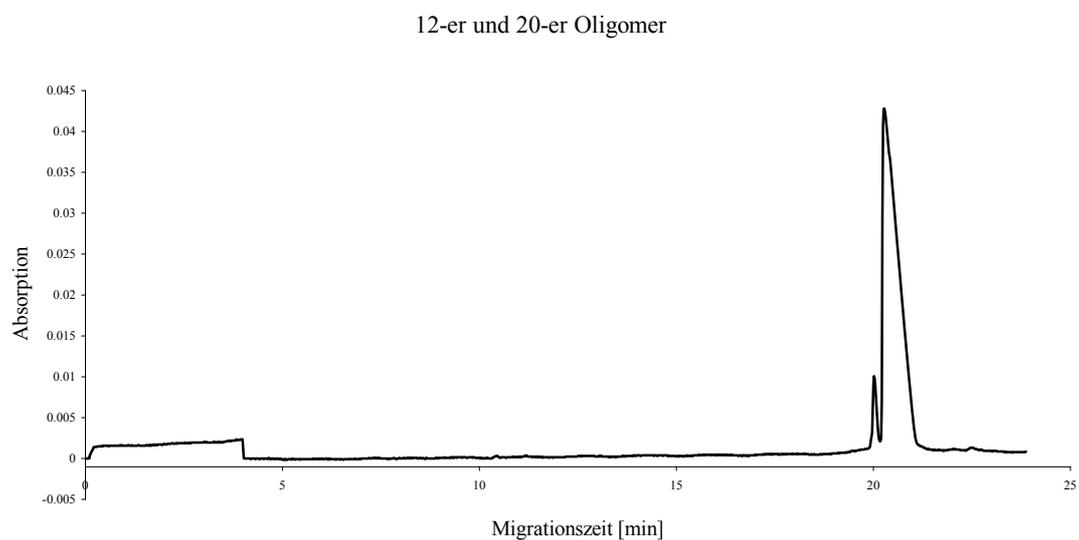
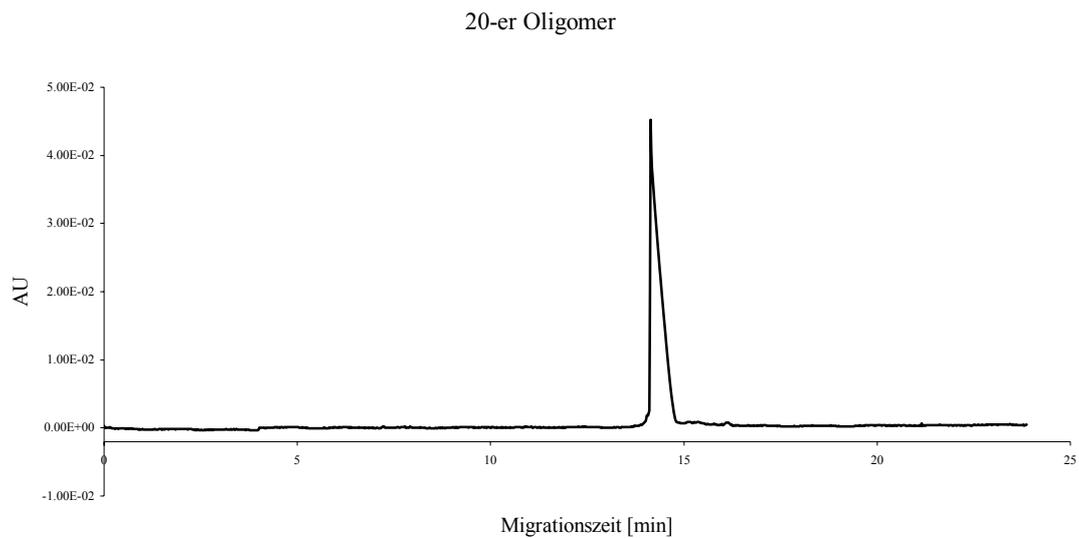


Abbildung 24: Änderung der Migrationszeit von einem 20-er Oligomer, beim zweiten Lauf war zusätzlich ein 12-er Oligomer präsent

Insgesamt konnte keine zufriedenstellende Stabilisierung der Belegung erreicht werden, deshalb wurde entschieden fertig belegte GC-Kapillaren zu benutzen. Für alle weiteren Trennungen wurden DB 1 Kapillaren verwendet.

## Herstellung von Pufferlösungen für die CE

### Pufferbildner

#### TBE-Puffer

Zur Herstellung des Puffers wurden 89 mM Tris ( $M_r=121,14$  g/mol), 89 mM Borsäure (61,83 g/mol) und 2 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (372,24 g/mol) eingewogen und in Milli-Q Wasser gelöst. Wenn nötig wurde die Lösung mit 0,1 N NaOH unter Kontrolle einer pH-Meters auf pH 8,3 eingestellt. In der Regel wurde eine 10 x Stammlösung hergestellt und bei Bedarf 1:10 mit Milli-Q Wasser verdünnt.

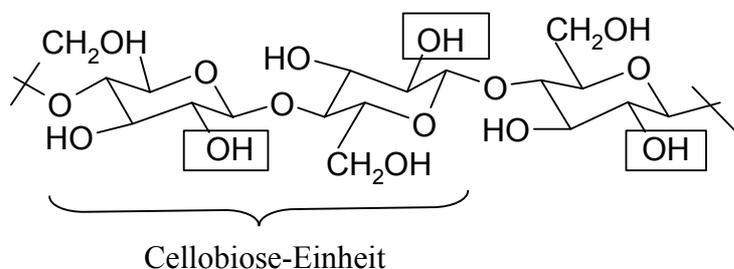
#### TAPS-Puffer

Zur Herstellung eines 2% TAPS-Puffers wurde 0,5g HEC unter Rühren in ca. 20 ml, auf 50 °C erwärmtes Wasser gegeben. Der klaren Lösung wurden 121,5 mg TAPS hinzugefügt und nach dem Auflösen der pH-Wert mit TRIS auf pH = 7,0 eingestellt und auf ein Endvolumen von 25 ml mit Wasser aufgefüllt.

## Herstellung der Polymerlösungen

Untersucht wurden vier verschiedene Cellulosederivate: Hydroxyethylcellulose (HEC) (Fa. Fluka) mit ca 1500 mPa·s (5 % in Wasser bei 20 °C), Methylcellulose (MC) (Fa. Aldrich) mit 4000 cp (2 % in Wasser), Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) (Fa. Sigma) mit ca 2500-5600 cp (2 % in Wasser bei 20 °C) und Carboxymethylcellulose-Natrium (CMC) (Fa. Fluka) mit 400-100 mPa·s (2 % in Wasser bei 25 °C).

Cellulose ist ein 1,4- $\beta$ -Glucan. Der Grundbaustein besteht aus dem Disaccharid Cellobiose.



Die Derivate der Cellulose entstehen z. B. durch Veretherung der OH-Gruppen mit verschiedenen Gruppen, z.B. Methylgruppen usw.

Der Gelbildner wurde in einem Meßzylinder eingewogen und mit 1 x TBE-Puffer (etwa 2/3 des gewünschten Endvolumens) versetzt und unter Rühren über Nacht bei Raumtemperatur zur Quellung gebracht. Nach Auffüllen mit Puffer auf das Endvolumen wurde bei Bedarf für ssDNA Trennungen 7 M Harnstoff hinzugegeben und unter Rühren gelöst. Der pH-Wert wurde bei Bedarf auf pH 8,3 eingestellt. Der fertige Puffer wurde gefiltert. Dafür wurden Chromafil Einmalfilter PET-45/25 der Porengröße 0,45 µm (Firma Macherey-Nagel) verwendet. Die Lagerung erfolgte bei 20 °C. Die anschließende Viskositätsmessung erfolgte nach dem Ph.Eur. bei 20 °C.

Folgende Gelbildner wurden in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet:

1. Hydroxyethylcellulose (1,0; 1,5; 2,0; 2,5 %)
2. Hydroxypropylmethylcellulose (0,2; 0,3; 0,4; 0,6; 0,8 %)
3. Methylcellulose (0,1; 0,2; 0,3; 0,4 %)
4. Carboxymethylcellulose (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 %)

### Messung der Viskosität

Diese Messungen erfolgten gemäß dem aktuellen Europäischen Arzneibuch. Diese Methode beruht auf der Messung der Strömungsgeschwindigkeit von Flüssigkeiten in dünnen Kapillaren. Das in der Zeiteinheit fließende Flüssigkeitsvolumen  $V/t$  ist proportional der herrschenden Kraft, d.h. dem Produkt aus Druck und Querschnitt der Kapillare, sowie umgekehrt proportional der dynamischen Viskosität und der Länge der Kapillare. Der genaue Zusammenhang wird durch das Hagen-Poiseulle-Gesetz wiedergegeben:

$$\frac{V}{t} = \frac{p \cdot \pi \cdot r^4}{8\eta \cdot l} \quad \text{Gleichung 34}$$

$V$ :Volumen;  $t$ :Zeit;  $r$ :Radius;  $l$ :Länge

Durch Umstellung der Gleichung ergibt sich für die dynamische Viskosität folgende Beziehung:

$$\eta = \frac{p \cdot \pi \cdot r^4 \cdot t}{8V \cdot l} \quad \text{Gleichung 35}$$

$V$ :Volumen;  $t$ :Zeit;  $r$ :Radius;  $l$ :Länge

Alle konstanten Größen werden in einer Gerätekonstante  $k$  zusammengefasst, man erhält für die dynamische Viskosität folgende Beziehung:

$$\eta = k \cdot \rho \cdot t \quad \text{Gleichung 36}$$

$t$ : Zeit;  $\rho$ : Dichte

Diese Konstante ist aus Herstellerunterlagen zu entnehmen oder kann mit einem entsprechenden Eichöl bestimmt werden.

Da in den meisten Fällen die Dichte viskoser Lösungen nicht bekannt ist, wird in der Praxis die kinematische Viskosität bestimmt. Diese ist definiert als der Quotient aus der dynamischen Viskosität  $\eta$  und der Dichte  $\rho$  einer, bei gleicher Temperatur gemessener, Flüssigkeit:

$$\nu = \frac{\eta}{\rho} \quad \text{Gleichung 37}$$

$\rho$ : Dichte;  $\eta$ : dynamische Viskosität

Die kinematische Viskosität wird meist in Quadratmillimeter je Sekunde angegeben.

Für die praktische Durchführung wurden folgende Kapillarviskosimeter verwendet:

Ostwald Viskosimeter mit  $k= 1,215$

Ostwald Viskosimeter mit  $k= 0,1102$

Ubbelohde Viskosimeter mit  $k= 0,1060$

Bei der Messung wird die Zeit gemessen, die ein bestimmtes Volumen zum Durchfließen zweier Markierungen benötigt.

Die Kapillare mit der größten Konstanten wurde nur zur Messung stark viskoser Lösungen herangezogen. Die Zeitmessung von dünnflüssigen Lösungen in dieser Kapillare war nicht möglich, da dieser Lösungen die beiden relevanten Markierungen zu schnell passierten. Die beiden anderen Geräte wurden beide zur Viskositätsmessung benutzt. Man erhielt vergleichbare Werte der dynamischen Viskosität.

**HEC ohne Harnstoff**

K [mm <sup>2</sup> /sec <sup>2</sup> ]	Gehalt [%]	Zeit [sec]	Viskosität [mm <sup>2</sup> /sec]
1,215	2,5%	140	170,1
	2,0%	62	75,33
0,1102	1,5%	312	34,38
	1,0%	131	14,44
0,1060	1,5%	303	32,12
	1,0%	130	13,78

**HEC mit Harnstoff**

K [mm <sup>2</sup> /sec <sup>2</sup> ]	Gehalt [%]	Zeit [sec]	Viskosität [mm <sup>2</sup> /sec]
1,215	2,5%	76	92,34
	2,0%	40	48,60
	1,5%	18	21,87
	1,0%	08	9,72
0,1102	1,5%	206	22,70
	1,0%	95	10,47
0,1060	1,5%	206	21,84
	1,0%	96	10,18

**HPMC ohne Harnstoff**

K [mm <sup>2</sup> /sec <sup>2</sup> ]	Gehalt [%]	Zeit [sec]	Viskosität [mm <sup>2</sup> /sec]
1,215	0,8%	121	147,0
	0,6%	52	63,18
	0,3%	05	6,08
	0,2%	0,3	3,65
0,1102	0,8%	1181	130,15
	0,6%	563	62,04
	0,4%	131	14,44
	0,3%	62	6,83
	0,2%	40	4,41
0,1060	0,4%	130	13,78
	0,3%	60	6,36
	0,2%	38	4,03

**HPMC mit Harnstoff**

K [mm <sup>2</sup> /sec <sup>2</sup> ]	Gehalt [%]	Zeit [sec]	Viskosität [mm <sup>2</sup> /sec]
1,215	0,8%	40	48,6
	0,6%	26	31,59
	0,4%	08	9,72
	0,3%	04	4,86
0,1102	0,8%	549	60,49
	0,6%	303	33,39
	0,4%	96	10,58
	0,3%	51	5,62
	0,2%	36	3,96
0,1060	0,4%	90	9,54
	0,3%	49	5,19
	0,2%	34	3,60

**MC ohne Harnstoff**

K [mm <sup>2</sup> /sec <sup>2</sup> ]	Gehalt [%]	Zeit [sec]	Viskosität [mm <sup>2</sup> /sec]
1,215	0,4%	11	13,37
	0,3%	05	6,08
	0,1%	02	2,43
0,1102	0,4%	130	14,33
	0,3%	55	6,06
	0,2%	35	3,86
	0,1%	20	2,20
0,1060	0,4%	118	12,51
	0,3%	54	5,73
	0,2%	34	3,60
	0,1%	21	2,22

**MC mit Harnstoff**

K [mm <sup>2</sup> /sec <sup>2</sup> ]	Gehalt [%]	Zeit [sec]	Viskosität [mm <sup>2</sup> /sec]
1,215	0,4%	10	12,15
	0,3%	05	6,08
0,1102	0,4%	107	11,79
	0,3%	54	5,95
	0,2%	39	4,29
	0,1%	24	2,65

0,1060	0,4%	99	10,49
	0,3%	50	5,3
	0,2%	38	3,98
	0,1%	22	2,33

### CMC ohne Harnstoff

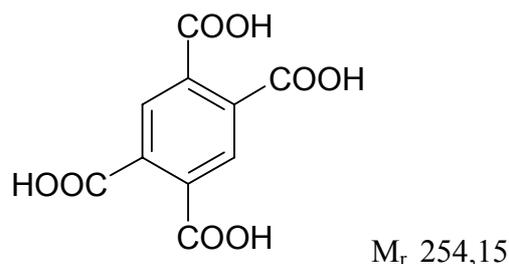
K [mm <sup>2</sup> /sec <sup>2</sup> ]	Gehalt [%]	Zeit [sec]	Viskosität [mm <sup>2</sup> /sec]
1,215	2,0%	532	646,38
	1,5%	145	176,17
	1,0%	51	61,97
0,1102	0,5%	94	10,36
0,1060	0,5%	89	09,43

### CMC mit Harnstoff

K [mm <sup>2</sup> /sec <sup>2</sup> ]	Gehalt [%]	Zeit [sec]	Viskosität [mm <sup>2</sup> /sec]
1,215	2,0%	157	190,76
	1,5%	71	86,27
	1,0%	24	29,16
0,1102	0,5%	88	09,69
0,1060	0,5%	85	09,01

## Etablierung eines internen Standards

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist die quantitative Erfassung der Auftragsmenge von verschiedenen Faktoren abhängig und kritisch in der Berechnung. Eine Quantifizierung der DNA-Fragmente ist mit einem internen Standard leichter zu realisieren. Voraussetzungen für so einen Standard sind, die Fähigkeit der Wanderung im elektrischen Feld und ein gewisses Molekulargewicht, damit sie nahe an den Nucleinsäuren eluiert wird. Untersucht wurde die Pyromellitsäure (Benzol-1,2,4,5-tetracarbonsäure), die als vierbasige Säure bei pH 8,3 als negativ geladener Analyt vorliegt.



Die Substanz zeigt bei 210 nm ein Absorptionsmaximum, aber die Absorption bei 254 nm ist ausreichend hoch, um Pyromellitsäure bei dieser Wellenlänge sensitiv genug detektieren zu können. Bei Verwendung von TBE-Puffer als Lösungsmittel, verschiebt sich das Absorptionsmaximum um ca. 10 nm, der Einfluss auf die Extinktion bei 254 nm jedoch ist vernachlässigbar.

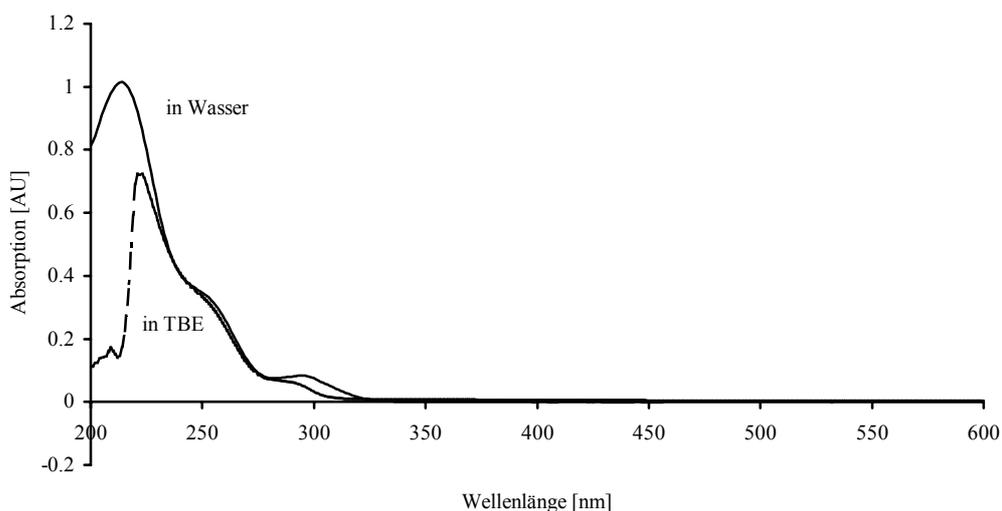


Abbildung 25: UV-Spektrum einer 0,001 % Pyromellitsäurelösung in Wasser und in TBE-Puffer

Vortests mit 0,001% Pyromellitsäure-Lösung dienten dazu, die Genauigkeit der elektrokinetischen Injektion zu überprüfen. Die Genauigkeit kann durch den Vergleich korrigierter Peakflächen mehrerer aufeinanderfolgender Trennungen festgestellt werden. Für diese Test wurden jeweils 2x5 Messungen, die nacheinander durchgeführt wurden, berücksichtigt.

	Correct. Area	Correct. Area
Wert1	0,61055	0,65795
Wert2	0,61496	0,67757
Wert3	0,57594	0,65504
Wert4	0,54026	0,57892
Wert5	0,51074	0,50244

Mittelwert	0,592437
Standardabw.	0,05851943
rel. Abw.%	9,88

Tabelle 2: 0,001 % Pyromellitsäure 1:20 verdünnt, Injektion 5 sec bei 5 kV

Gleichzeitig ist der Einfluss von Pufferzugabe zu der Probe untersucht worden. Der Probe wurden 5 % bzw. 10 % TBE-Puffer zugesetzt. Der erste erkennbare Effekt war die Verkleinerung der Peakflächen, bedingt durch die Anwesenheit weiterer Ionen bei der diskriminierenden elektrokinetischen Injektion.

	Correct. Area	Correct. Area
Wert1	0,28527	0,28863
Wert2	0,25795	0,23829
Wert3	0,28333	0,24963
Wert4	0,25727	0,23093
Wert5	0,25465	0,24754

Mittelwert	0,259349
Standardabw.	0,0190204
rel. Abw.%	7,33

Tabelle 3: 0,001 % Pyromellitsäure 1:20 verdünnt, 5 % TBE, Injektion 5 sec bei 5 kV

	Correct. Area	Correct. Area
Wert1	0,47161	0,47211
Wert2	0,46836	0,44612
Wert3	0,45579	0,47091
Wert4	0,44452	0,43499
Wert5	0,41897	0,43393

Mittelwert	0,451731
Standardabw.	0,01795888
rel. Abw.%	3,98

Tabelle 4: 0,001 % Pyromellitsäure 1:20 verdünnt, 10 % TBE, Injektion 5 sec bei 5 kV

Man erkennt einen deutlich bessere relative Standardabweichung bei Zugabe von Puffer.

Für die Kalibrierung wurde eine Messreihe mit fünf verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Die Konzentrationen der Messlösungen betragen 10 µg/ml, 5 µg/ml,

2 µg/ml, 1 µg/ml und 0,5 µg/ml Pyromelltisäure. Diese Lösungen wurden aus einer 0,1% Stammlösungen durch Verdünnen hergestellt. Die Stammlösung wurde erst 1:100 verdünnt, es folgten weitere Verdünnungsschritte. Um den Einfluss der Ionenkonzentration bei der diskriminierenden elektrokinetischen Injektion zu untersuchen, wurde den Messlösungen 10 % TBE-Puffer zugesetzt.

Weitere kapillarelektrophoretische Bedingungen waren:

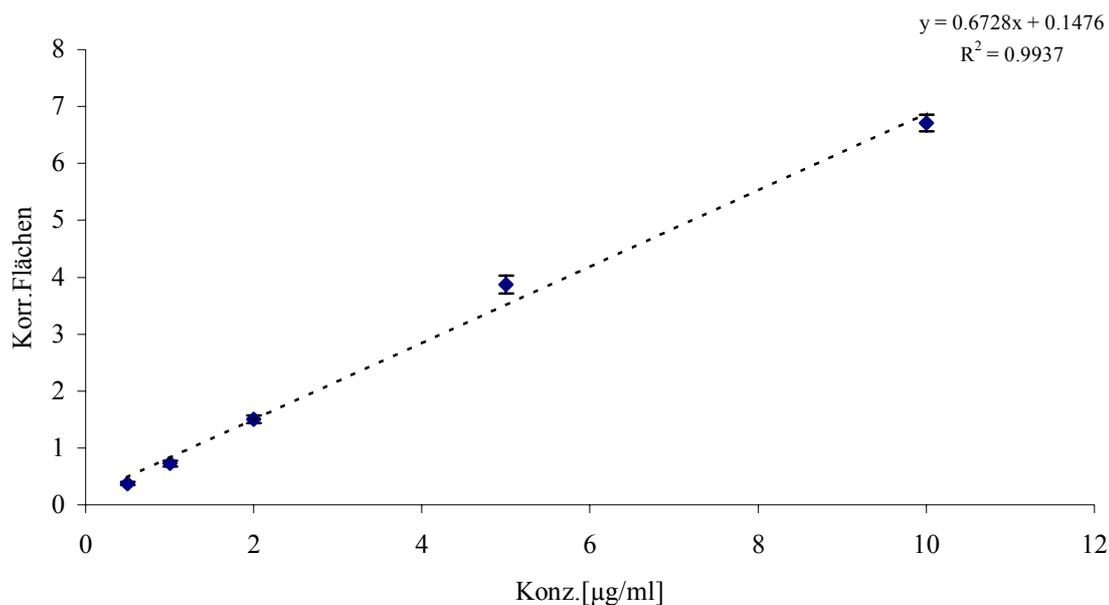
DB 1 Kapillare: 37/30 cm Länge; 100 µm i.D.  
 Temperatur: 25 °C  
 Trennbedingung: 4kV konstant  
 Injektion: elektrokinetisch  
 Detektion: 254 nm  
 Puffer: 1 % HPMC in TBE  
 Polung: invers, Anode an Detektorseite

Konz. [µg/ml] Werte	0,5	1	2	5	10
1	0,43158	0,79171	1,59582	4,08553	6,81919
2	0,37491	0,78064	1,5645	3,99095	6,47795
3	0,35984	0,70826	1,4836	3,81995	6,8393
4	0,35661	0,65556	1,48733	3,81346	6,82177
5	0,3511	0,69906	1,38936	3,63633	6,58642

Mittelwert	0,374808	0,727046	1,504122	3,869244	6,708926
Standardabw.	0,02946302	0,05157544	0,07201037	0,15580929	0,14849036
rel. Abw.%	7,86	7,09	4,79	4,03	2,21

Wie zu erwarten, fiel die Standardabweichung bei geringeren Konzentrationen etwas größer aus.

Diese Werte ergaben folgenden linearen Verlauf über eine Konzentrationsspanne von 0,5 – 10 µl/ml:



Die Hilfe dieser Daten konnte auch die Stabilität der Migrationszeiten überprüft werden. Die Migrationszeit kann sich verändern, wenn die Belegung der Kapillare altert oder der Puffer verbraucht ist.

Konz [µg/ml]	0,5	1	2	5	10
Zeit [min]	11,976	11,908	11,835	11,805	11,782
	12,008	11,917	11,852	11,823	11,778
	12,027	11,931	11,867	11,835	11,784
	12,057	11,949	11,883	11,86	11,809
	12,095	11,966	11,909	11,87	11,826

Mittelwert	12,0326	11,9342	11,8692	11,8386	11,7958
Standardabw	0,0408147	0,02108459	0,02547469	0,02378739	0,01861612
rel. Abw.%	0,34	0,18	0,21	0,20	0,16

Die geringen Abweichungen lassen auf eine stabile Beschichtung der käuflich erworbenen DB-1 Kapillare schließen. Gleichzeitig beweist die Konstanz der Ergebnisse über den gesamten Meßzeitraum, dass das gesamte System stabil ist.

## LIF-Detektion mit YOPRO

Da die Mengen der DNA-Fragmente, die man bei der Kapillarelektrophorese trennt, oft sehr klein sind, kann man auf die Detektion mittels LIF zurückgreifen. Die Detektion erfolgt bei 520 nm. Der verwendete Puffer enthielt 4 nM YOPRO I als interkalierenden Laserfarbstoff, dadurch erhöht man die Nachweisgrenze von dsDNA erheblich im Vergleich zu der UV-Detektion<sup>[101]</sup>. Die ungebundene Konzentration dieses Cyaninfarbstoffes ist vernachlässigbar, da die Verstärkung der Fluoreszens bei Bindung an DNA um das 400- bis 1800-Fache beträgt<sup>[102]</sup>.

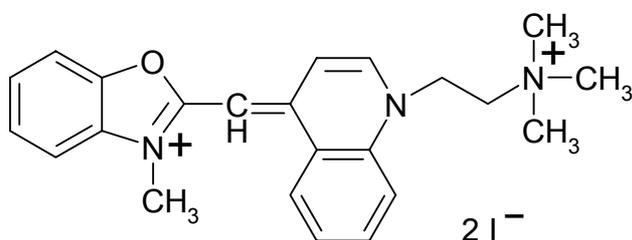
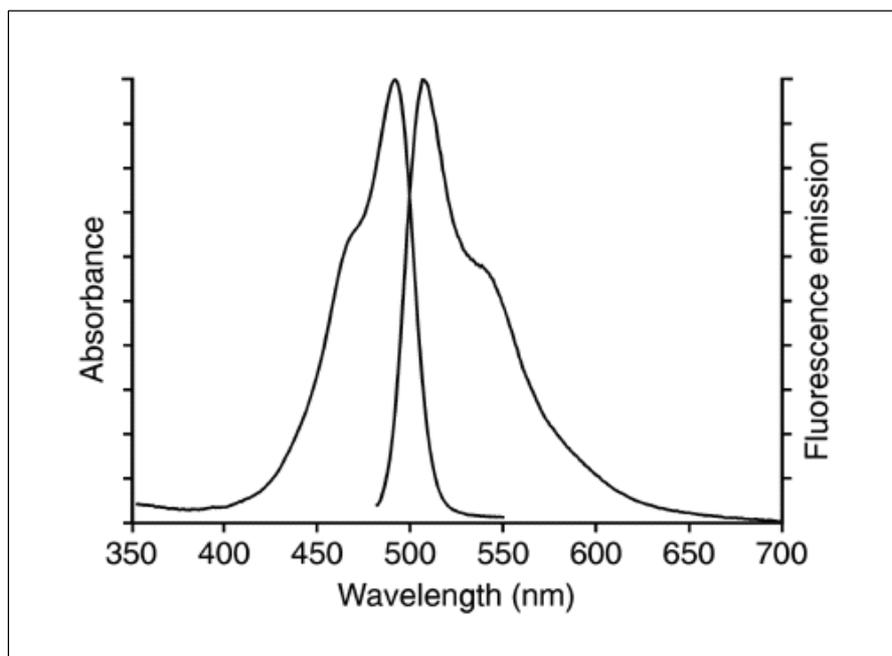


Abbildung 26: YOPRO I

Der dsDNA-YOPRO I-Komplex hat folgende Spektrum.



Bei jeder Änderung des Messsystems muß der Verstärker des Detektors neu eingestellt werden. Dazu benutzt man eine  $10^{-7}$  M Fluorescein-Na Lösung.

Fünf aufeinanderfolgende Messungen wurden zur Auswertung herangezogen:

Lauf	korr. Peakflächen	Höhen	Zeit
1	4925,01	26,01	13,46
2	4706,72	17,25	13,53
3	3774,55	17,19	13,63
4	4463,41	20,23	13,64
5	4508,72	18,29	13,62
Mittelwert	4475,682	19,794	13,576
Standardabw.	432,46	3,69	0,08
Rel. Standardabw.	9,66%		

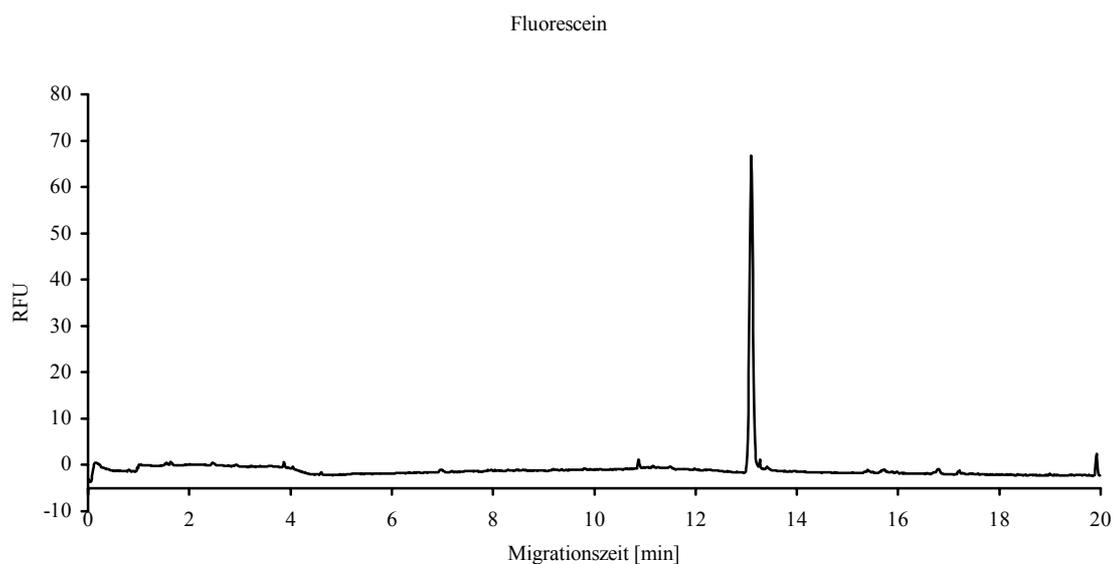


Abbildung 27: Elektropherogramm von einer  $10^{-7}$  M Fluorescein-Na Lösung, 5kV, 5 sec

Die Verstärkung wurde auf 10 PMT gesetzt.

## Zellkultur

### Material

Erste Voraussetzung zur erfolgreichen Zellzucht ist eine sterile Werkbank. Hier werden unter sterilen Bedingungen alle Arbeiten mit lebenden Zellen durchgeführt. Vor dem Arbeitsbeginn an der Sterilbank wird die Arbeitsfläche mit 70 % (v/v) Ethanol oder 45 % (v/v) n-Propanol gründlich gereinigt und anschließend auch die Hände oder Handschuhe.

Alle verwendeten Materialien, die mit Zellen in Kontakt kommen, müssen steril sein. Diese werden zum Teil als Einmalartikel steril bezogen oder selbst sterilisiert. Je nach Material werden verschiedene Techniken angewandt. Beim Autoklavieren wirkt feuchte Hitze für 20 min bei 121° C und 200 kPa auf das zu sterilisierende Gut ein. Trockene Hitze wird oft zur Sterilisation von Glasgeräten verwendet. Dafür wird in einem Trockenschrank auf 180° C erhitzt und diese Temperatur für zwei Stunden aufrecht erhalten.

Die verwendeten 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen (Fa. TPP) werden steril bezogen und sind aus Polystyrol. Sie sind mit einem Schraubverschluß ausgestattet, der im Brutschrank, durch eine Vierteldrehung geöffnet, einen optimalen CO<sub>2</sub>-Austausch gewährleistet.

Der Brutschrank Fa.Heraeus ist auf 37° C, 5 % CO<sub>2</sub> und auf gesättigte Luftfeuchtigkeit eingestellt.

### Medien

Alle verwendeten Grundmedien werden als gebrauchsfertige Lösungen bezogen. Sie setzen sich in der Regel aus Aminosäuren, Vitaminen, sonstigen Substanzen und einem anorganischen Puffergemisch zusammen<sup>[103]</sup>. Diese komplexe Zusammensetzung versucht die *in vivo* Umgebung der Zellen zu simulieren, damit Proliferation, Differenzierung und eventuell Ausübung typischer Zellfunktionen *in vitro* möglich ist.

Um das Medium für den jeweiligen Zelltyp weiter zu optimieren, können weitere Zusätze den Grundmedium zugesetzt werden. Ein besonders wichtiger Zusatz sind Antibiotika, die eine Kontamination mit anderen Mikroorganismen verhindern. In der Regel wird eine Kombination von Penicillin/Streptomycin eingesetzt, in einer Endkonzentration von 100 µg/ml Streptomycin und 100 IU/ml Penicillin. Die käuflich erworbenen Lyophilisate werden in sterilem Wasser gelöst. Diese Stammlösung wird aliquotiert und eingefroren, da Penicillin in wässrigen Lösungen rasch inaktiv wird.

Wichtig für ein optimales Wachstum über einen längeren Zeitraum ist ein Zusatz von tierischem oder menschlichem Serum. Die darin enthaltenen Wachstumsfaktoren sind komplex zusammengesetzt, Art und Konzentration unbekannt und schwer zu ersetzen. Seit umfassenden Untersuchungen von Sato<sup>[104]</sup> sind synthetische Ersatzstoffe bekannt, die das äußerst komplexe Serum ersetzen können. In der Regel wird fetales Kälberserum verwendet, das Hormone, Bindungsproteine, Aminosäuren, anorganische Salze, Albumin, aber auch Umweltgifte und Bakterien enthalten kann. Die Hitzeinaktivierung von Serum erfolgt unter Rühren oder Umschütteln bei 56 °C für 30 min und inaktiviert das Komplement-System, das in der Regel einen Störfaktor bei der Zellkultivierung darstellt.

## **Routinemethoden zur Subkultivierung von Zellen**

### **Mediumwechsel bei Monolayerkulturen**

Mediumwechsel dient zur Erneuerung der Nährstoffe im Medium und der Entfernung der Stoffwechselprodukte der Zellen. Der Wechselrhythmus richtet sich nach Zelllinie und deren Wachstumsgeschwindigkeit. Das alte Medium wird mit Pipetten entfernt und durch frisches, auf 37 °C erwärmtes Medium, ersetzt.

### **Passagieren von Monolayerkulturen**

Füllen adhärente Zellen den gesamten Boden der Kulturflasche aus, sinkt die Proliferationsrate stark und kann zum Absterben der Kultur führen. Durch Passagieren, d.h. Zellen unter Verdünnung in ein neues Gefäß überführen, kann man Zelllinien über einen längeren Zeitraum kultivieren. In der Regel werden adhärente Zellen nach Entfernen des Mediums mit vorgewärmten PBS-Puffer, möglichst ohne Calcium und Magnesium, gewaschen und mit einer Trypsin-EDTA Lösung behandelt. Diese Lösung enthält proteolytische Enzyme, die Ablösung und Trennung der Zellen zur Folge hat. Dieser Vorgang sollte unter einem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert werden. Der Vorgang ist beendet, wenn die Zellen abgerundet in der Trypsinierungslösung schwimmen. Die Ablösung und Trennung der Zellen kann durch vorsichtiges Klopfen auf einer Kante der Kulturflasche unterstützt werden. Die Zellen werden in neuem Medium aufgenommen, gezählt und in neue Kulturflaschen nach einem Verdünnungsfaktor, der für jede Zelllinie bestimmt werden muss, ausgesät.

## Zellzahlbestimmung

Gerade bei adhärennten Zellen spielt die ausgesäte Zellzahl eine entscheidende Rolle. Zu dünn ausgesäte Zellen wachsen äußerst langsam, zu dicht ausgesäte Zellen müssen zu oft subkultiviert werden, was die Gesamtlebenszeit der Zelllinie verkürzt. Um die Zellzahl zu bestimmen, wird Zellsuspension auf ein Hämocytometer, hier eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Diese besteht aus neun großen Quadraten, jedes mit einer Fläche von  $1 \text{ mm}^2$ . Bei einer Tiefe von  $0,1 \text{ mm}$  ergibt sich ein Volumen pro Quadrat von  $0,1 \mu\text{l}$ . Es werden mindestens vier Großquadrate ausgezählt und der Mittelwert berechnet.

$$\text{Zellen/ml} = \frac{\text{Mittelwert}}{\text{Zahl} \cdot \text{der} \cdot \text{Quadrate}} \cdot 2 \cdot 10^4 \text{ ml}^{-1} \quad \text{Gleichung 38}$$

Gleichzeitig kann man bei der Zählung eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen vornehmen. Hierfür werden  $20 \mu\text{l}$  Zellsuspension mit  $20 \mu\text{l}$  Trypanblau-Lösung gemischt und bei Raumtemperatur circa  $5 \text{ min}$  inkubiert. Während lebende Zellen den Farbstoff ausschließen und im Mikroskop hell erscheinen, nehmen tote Zellen, durch geschädigte Zellwand, Farbstoff auf und erscheinen blau gefärbt.

## Kryokonservierung von Zellen

Es empfiehlt sich immer benutzte Zelllinien in Dauerlagerung zu halten, um bei eventueller Kontamination oder Überalterung der Kultur, auf „neue“ Zellen zurückgreifen zu können. Die Zellen werden in flüssigem Stickstoff bei  $-196 \text{ °C}$  gehalten. Als Schutzsubstanzen werden Glycerin und DMSO dem Medium zugesetzt, die eine Kristallbildung innerhalb und außerhalb der Zelle sowie eine Dehydratation des Cytoplasmas verhindern. Die gewaschenen, abgelösten Zellen werden in dem „Einfriermedium“ aufgenommen, in  $1,5 \text{ ml}$  Kryoröhrchen über Nacht bei  $-80 \text{ °C}$  in einer Styroporbox schonend eingefroren und dann in den Aufbewahrungsbehälter mit flüssigem Stickstoff überführt.

Bei dem Auftauen solcher Kryokonserven ist es wichtig, das im Medium vorhandene DMSO möglichst schnell zu verdünnen. Die Kryoröhrchen werden im Wasserbad bei  $37 \text{ °C}$  aufgetaut und sofort mit vorgewärmten Medium gemischt. Nach Zentrifugation,  $5 \text{ min}$  bei  $1000 \text{ U/min}$  wird das Pellet in Kulturmedium resuspendiert und die Zellen in die Kulturflasche überführt.

## Test auf Mykoplasmenkontamination

Mykoplasmen sind die kleinsten sich selbst vermehrenden Prokaryonten. Ihre Größe variiert zwischen 0,22  $\mu\text{m}$  und 2  $\mu\text{m}$ , sie können also die üblichen Sterilfilter der Porengröße 0,2  $\mu\text{m}$  passieren. Eine Kontamination mit Mykoplasmen sind häufig langandauernd, da sie in der Regel keine dramatischen Effekte in der Zellkultur bewirken und deshalb lange unentdeckt bleiben.

Um eine mögliche Kontamination der Zellkultur mit Mykoplasmen zu erkennen, werden die Zellen mit DAPI<sup>[105]</sup> gefärbt. DAPI ist ein Farbstoff, der mit der DNA interagiert und dann im Fluoreszenzmikroskop hellblau leuchtet. In wässrigen Lösungen hat DAPI ein Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 340 \text{ nm}$  und ein Emissionsmaximum bei  $\lambda = 488 \text{ nm}$ . Normalerweise erkennt man nur die Zellkerne, bei einer Kontamination sind zusätzlich fluoreszierende Granula zu erkennen, die sich wie Spinnweben das Cytoplasma der Zellen durchziehen.

Die Durchführung dieser Methode ist relativ einfach, man kultiviert Zellen in einer kleinen Kunststoffpetrischale, nach Abziehen des Mediums und Waschen mit PBS-Puffer erfolgt eine Inkubation mit der Färbelösung über 15 min bei Raumtemperatur. Nach Entfernen der Lösung wird mehrmals mit PBS-Puffer gewaschen. Ein Deckglas auf die Kultur legen und im Fluoreszenzmikroskop mit dem Ölimmersionsobjektiv bei einer Wellenlänge von 488 nm betrachtet.

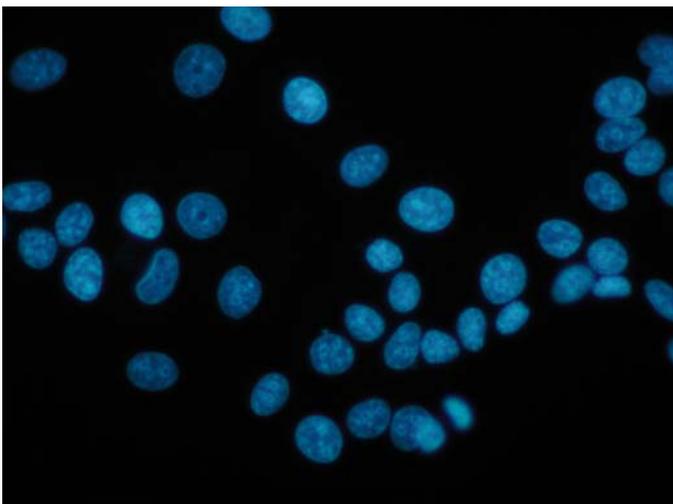


Abbildung 28: Mykoplasmenfreie Zellkultur

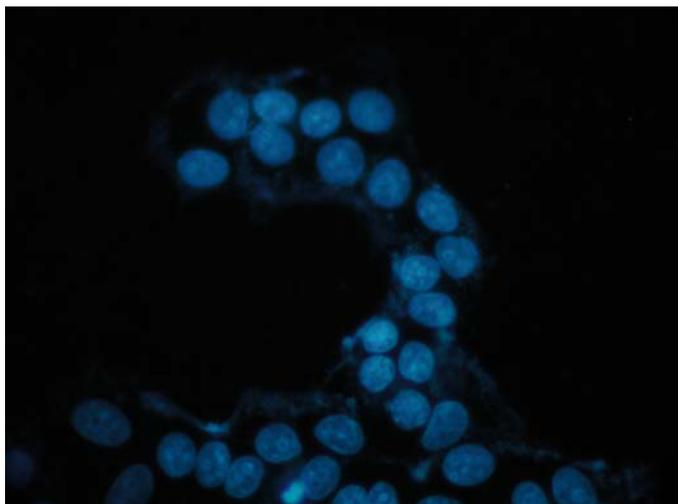


Abbildung 29: Mykoplasmenverseuchte Zellkultur

Bei einer Routineuntersuchung wurde eine Mykoplasmenkontamination festgestellt. Da auch die Kryokonserven infiziert waren, wurde eine Antibiotikabehandlung durchgeführt. Mit BM-Cyclin der Fa. Roche erfolgt eine vollständige Eliminierung der Mykoplasmen. Die Behandlung erfordert meist drei Behandlungszyklen. Bei jedem Zyklus werden die Zellen drei Tage lang mit BM-Cyclin 1 im Medium und danach vier Tage mit BM-Cyclin 2 im Medium kultiviert. BM-Cyclin 1 enthält ein Pleuromutilin-Derivat und BM-Cyclin 2 ein Tetracyclin-Derivat. Empfohlene Endkonzentrationen sind für BM-Cyclin 1 10 µg/ml und für BM-Cyclin 2 5 µg/ml. In diesen Konzentrationen beeinflussen die Antibiotika nicht das Wachstum der Zellen. In der Regel sind schon nach zwei Zyklen die Mykoplasmen im Fluoreszenzmikroskop nicht mehr nachweisbar. Es sollte ein weiterer Zyklus durchgeführt werden. Für eine genauere Erkennung der Mykoplasmenkontamination wurde eine spezifische PCR in die Laborroutine etabliert.

### **Etablierung einer PCR-Methode zur Detektion von Mykoplasmen**

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde von Mullis entdeckt<sup>[106]</sup> und erlaubt innerhalb einer bestimmten Zeit eine ganz bestimmte Zielsequenz millionenfach zu vervielfältigen. Als Matrize dient ein DNA-Fragment. Zwei kurze, synthetische Oligonukleotide (Primer), die komplementär an dieses Fragment binden, bestimmen die gewünschte Zielfragmentgröße. An das 3'OH-Ende der Primer kann das thermostabile Enzym Taq-Polymerase den Kettenaufbau durch Einbau von dNTPs beginnen und den Strang kopieren. Für die PCR sind drei, durch unterschiedliche Temperatur gekennzeichnete Schritte nötig:

- Denaturierung des DNA-Doppelstranges bei 92 °C-98 °C
- Anheftung der Primer an die komplementäre Sequenz auf der Ziel-DNA bei 37 °C-70 °C
- Synthese des fehlenden Strangs durch die Taq-Polymerase bei 72 °C.

Diese Schritte werden als Serie zwischen 24-40 x wiederholt, um eine exponentielle Anreicherung der Zielsequenz zu erreichen.

Die Zykluseinstellung am PCR-Gerät MWG Biotech Primus lautet:

- 1 Zyklus      5 min 94 °C  
                  3 min 72 °C  
                  45 sec 94 °C  
                  45 sec 55 °C
- 40 Zyklen    3 min 72 °C  
                  45 sec 94 °C  
                  45 sec 55 °C
- 1 Zyklus      10 min 72 °C  
                  10 min 27 °C  
                  Hold 4 °C.

Die verwendeten Primer, die sogenannten Kuppevelde-Primer<sup>[107]</sup> begrenzen ein Fragment von 280 Basenpaaren. Die Primer haben folgende Sequenz: der Vorwärtsprimer GPO-3 (5'-GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT-3') und der rückwärtige Primer MGSO (5'-TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC-3').

Besonderer Vorteil dieser Methode ist, dass der Überstand der Zellkultur verwendet werden kann. Man spart sich die Isolierung der DNA. Als Probe dient Zellkulturüberstand, der 5 min bei 95 °C inkubiert und 1:10 mit Wasser verdünnt wird.

Zur Durchführung der PCR wurden folgende Mengen je Ansatz in PCR-Tubes vorbereitet:

- Wasser                                    29,5 µl
- Taq-Puffer NH<sub>4</sub><sup>+</sup>                        5,0 µl

- $\text{MgCl}_2$  25 mM 3,0  $\mu\text{l}$
- dNTP Mix 10 mM 0,25  $\mu\text{l}$
- Primer GPO (50 pmol/ $\mu\text{l}$ ) 1  $\mu\text{l}$
- Primer MGSO (50 pmol/ $\mu\text{l}$ ) 1  $\mu\text{l}$
- Invitaaq™-Polymerase 0,2  $\mu\text{l}$
- Probe 1:10 10  $\mu\text{l}$

### Flachbettgelelektrophorese

In 2 %-igen Agarosegelen kann man die Größe und Menge der PCR-Produkte überprüfen. Dazu wird die Agarose in 1xTBE-Puffer unter Kochen gelöst und 1  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromid-Stammlösung zugegeben. Das ausgehärtete Gel wird in ein Flachbett-Tank eingesetzt und mit Puffer überschichtet. Um die Größe der Produkte zu überprüfen, wurden 2  $\mu\text{l}$  einer DNA-Leiter (100-1000 bp) mit TE-Puffer sowie 2  $\mu\text{l}$  Ladepuffer gemischt. 10  $\mu\text{l}$  DNA-Probe werden auch mit 2  $\mu\text{l}$  Ladepuffer versetzt. Jede Mischung wird in eine Geltasche eingefüllt und im elektrischen Feld bei 85 V ca. 70 min aufgetrennt. Die DNA-Ethidiumbromid-Komplexe werden anhand ihrer Fluoreszenz auf dem Transilluminator detektiert.

Eine Positivkontrolle wurde vom Robert Koch Institut aus Berlin erhalten. Es handelte sich um Medienüberstand mykoplasmeninfizierter Zellen. Als Marker wurde eine 1000 Basenpaarleiter verwendet, wobei das 500 bp Fragment doppelt so stark konzentriert ist.

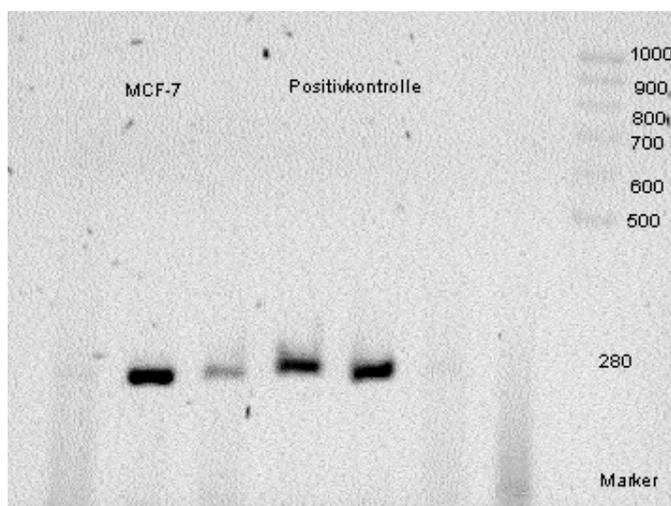


Abbildung 30: Beispiel eines Gels mit Positivkontrolle und MCF-7 Mykoplasmenverseucht, Marker

In der Abb. 30 erkennt man deutlich die Kontamination der Zellen. Die Antibiotika-behandlung mit BM-Cyclin ist in der nachfolgenden Abbildung zu sehen. Man erkennt deutlich die Abnahme der Konzentration des 280 bp Fragmentes. Die auftretende schwache Bande nach der dritten Woche führte zu einer Verlängerung der Behandlungsdauer um eine Woche.

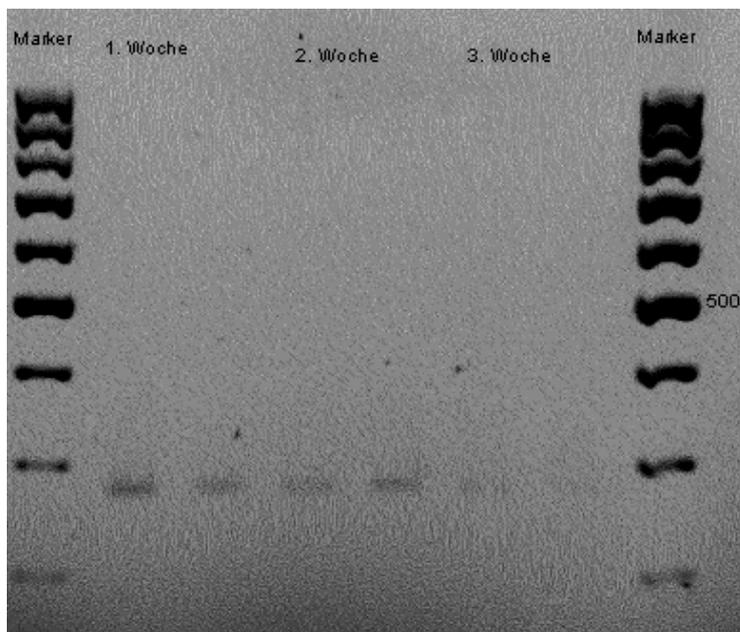


Abbildung 31: Beispiel eines Gels mit MCF-7 Antibiotikabehandlung 1Woche, 2 Wochen, 3 Wochen; Marker

Nach insgesamt 4 Wochen Antibiotikabehandlung konnte die Mykoplasmenfreiheit der MCF-7 Zellen gezeigt werden und die Experimente fortgeführt werden.

## Zelllinien

Die verwendeten MCF-7 Zellen wurden von der Arbeitsgruppe Steinhilber, Institut für Pharmazeutische Chemie, Frankfurt am Main zur Verfügung gestellt. Es handelt sich hierbei um eine Brustkrebs-Zelllinie, die von einer 69-jährigen Kaukasierin etabliert wurde<sup>[108]</sup>. Die Zellen wachsen adhärent. Das verwendete Kulturmedium ist DMEM welchem 10 % FCS, 1 ml Penicillin/Streptomycin und 1 ml nichtessentielle Aminosäuren (der Fa. ATCC) zugesetzt werden. Die Passagierung erfolgt 2-3 mal in der Woche mit Trypsin-EDTA. Für spätere Untersuchungen wurde auch RPMI 1640- Medium mit Zugabe von 10 % FCS, 1 ml Penicillin/Streptomycin und 1 ml nichtessentiellen Aminosäuren

verwendet, nach Vorschriften des DSMZ. Bei der Umsetzung wurden immer  $5 \times 10^5$  Zellen ausgesät.

Die C6-Glioma-Zellen stammen aus der Tumorbank des DKFZ in Heidelberg. Diese Zellen wurden aus einem Rattenhirntumor etabliert<sup>[109]</sup>. Als Kulturmedium kommt RPMI 1640-Medium in Frage, supplementiert mit 10 % FCS, 1 ml Penicillin/Streptomycin. Die wöchentliche Umsetzung erfolgt 2-3 mal unter Zugabe von Trypsin-EDTA.

Die Kultur beider Zelllinien erfolgt bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.

## Apoptoseinduktion

### Etoposid:

Etoposid chemisch auch 4'-Desmethylepipodophyllotoxin 9-(4,6-O-ethylidene-beta-D-glucopyranoside) C<sub>29</sub>H<sub>32</sub>O<sub>13</sub>, ist ein Topoisomerase II Inhibitor, bewirkt also Doppelstrangbrüche der DNA und verhindert die Strangentdrillung<sup>[110, 111]</sup>. Etoposid blockiert den Zellzyklus in der S-Phase und der G2-Phase<sup>[112, 113]</sup> und induziert Apoptose in einer Vielzahl von „normalen“ und Krebszelllinien.

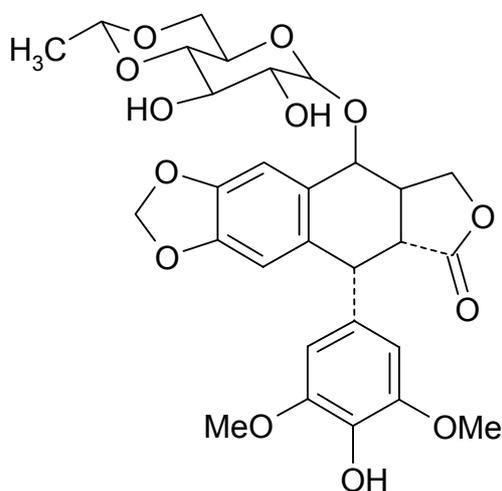


Abbildung 32: Etoposid

Als Induktor von Apoptose wurde Etoposid in einer Konzentration von 10 µmol/l verwendet, dabei wurden 4 µl der Stammlösung pro ml Kulturmedium zugesetzt.

## Proliferationstest

Vitale Zellen schließen Neutral Rot in ihre Lysosomen ein, weshalb dieser Test herangezogen wird, um lebende Zellen zu bestimmen. Neutral Rot ist ein lipophiler Farbstoff folgender Struktur:

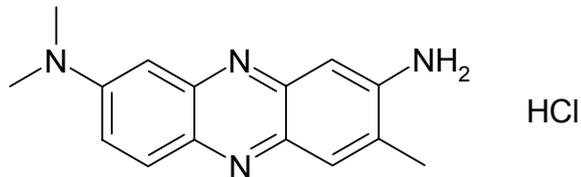


Abbildung 33: Neutral Rot

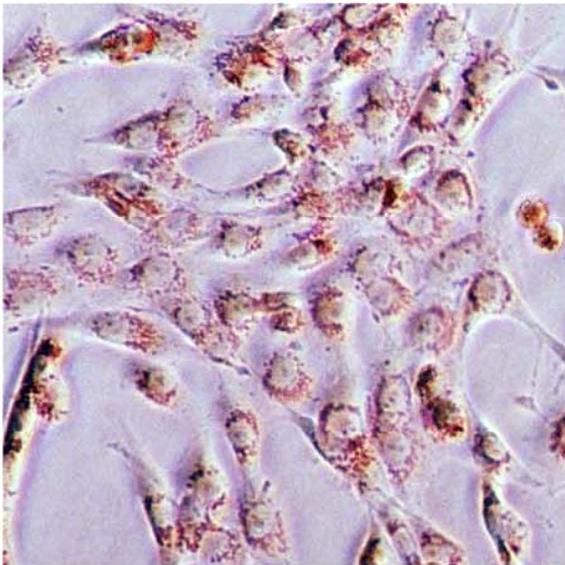


Abbildung 34: Mikroskopieaufnahme mit Neutral Rot angefärbten Zellen

Nach Beendigung der Inkubation wurde das Nährmedium entfernt und durch 500  $\mu$ l Neutral Rot Lösung ersetzt und für weitere zwei Stunden im Brutschrank aufbewahrt. Nach Waschen mit 37 °C warmen PBS-Puffer wurde zu den Zellen 500  $\mu$ l Lysepuffer gegeben und die Lyse der Zellen durch leichtes Schütteln unterstützt. Danach wurden 100  $\mu$ l in eine 96-Well Platte überführt und die Absorption bei 520 nm, gegen den Lysepuffer gemessen. Wurden die Zellen in serumhaltigen Medium kultiviert, erfolgte vor Anfärben ein Spülschritt mit serumfreien Medium.

## Viabilitätstest von Zellen

Trypanblau ist ein hochmolekularer Farbstoff, der in die Zellen nicht eindringen kann, außer wenn die Zellmembran beschädigt ist, also die Zellen „tot“ sind.

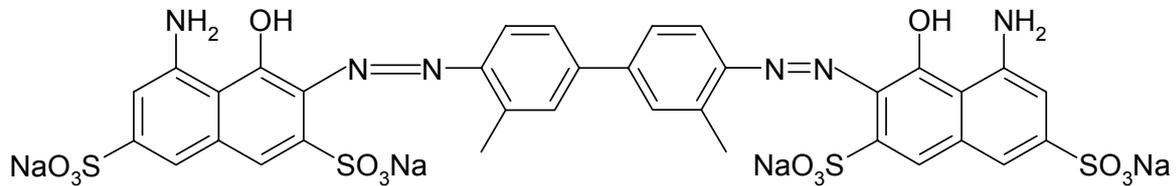


Abbildung 35: Trypanblau

Diese Methode ist zum Einen eine Zählhilfe und zum Anderen eine Methode um die Viabilität der Zellen zu beurteilen. Nach Ablösen der Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung wurde 20 µl der Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau-Lösung gemischt in die Zählkammer gebracht und unter Mikroskop gezählt.

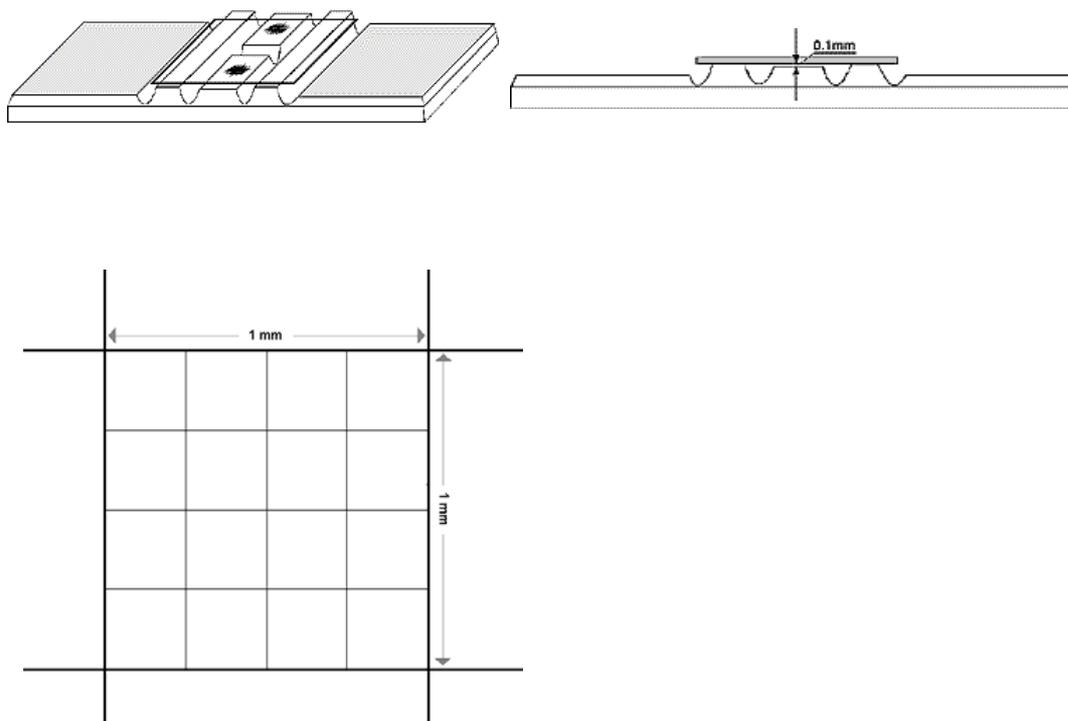


Abbildung 36: Neubauer Zählkammer

Es wurde die Summe der Zellen/ml und die Anzahl lebender Zellen/ml bestimmt. Vitale Zellen erscheinen unter Mikroskop hell, während tote Zellen durch die Disintegrität der

Zellwand Farbstoff aufnehmen und blau gefärbt erscheinen. Es werden mindestens vier Großquadrate ausgezählt

$$\text{Zellen / ml} = \frac{\text{Mittelwert}}{\text{Zahl} \cdot \text{der} \cdot \text{Quadrate}} \cdot 2 \cdot 10^4 \text{ ml}^{-1} \quad \text{Gleichung 39}$$

### Zellkernanfärbung mit Hoechst No. 33258

Das Anfärben der Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff unterstützt die Erkennung apoptotischer Zellkerne, die sich durch „apoptotic bodies“ auszeichnen.

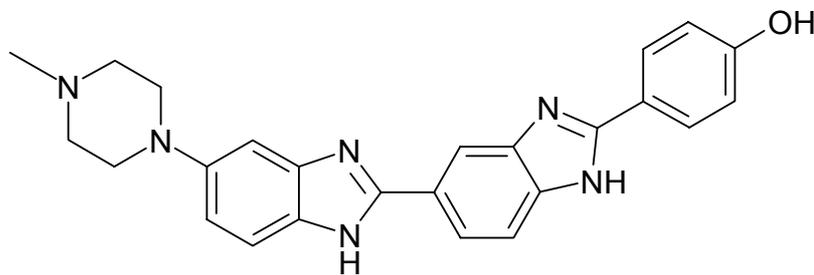


Abbildung 37: Fluoreszenzfarbstoff Hoechst No. 33258

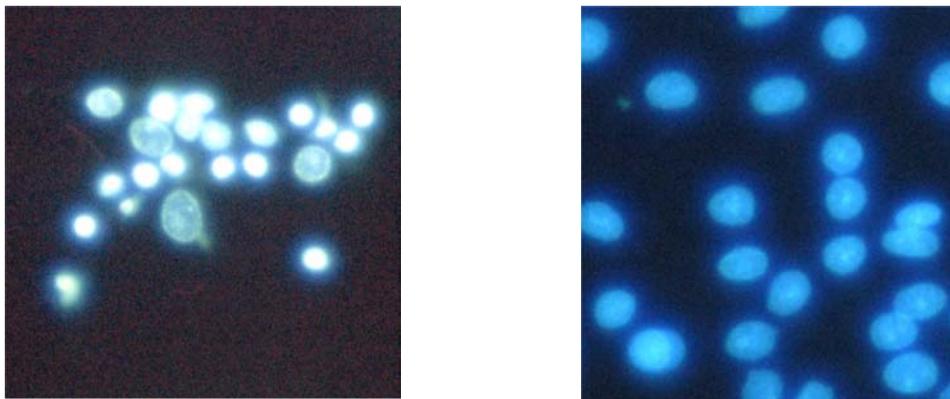


Abbildung 38: Mikroskopische Aufnahmen vom: Links apoptotische Zellkerne, sie erscheinen geschrumpft und hell leuchtend, Rechts Zellkerne vitaler Zellen, Vergrößerung 400X

Vor der Färbung wurde in jedes Well 500 µl PBS-Puffer gegeben und 10 min bei Raumtemperatur gehalten. Danach wurden 500 µl Hoechst No. 33258 zugegeben und unter Lichtausschluss 15 Minuten inkubiert. Nach Abziehen der Färbelösung wurde unter

Zugabe von einem Tropfen Geltol ein Deckglas aufgesetzt. Bei 365 nm sind die Zellkerne blau zu erkennen. Davon wurden repräsentative Aufnahmen, bei einer Vergrößerung von 400 x gemacht und die Auswertung der apoptotischen Kerne erfolgte durch Zählung auf einem Foto.

## Isolierung genomischer DNA

Die Extraktion der genomischen DNA der Zellen erfolgte mit dem DNA-Extraktionskit der Firma Invitex (Invisorb®Spin Cell Mini Kit). Das Prinzip der Extraktion ist, dass nach Lyse der Zellen, das Lysat mit einem „Carrier“-Puffer versetzt wird. Die DNA bindet spezifisch die Trägermoleküle. Es folgen verschiedene Wasch- und Zentrifugations-schritte und am Schluss wird die DNA mit einer Pufferlösung oder Milli Q Wasser eluiert.



Abbildung 39: Schema Isolierung DNA mit Invisorb®Spin Cell Mini Kit

Eine weitere Methode zur Extraktion von genomischer DNA erfolgte nach folgendem Standard Protokoll.

Um wirklich alle Zellen zu erfassen, wurde auch der Überstand der Zellen wurde in ein 10 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 5000 U/min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit PBS-Puffer gewaschen. Die adhärennten Zellen wurden mit einem Zellwischer abgelöst, zentrifugiert und gewaschen. Beide Pellets wurden vereinigt und bei 5000 U/min 10 min zentrifugiert. Um eine Trypanblau-Anfärbung durchführen zu können,

wurde das Pellet in PBS-Puffer resuspendiert und ein Aliquot abgenommen. Der Rest wurde erneut einer Zentrifugation unterzogen. Das erhaltene Pellet wurde mit 500 µl Lysepuffer versetzt. Es folgte die Zugabe von 100 µl Proteinase K-Lösung und 250 µl RNase Lösung und eine zweistündige Inkubation. Um Proteine zu entfernen erfolgte eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol Extraktion. Nach Zentrifugation wurde die wässrige Phase, die die DNA enthält, einer Natriumacetat-Fällung unterzogen. Nach Präzipitation der DNA, Trocknung im Exsiccator und Wiederaufnahme in Puffer erfolgte die Konzentrationsbestimmung durch Messung der OD-Werten. Die DNA wurde bei -20 °C gelagert oder sofort mit der Kapillarelektrophorese vermessen.

### DNA-Quantifizierung

Die Quantifizierung der DNA erfolgte photometrisch, nach der Methode von Maniatis et al. 1982<sup>[114]</sup>. Die optische Dichte (OD) der DNA-Lösung wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen und daraus wurde der Gehalt berechnet.

$$c[\mu\text{g} / \text{ml}] = OD_{260} \cdot V \cdot F \quad \text{Gleichung 40}$$

*V*: Verdünnungsfaktor; *F*: Faktor für DNA-Berechnung (50 für ds-DNA, 40 für RNA und 37 für ss-DNA)

Die Reinheit der DNA kann über das Verhältnis der Extinktionen bei 260 und 280 nm bestimmt werden. Bei der Wellenlänge von 280 nm liegt das Extinktionsmaximum der phenolischen OH-Gruppen von Proteinen. Der Koeffizient aus  $OD_{260}/OD_{280}$  nm gibt daher Aufschluss über Verunreinigungen mit Proteinen. Die DNA-Lösung wird als rein angesehen, wenn der 260/280 nm Koeffizient über 1,7 liegt<sup>[114]</sup>.

### Apoptoseinduktion in C6-Glioma-Zellen und MCF 7 Zellen

Die verwendeten C6-Glioma-Zellen wurden routinemäßig in RPMI Medium 1640 versetzt mit 1 ml Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Penicillin + 10000 µg/ml Streptomycin, => Endkonzentration: 100 U/ml bzw. 100 µg/ml; Gibco) und 10% fötales Kälberserum (hitzeinaktiviert, Gibco) in einer Atmosphäre von 95% Luft und 5% CO<sub>2</sub> 100% Luftfeuchtigkeit bei 37°C kultiviert.

Die MCF-7 Zellen wurden für diese Tests in RPMI 1640- Medium mit Zugabe von 10 % FCS, 1 ml Penicillin/Streptomycin und 1 ml nichtessentielle Aminosäuren herangezogen.

Für die vorliegenden Experimente wurden die Zellen trypinisiert und in eine 6-Lochplatte in einer Dichte von  $5 \times 10^5$  Zellen pro Loch ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Wachstumsmedium durch Medium mit 1% Serum ersetzt. Nach einer kurzen Phase wurde Etoposidstammlösung dazugegeben. Die Kontrollen wurden mit Vehikel versetzt. Nach 24 Stunden sahen die so behandelten Zellen äußerlich unbeschädigt aus im Vergleich zu der Kontrolle. Später erkannte man die Schädigung der Zellen, weil immer mehr Zellen sich von der Unterlage lösten und im Medium schwammen. Nach 48 Stunden wurden die Zellen inklusive den abgelösten Zellen geerntet, und die DNA mittels Invisorb® Spin Cell Mini Kit isoliert. Danach erfolgte eine Quantifizierung der DNA mittels UV-Absorption bei 260 nm und die Einstellung der Proben auf die gleiche DNA Konzentration. Es folgte die Messung der Proben mittels Kapillarelektrophorese oder die Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

---

## Verwendete Lösungen in der Zellzucht

MEDIEN:	DMEM: Dubelcos Modifiziertes Eagle Medium, Low Glucose (enthält L-Glutamin 1000 mg / ml, 25 ml HEPES, 2-Natriumpyruvat und Glucose)  RPMI 1640
PBS-PUFFER:	140 mM NaCl, 3 mM KCL, 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . Die Salze werden in einem entsprechenden Volumen Milli-Q-Wasser gelöst und 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert. Der pH sollte zwischen 7,2 und 7,4 liegen.
PENICILLIN/STREPTOMYCIN:	10000 U / ml Penicillin, 10000 µg / ml Streptomycin. Endkonzentration: 100 U / ml Penicillin bzw. 100 µg / ml Streptomycin  Nach Angaben des Herstellers das Lyophilisat unter der Sterilbank lösen und in Aliquoten bei -20 °C lagern.
TRYPsin-EDTA-LÖSUNG:	160 ml Aqua bidest werden mit 20 ml Trypsin-EDTA-Lösung (10x), 20 ml HBSS, 2 ml Heparin, 1 ml NaHCO <sub>3</sub> -Lösung 7,5 % und 1 ml Penicillin/Streptomycin gemischt. Die Lagerung erfolgt in Kühlschrank. Vor Gebrauch wird die Lösung auf 37 °C im Wasserbad erwärmt.
TRYPANBLAU-LÖSUNG:	0,5 % (w/v) Trypanblau, 0,9 % (w/v) NaCl.  0,25 g Trypanblau und 0,45 g NaCl in circa 40 ml PBS-Puffer lösen und nach Auffüllen auf 50 ml sterilfiltrieren. Bei Raumtemperatur lagern.
DAPI-STAMMLÖSUNG:	20 mg DAPI, 10 µl Triton X-100 und 18 mg NaCl werden in etwa 8 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 7,3 und

	2 mM MgCl <sub>2</sub> gelöst. Nach auffüllen auf 10 ml in Aliquots bei -20 °C lagern.
DAPI-FÄRBE LÖSUNG:	50 µl DAPI-Stammlösung werden mit 50 ml Methanol p.A. gemischt und bei -20 °C gelagert.
TBE-PUFFER:	89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 1 mM EDTA; pH-Wert zwischen 8,2 und 8,3
LADE-PUFFER:	Glycerol; Bromthymolblau; Xylencyanol
GELTOL:	6 g Glycerol und 2,4 g Mowiol® und 6 ml destilliertes Wasser werden gemischt. Nach zweistündiger Quellung 12 ml 0,2 M Tris-Puffer hinzugegen. Mit HCl auf pH 8,5 einstellen und mit Wasser auf 100 ml auffüllen. In einem Wasserbad (50 °C) 10 Minuten rühren und für 15 Minuten bei 5000 g zentrifugieren. Bei -20 °C ein Jahr haltbar, bei 4 °C 3 Monate.
HOECHST No. 33528:	0,8 µg / ml in PBS-Puffer
LYSE-LÖSUNG:	Mischung aus Ethanol 70% und Eisessig 99 + 1
NEUTRAL ROT LÖSUNG:	10 mg / ml in destilliertem Wasser
PROTEINASE K-LÖSUNG:	10 mg Proteinase K / ml PBS-Puffer
RNASE-LÖSUNG:	20 mg RNase A / ml in PBS-Puffer

---

## AUFGABENSTELLUNG

Ein wichtiges Feld in der Bioanalytik und pharmazeutischen Analytik ist der Nachweis von Biopolymeren bzw. Makromolekülen wie Nukleinsäuren, Proteinen und komplexen Polysacchariden. Besondere Bedeutung hat, spätestens nach Beginn des humanen Genomprojektes 1988, die Analytik von Genom und Transkriptom, d.h. von DNA und RNA, oder ganz allgemein von Nukleinsäuren, erhalten. Zusätzlich sind DNA- und RNA-Derivate seit den 1990er Jahren zu einer Klasse von potentiellen Wirkstoffen gereift. Ganz besonderes Aufmerksamkeit weckte in den letzten Jahren, neben den Antisense Oligonukleotiden, die small interfering RNA (siRNA, RNAi)<sup>[115]</sup>. Dies wird durch die große Anzahl von klinischen Studien dokumentiert, die DNA bzw. RNA als Wirkstoff einsetzen.

Klassische Methode für die Analyse von DNA bzw. RNA sind die Elektrophoresen in Polyacrylamid-Gelen (PAGE), und Southern- bzw. Northern-Plot Methoden. Sehr oft werden Polyacrylamidgele zur Trennung verwendet, obwohl das Monomer Polyacrylamid sehr toxisch ist und die Handhabung dieser Gele aufwendig ist. Außerdem ist die reproduzierbare Herstellung und die Handhabung der gegossenen Gele schwierig. Die Joulesche Erwärmung wächst quadratisch mit der Spannung über die Trennstrecke an, so dass eine effektive Kühlung unerlässlich ist, damit die Gele während der Analyse nicht austrocknen. Kleinere Feldstärken führen zu langen Analysenzeiten. Den gravierensten Nachteil der Elektrophorese stellt aber die Auswertung dar. Die Proben können nicht direkt analysiert werden, sondern die erhaltenen Banden müssen durch verschiedene Färbemethoden erst visualisiert werden, die eine densitometrische Auswertung der Ergebnisse ermöglichen.

Eine Alternative zu der Flachbettgelelektrophorese mit all ihren Nachteilen bietet die Kapillargelelektrophorese CGE. Wichtigster Fortschritt war vor allem die benötigte, geringe Probenmenge, was diese Methode für die Biotechnologie, klinische, diagnostische und forensische Anwendungen sehr interessant macht. Vorteile bieten außerdem die leichte Handhabung, die hohe Auflösung und Geschwindigkeit, die online-Detektion und die Automatisierungsmöglichkeiten.

Die Kapillarelektrophorese hat seit dem Beginn der 1980er Jahre deutlich an Stellenwert gewonnen, besonders seit kommerzielle Geräte zur Verfügung stehen.

Durch die Etablierung der PCR Technik in biologischen Laboren, die Festphasensynthese von Oligonukleotiden und massiver Grundlagenforschung am Genom ist der Bedarf an Techniken zur Trennung von Nukleinsäure und Nukleinsäureanaloga enorm gestiegen.

Die Aufgabenstellung dieser Arbeit war, die CGE als zeitgemäße Methodik zur Nukleinsäureanalytik weiterzuentwickeln. Es sollte ein Verfahren zum Nachweis und Trennung von Nukleinsäuren evaluiert und etabliert werden. Ziel war es ein System zu entwickeln, das man je nach Bedarf, ohne größere Probleme von nativen auf denaturierende Bedingungen umstellen kann, um möglichst ein breites Spektrum an Nukleinsäuren zu trennen.

Besonderes Interesse galt der Ablösung der chemisch gebundenen Kapillargelen durch flüssige Polymerlösungen. Zu Beginn der Arbeit waren nur wenige polymere Zusätze für die Trennung von Nukleinsäuren in der Kapillarelektrophorese bekannt. Käuflich erwerbbar Testkits enthielten Kapillaren mit fest gebundenen Gelen, deren Handhabung schwierig war und mit begrenzter Lebensdauer. Es sollten daher verschiedene Polymere auf ihre Eignung als Trennmedium für Nukleinsäuren getestet werden. Wichtig war eine einfache Handhabung bei der Herstellung und es sollten möglichst untoxisch und preiswerte Gelbildner zur Anwendung kommen.

Nach der Etablierung der Methode sollte deren Anwendung auf verschiedene pharmazeutische Fragestellungen übertragen werden. So stand die Reinheitsprüfung von Oligonukleotiden (primer), die Trennung und Charakterisierung von Antisense-Oligonukleotiden und der Nachweis von DNA-Fragmentation im Laufe der Apoptose im Vordergrund.

Des Weiteren sollte die etablierte Methode zur Entwicklung eines empfindlichen Standardassays zum Screening von Substanzen mit Apoptose-stimulierendem oder -inhibierendem Potential eingesetzt werden.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### Etablierung einer Standardmethode

#### Einfluss verschiedener Parameter auf die Nukleinsäure-Trennung in Polymerlösungen

Vor der Etablierung einer Standardmethode zur Trennung von Nukleinsäuren war es nötig, den Einfluss verschiedener Parameter auf die Auflösung und Effizienz der Methode herauszufinden. Dazu liefen verschiedene Vorversuche, in denen zum Teil aus der Literatur bekannte Parameter getestet und variiert wurden. Als Standard wurde ein Gemisch aus jeweils zwei Oligonukleotiden mit einer Länge von 20 bzw. 40 Basenpaaren verwendet.

#### Puffer

Als erstes wurde der Puffer variiert. Aus verschiedenen Publikationen waren verschiedene Pufferzusätze bekannt, wie z.B. TAPS, oder TBE verwendet. TAPS und TBE ergeben Puffer deren pH-Wert leicht alkalisch ist (8,2), was für die Trennung von Nukleinsäuren, die durch das Phosphatrückgrad negativ geladen vorliegen, vorteilhaft ist.

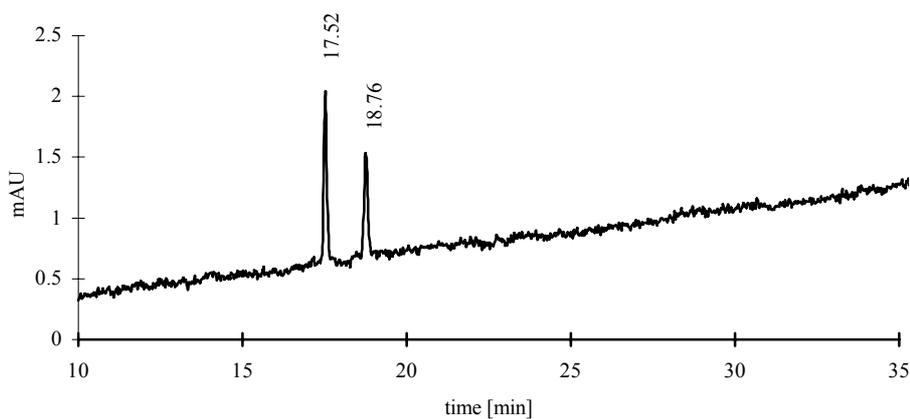


Abbildung 40: Trennung von 20-er und 40-er Oligomeren im 1 % HEC-TAPS-Puffer

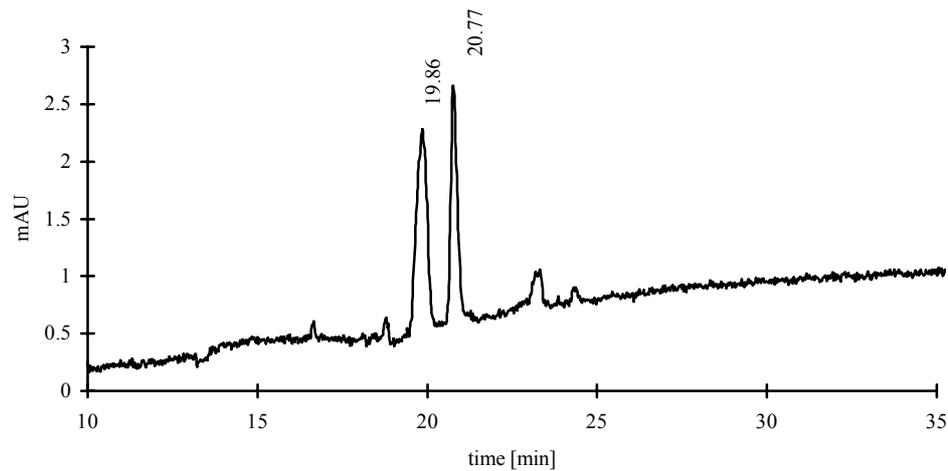


Abbildung 41: Trennung von 20-er und 40-er Oligomeren im 1 % HEC-TBE-Puffer

Die Auftrennung beider Oligomere in beiden Puffer führten zu zufriedenstellenden Ergebnissen. Ausschlaggebend für den weiteren Einsatz von dem TBE-Puffer war die bessere Haltbarkeit im Vergleich zum TAPS-Puffers sowie die etwas leichtere Herstellung. Ein weiterer Vorteil ist, dass sich im TBE-Puffer nicht spezifische DNA-Borat Komplexe<sup>[116]</sup> formieren, die um ca 20% schneller wandern als DNA Moleküle alleine, da die Borationen ein höheres Ladungs-Masse-Verhältnis aufweisen wie die DNA Basenpaare. Für die Puffersubstanz TAPS sind solche Phänomene nicht bekannt.

## Harnstoff

Bei der Trennung von Nukleinsäuren können denaturierende Bedingungen eine wesentliche Rolle spielen. Will man ssDNA-Fragmente trennen, so hat sich die Zugabe von Harnstoff in einer Konzentration von 7 M als vorteilhaft erwiesen<sup>[117]</sup>.

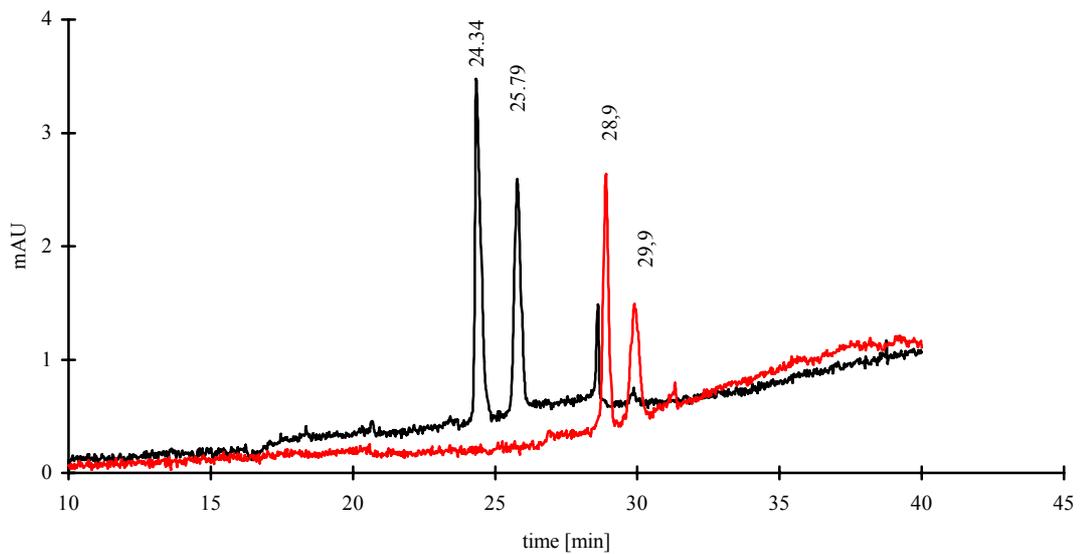


Abbildung 42: Verkürzung der Migrationszeiten durch Zugabe von Harnstoff

Außer dem denaturierenden Einfluss auf Nukleinsäurestränge, bewirkt der Harnstoff eine Verkürzung der Analysenzeit, bedingt durch eine Erniedrigung der Viskosität des Trennpuffers.

### **Veränderung der angelegten Spannung**

Die angelegte Spannung hat auch einen enormen Einfluss auf die Retentionszeiten der einzelnen Analyten. Eine höhere Spannung bewirkt ein stärkeres elektrisches Feld und damit eine schnellere Wanderung der beiden Oligonukleotide, allerdings wird die Auflösung schlechter.

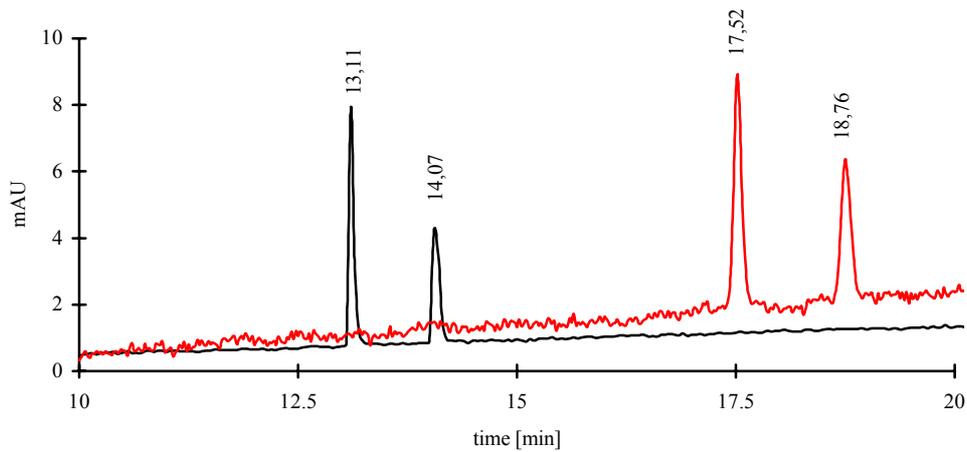


Abbildung 43: Verkürzung der Analysenzeit durch Erhöhung der Spannung bei 4 kV und 10 kV

Ein weiterer Nachteil bei zu hoch angelegten Spannungen liegt bei dem negativen Einfluss auf die Beschichtung der Kapillare. Die angelegte Trennspannung sollte ein Kompromiss zwischen diesen beiden Aspekten darstellen.

## Änderung der Meßtemperatur

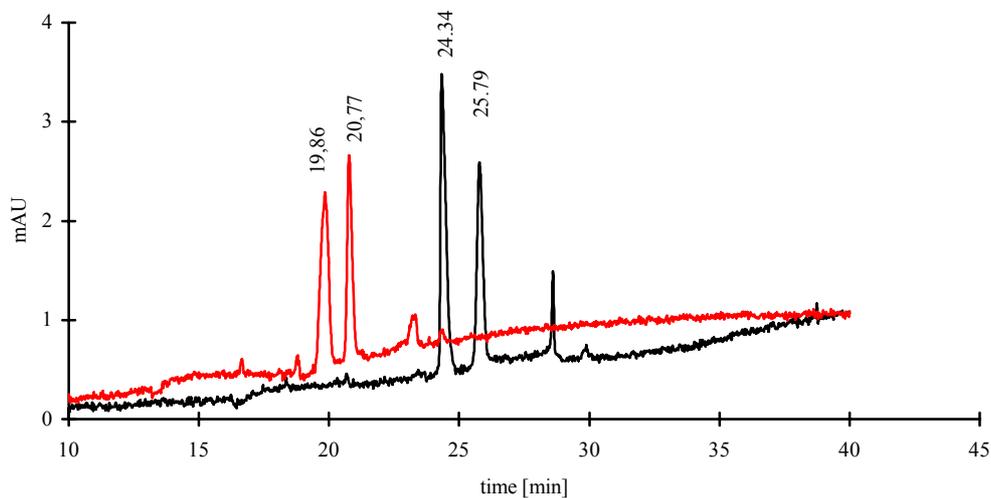


Abbildung 44: Einfluss der Temperatur auf die elektrophoretische Trennung bei 20 °C und 25 °C

Man erkennt, dass die Messtemperatur enormen Einfluss auf die Trennung von Nucleinsäuren hat. Eine Erhöhung der Temperatur führt über die Erniedrigung der Viskosität des Trennpuffers zu einer Verkürzung der Analysenzeit, allerdings unter Verlust an Trenneffizienz.

## **Spülschritte**

Ein weiterer wesentlicher Schritt zur Optimierung der Methode war die Festlegung der Spülschritte und –zeiten zwischen den einzelnen Trennungen. Folgende Vorgehensweise wurde am Ende festgelegt: nach einem Lauf folgte ein Spülschritt mit Wasser für zwei Minuten und vor der Injektion wurde die Kapillare jeweils zwei Minuten lang mit Methanol und Wasser gespült und danach fünf Minuten mit Puffer.

Nach diesen Vorversuchen wurden folgende Parameter für die Methode zur Trennung von DNA festgelegt:

Puffer: TBE

Temperatur: 20°C

konstante Spannung: 4 kV

elektrokinetische Injektion: 7,5 kV

## **Standardmethode**

Für alle folgenden Anwendungen wurde diese festgelegte Trennmethode verwendet:

- DB 1 Kapillare: 37/30 cm (Unterdrückung des EOF durch belegte Kapillare)
- inverse Polarität
- Durchmesser: 100 µm
- Temperatur: 20°C
- konstante Spannung: 4 kV
- elektrokinetische Injektion mit 7,5 kV
- Detektion: UV bei 254 nm (Detektor befindet sich bei der Anode)
- Spülung der Kapillare vor Injektion jeweils zwei Minuten lang mit Methanol und Wasser
- fünf Minuten Equilibrierung mit Puffer

---

## Testung verschiedener Cellulosederivate auf Eignung als Trennmatrix in der Kapillargelelektrophorese

In den letzten Jahren hat sich die Kapillarelektrophorese zur Analyse von Nukleinsäuren immer mehr durchgesetzt. Besonders vorteilhaft haben sich die hohe Auflösung, die hohe Sensitivität, aber auch die hohe Geschwindigkeit und die Automatisierung erwiesen. Die Einführung von austauschbaren Polymerlösungen anstelle der früher üblichen chemisch gebundenen Gele in den Kapillaren hat zu einem weiteren Schub in der Entwicklung und Anwendung der Trennmethode geführt.

Die starren, chemischen Gele unterliegen einer Biodegradation durch Hydrolyse besonders im leicht alkalischen pH-Bereich, der für die Trennung von Nukleinsäuren nötig ist. Außerdem sind diese Gele anfällig für Blasenbildung durch lokale Überhitzung oder die Injektion, so dass die Lebensdauer der Gelkapillaren zeitlich begrenzt ist.

Die Lösung der oben genannten Probleme bietet der Einsatz von Polymerlösungen<sup>[118]</sup>. Diese austauschbaren Gele lassen sich leicht nach jeder Trennung entfernen, man erreicht so immer vergleichbare Trennbedingungen bei jeder Messung einer Versuchsreihe. Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurden eine Reihe von Substanzen auf ihre Eignung als Gelbildner untersucht<sup>[119]</sup>. Von den getesteten Materialien haben sich neben synthetischen Substanzen wie lineare Polyacrylamide auch verschiedene natürliche Gelbildner, vor allem Cellulosederivate, durchgesetzt. Die bis zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit publizierten Ergebnisse ließen allerdings keine Systematik in der Auswahl der Gelbildner erkennen. Aus diesem Grund wurde versucht am Beispiel verschiedener Cellulosederivate eine Rationale in die Auswahl als Trennmatrix zu bringen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Trennmethode zur Trennung von kurzkettigen und langkettigen Nukleinsäuren entwickelt werden. Dazu wurden verschiedene Cellulosederivate auf ihre Trenneffizienz untersucht. Es interessierte uns vor allem die Frage, ob man über die einfach zu bestimmende kinematische Viskosität einer Polymerlösung auf die Trenneffizienz des Puffers schließen kann. Die „ideale“ Trennmatrix müsste eine hohe Auflösung bei geringster Viskosität liefern. Eine niedrige Viskosität bedingt schnellere Trennzeiten der Analyten und die Trennmatrix kann vor jeder Trennung in einer kurzen Zeit erneuert werden. Leider zeigen Pufferlösungen mit

geringer Viskosität oft ein ungenügendes Trennvermögen und eine schlechte Auflösung für DNA-Fragmenten mit ähnlicher Zahl an Basenpaaren.

Von allen Cellulosederivaten wurden Lösungen mit unterschiedlicher Konzentration an Gelbildner, mit und ohne von Harnstoff, angesetzt und deren dynamische Viskosität bestimmt. Praktisch wurde die kinematische Viskosität ( $\text{mm}^2/\text{s}$ ) bestimmt, die sich von der dynamischen Viskosität (mPas) durch die Dichte des Lösungsmittels unterscheidet. Allerdings wurde experimentell gefunden, dass die Differenz beider Viskositäten für verdünnte und halbverdünnte Lösungen kleiner ist, als der übliche experimentelle Fehler<sup>[40]</sup>.

## Viskositäten von Cellulose-Trennpuffer

### *Hydroxyethylcellulose HEC*

HEC [%]	kin. Viskosität [ $\text{mm}^2/\text{sec}$ ] o.U.	kin. Viskosität [ $\text{mm}^2/\text{sec}$ ] m.U.
1	13,78	10,18
1,5	32,12	21,84
2	75,33	48,6
2,5	170,1	92,34

Tabelle 5: Kinematische Viskosität von HEC-Polymerlösungen mit und ohne Harnstoff

Der folgende Graph zeigt die Viskosität in Abhängigkeit von der Konzentration von verschiedenen HEC-Polymerlösungen. Man erkennt deutlich die Erniedrigung der Viskosität durch Zugabe von 7M Harnstoff.

Die Grenzkonzentration  $c^*$  ist in dieser Darstellung nicht zu erkennen, da die Überlappungskonzentration bei HEC deutlich unter 1 %<sup>[120]</sup> liegt. Die Grenzkonzentration  $c^*$  ist der Punkt, bei dem die lineare Abhängigkeit der Viskosität von der Konzentration in eine exponentielle Abhängigkeit übergeht.

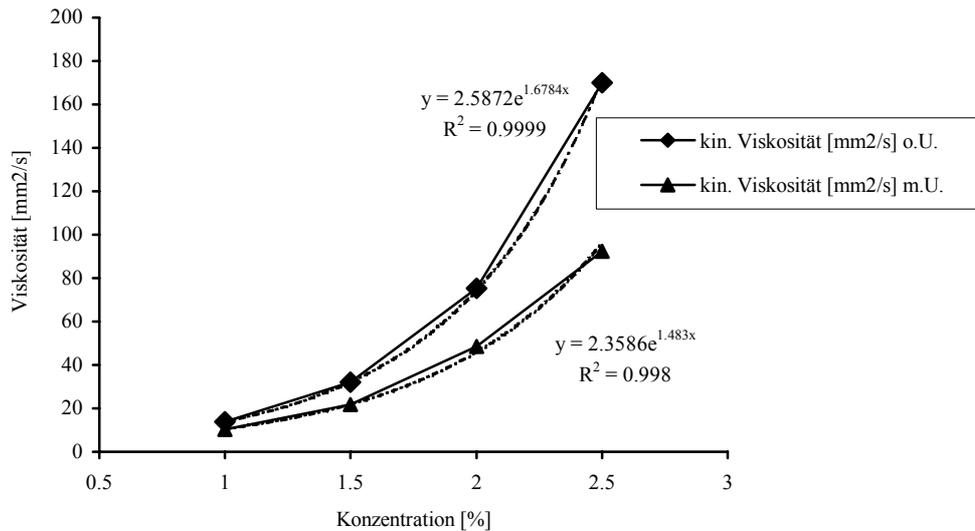


Abbildung 45: Kinematische Viskosität von verschiedenen HEC-Polymer-Lösungen in Abhängigkeit von der Konzentration, dazugehörige potentielle Trendlinien

Experimentell wurden diese Lösungen nicht untersucht, da diese verdünnten Lösungen für weitergehende Tests, aufgrund ihrer schlechten Trennleistung nicht verwendet werden konnten.

### *Hydroxypropylmethylcellulose HPMC*

Ausgehend von der Angabe 2500-5600 cp (2 % in Wasser bei 20 °C) wurde Lösungen unter 1 % angesetzt und deren Viskosität gemessen:

HPMC [%]	kin. Viskosität [mm²/sec] o.U.	kin. Viskosität [mm²/sec] m.U.
0,2	4,03	3,6
0,3	6,36	5,19
0,4	13,78	9,54
0,6	63,18	31,59
0,8	147	60,49

Tabelle 6: Kinematische Viskosität von HPMC-Polymerlösungen mit und ohne Harnstoff

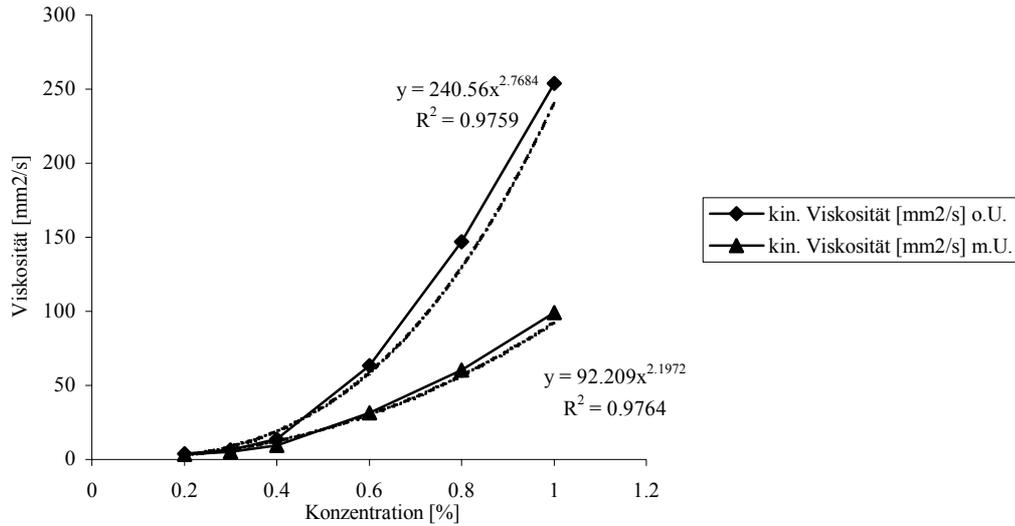


Abbildung 46: Kinematische Viskosität von verschiedenen HPMC-Polymer-Lösungen in Abhängigkeit von der Konzentration, dazugehörige potentielle Trendlinien

Hier konnte auch die Überlappungskonzentration genauer bestimmt werden. Diese Grenzkonzentration  $c^*$ , bei deren Erreichen, die lineare Abhängigkeit der Viskosität von der Konzentration in eine exponentielle Abhängigkeit übergeht, erkennt man sehr leicht am Wendepunkt in der graphischen Darstellung. Man erkennt sehr deutlich, dass  $c^*$  für HPMC bei 0,4 % liegt und dass Harnstoff einen sehr geringen Einfluss auf diesen Parameter hat<sup>[120]</sup>. (Um den Wendepunkt zu verdeutlichen, wurde die Viskosität nur bis 0,6 % aufgetragen.)

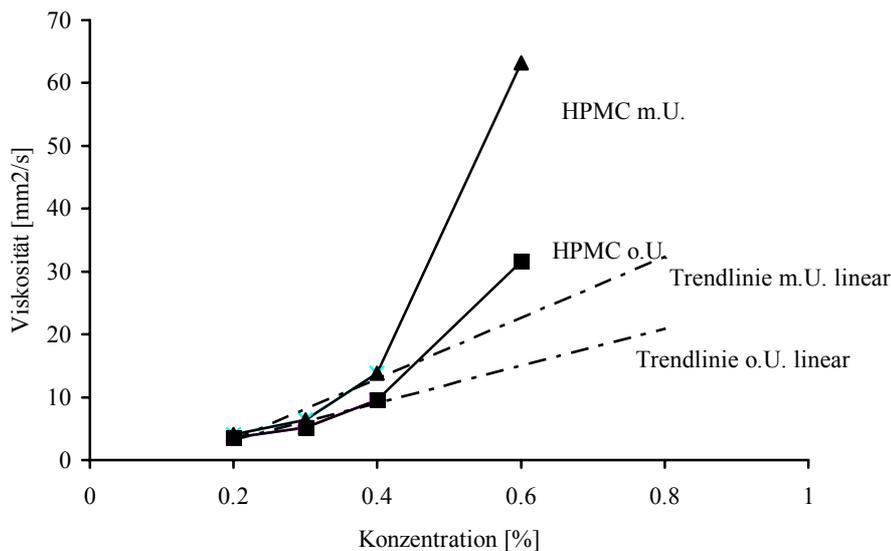


Abbildung 47: Überlappungskonzentration  $c^*$  von HPMC

### Methylcellulose MC

Das Ausgangsmaterial zeigte bei einer 2% Lösung eine Viskosität von 4000 cp. Es wurden Lösungen unter 1 % Gelbildner angesetzt und vermessen.

MC	kin. Viskosität [mm <sup>2</sup> /s] o.U.	kin. Viskosität [mm <sup>2</sup> /s] m.U.
0,1	2,28	2,49
0,2	3,73	4,14
0,3	5,96	5,78
0,4	13,4	9,48
0,5	21,55	14,37
0,6	28,43	23,67

Tabelle 7: Kinematische Viskosität von MC-Polymerlösungen mit und ohne Harnstoff

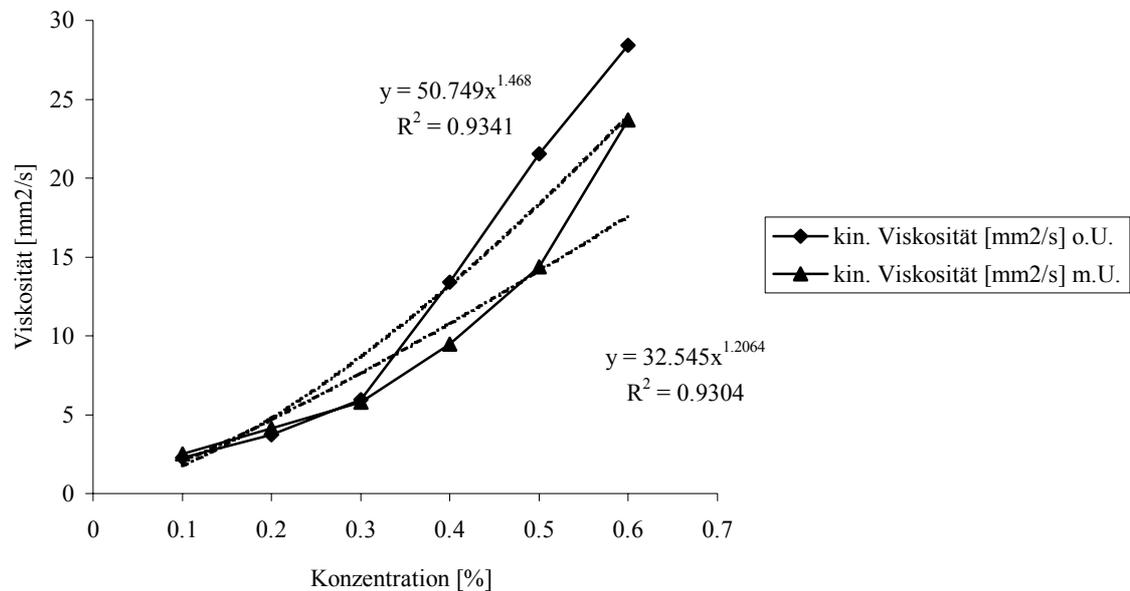


Abbildung 48: Kinematische Viskosität von verschiedenen MC-Polymer-Lösungen in Abhängigkeit von der Konzentration, dazugehörige potentielle Trendlinien

Die Überlappungskonzentration  $c^*$  liegt bei Methylcellulose bei 0,3 %. Man erkennt auch hier, dass Harnstoff einen sehr geringen Einfluss auf diesen Parameter hat.

*Carboxymethylcellulose CMC*

CMC [%]	kin. Viskosität [mm <sup>2</sup> /sec] o.U.	kin. Viskosität [mm <sup>2</sup> /sec] m.U.
0,5	9,9	9,48
1,0	61,97	29,16
1,5	176,17	96,27
2,0	646,38	190,76

Tabelle 8: Kinematische Viskosität von CMC-Polymerlösungen mit und ohne Harnstoff

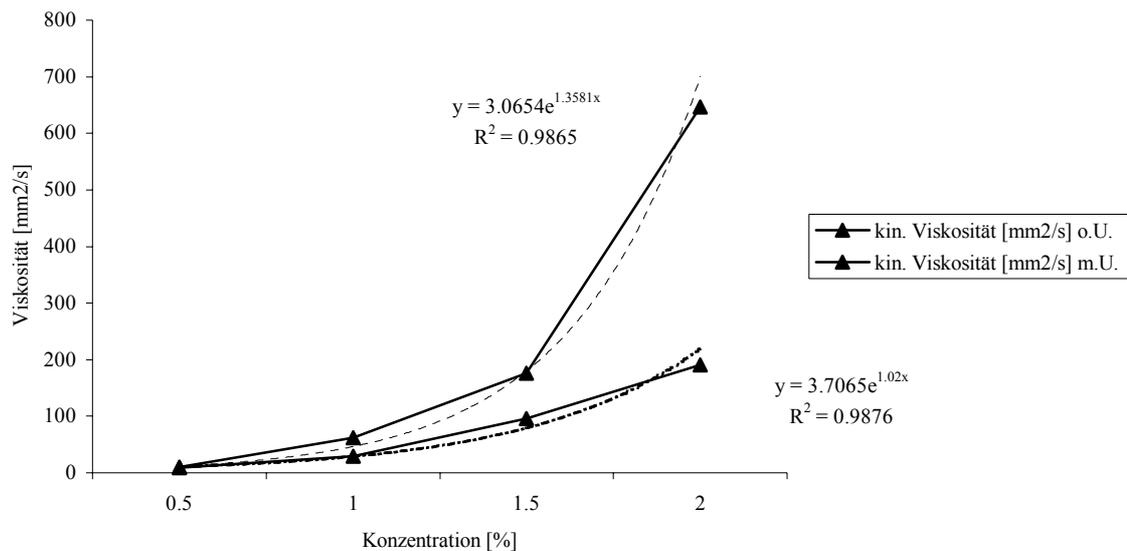


Abbildung 49: Kinematische Viskosität von verschiedenen CMC-Polymer-Lösungen in Abhängigkeit von der Konzentration, dazugehörige potentielle Trendlinien

Hier zeigt der Zusatz von Harnstoff eine Wirkung, Während ohne Harnstoff die Überlappungskonzentration bei ca. 0,5% liegt, stellt sich die Überlappung der Monomeren im Puffer mit Harnstoff erst ab einer Konzentration von 1 % ein.

Man erkennt deutlich, dass die Polymerlösungen mit Methylcellulose die geringste Viskosität aufweisen, gefolgt von der HPMC. Lösungen mit HEC haben die höchste Viskosität. Lösungen mit Harnstoffzusatz haben gegenüber Lösungen mit gleichem prozentualen Polymeranteil wesentlich geringere Viskositäten.

## Trennleistung von Cellulose-Trennpuffer

Um die Trennleistung der einzelnen Polymerlösungen zu überprüfen, wurde ein dsDNA Standard mit diesen Puffersystemen kapillarelektrophoretisch mit der etablierten Standardmethode getrennt. Die Anwesenheit von Harnstoff in der Lösung führt zu denaturierenden Bedingungen, die dsDNA spaltet sich in ssDNA auf. Diese denaturierenden Puffer sind wichtig bei Messungen von kurzen Nukleinsäuren und RNA.

Vor Einsatz in der CE wurden die Puffer jeweils 10 min in einem Ultraschallbad entgast.

Die Parameter der vorher beschriebenen etablierten Standardmethode wurden eingestellt:

- DB 1 Kapillare: 37/30 cm (Unterdrückung des EOF durch belegte Kapillare)
- inverse Polarität
- Durchmesser: 100 µm
- Temperatur: 20°C
- konstante Spannung: 4 kV
- elektrokinetische Injektion mit 7,5 kV
- Detektion: UV bei 254 nm (Detektor befindet sich bei der Anode)
- Spülung der Kapillare vor Injektion jeweils zwei Minuten lang mit Methanol und Wasser
- fünf Minuten Equilibrierung mit Puffer

Der verwendete Standard enthält eine dsDNA-Leiter mit Fragmenten der Größe 100 bis 1000 Basenpaare (bp).(BioLad 100, Fa. Hybaid-AGS). Zur besseren Orientierung liegt das 500 bp Fragment in doppelter Konzentration vor.

Mit jedem Puffer wurden 7-8 Messungen nacheinander durchgeführt. Nur vollständig aufgetrennte Peaks werden in den folgenden Diagrammen aufgeführt.

*Hydroxyethylcellulose*

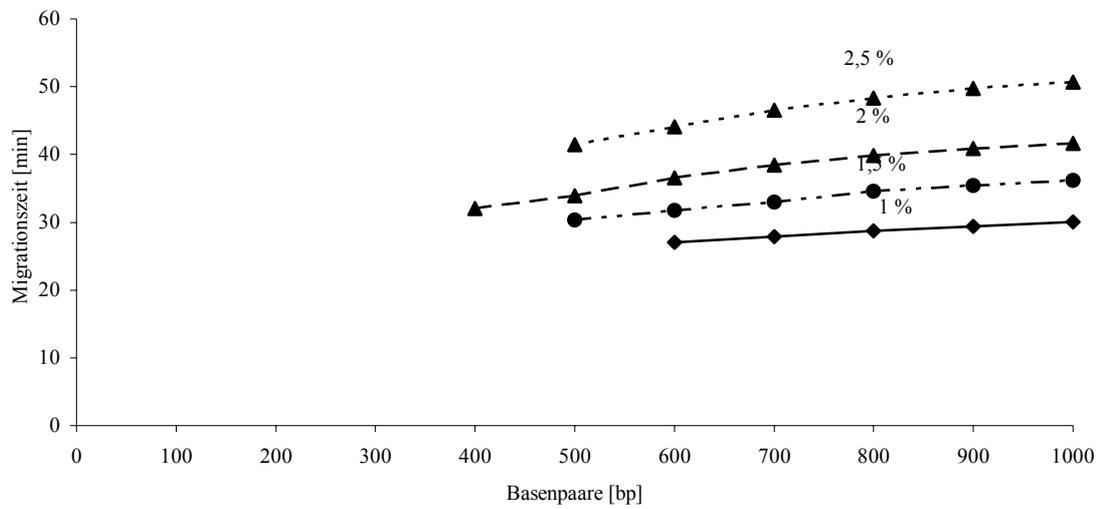


Abbildung 50: Trenneffizienz von HEC Trennpuffer mit Harnstoff

Harnstoff senkt die Viskosität der HEC-Lösungen so stark, dass eine vollständige Trennung der einzelnen Fragmente der Leiter in den vorliegenden Puffer nicht erreicht werden konnte.

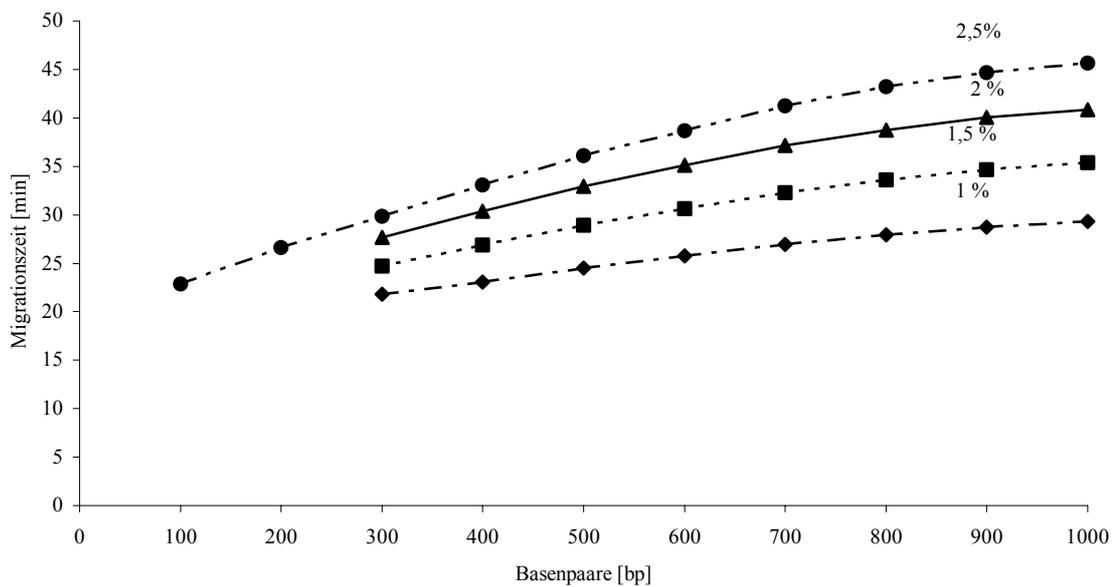


Abbildung 51: Trenneffizienz von HEC Trennpuffer ohne Harnstoff

Eine vollständige Trennung aller Fragmente der Leiter erreicht man mit einer 2,5 % HEC Polymerlösung ohne Harnstoffzusatz. Für Polymerlösungen mit einer geringeren Menge an Gelbildner erfolgt die Trennung der Fragmente mit ausreichender Auflösung

erst ab einer Größe von 300 bp. Allerdings wird die Filtration der Polymerlösung durch die hohe Viskosität erschwert und der Austausch des Puffer in der Kapillare erfordert eine 2-3 mal längere Zeit. Sowohl unter nativen als auch denaturierenden Bedingungen resultieren bei Trennpuffer mit HEC als Trennmatrix relativ lange Laufzeiten der Kapillarelektrophorese.

### *Hydroxypropylmethylcellulose*

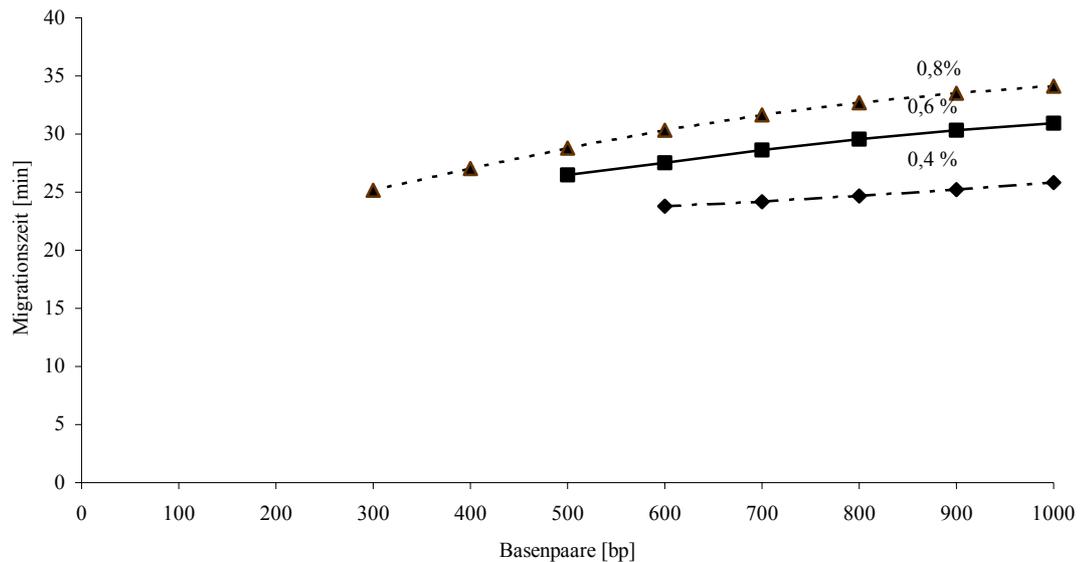


Abbildung 52: Trenneffizienz von HPMC Trennpuffer mit Harnstoff

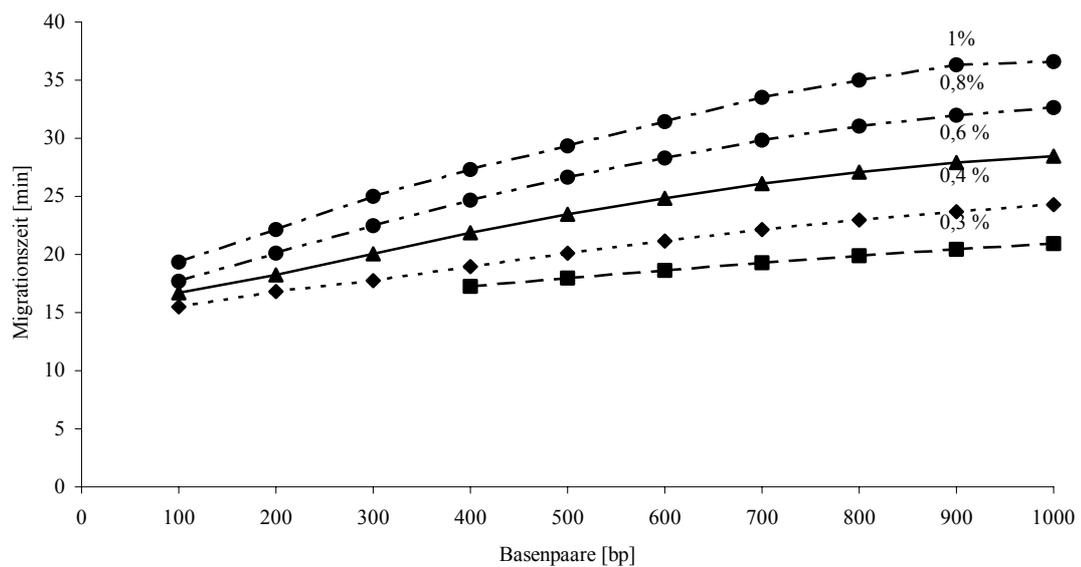


Abbildung 53: Trenneffizienz von HPMC Trennpuffer ohne Harnstoff

Hier zeigt sich wiederum eine Verbesserung der Trenneffizienz unter nativen Bedingungen bei gleich konzentrierten Lösungen. Ab einer Konzentration von 0,4 % konnte eine vollständige Trennung aller zehn Fragmente erzielt werden trotz niedrigerer Viskositäten im Vergleich zu HEC. Durch die geringere Konzentration an Gelbildner (als bei HEC), vereinfacht sich wesentlich die Filtration durch den 0,45  $\mu\text{m}$  Filter. Außerdem verkürzt sich die Analysenzeit durch schnellere Migrationszeiten im Vergleich zu HEC-Lösungen.

### *Methylcellulose*

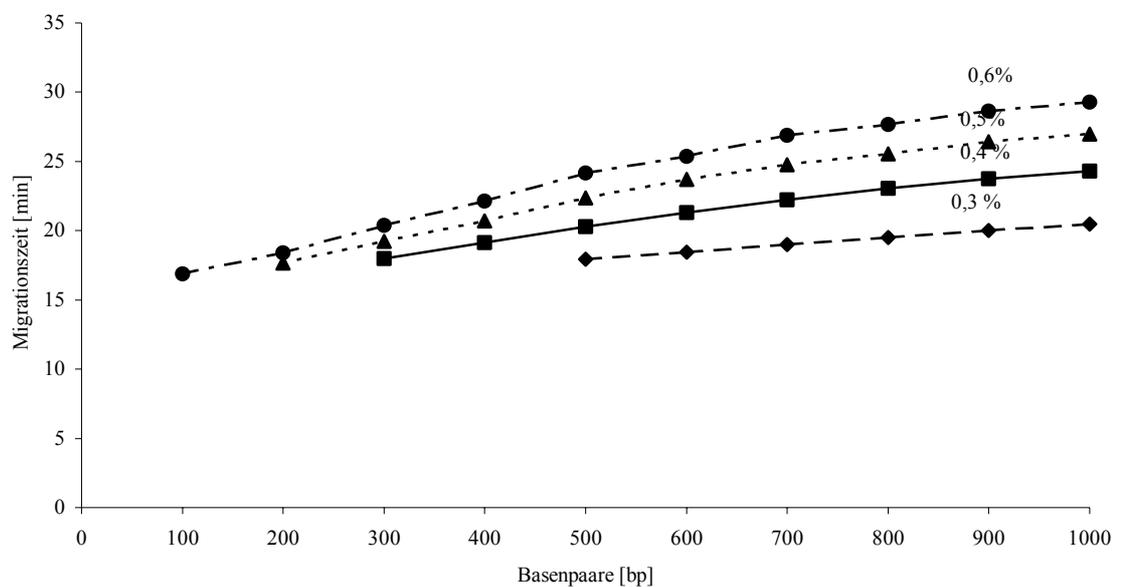


Abbildung 54: Trenneffizienz von MC Trennpuffer ohne Harnstoff

Eine vollständige Trennung aller zehn Fragmenten wurde mit der 0,6 %-igen Polymerlösung erreicht. Obwohl der Zusatz von Harnstoff die Viskosität der Polymerlösungen nicht sehr dramatisch senkt, erfolgt bei diesen Puffer keine zufriedenstellende Trennung der ssDNA-Fragmenten. Wahrscheinlich benötigt man wesentlich höhere Konzentrationen an MC, um die nötige Trennleistung zu erreichen.

### *Carboxymethylcellulose*

Dieser Gelbildner erwies sich als ungeeignet zur kapillarelektrophoretischen Trennung. Die Lösungen mit Carboxymethylcellulose konnten aufgrund ihrer hohen Klebrigkeit nicht in die Kapillaren eingebracht werden. Es kam zu Verstopfungen der Kapillare, die auch durch intensives Spülen mit Wasser nicht aufgehoben werden konnte.

## Vergleich verschiedener Polymerlösungen gleicher Viskosität

Den Einfluss der unterschiedlichen Gelbildner auf die Trennleistung der Polymerlösungen kann man analysieren, wenn man unterschiedliche Polymerlösungen mit annähernd gleicher Viskosität vergleicht. Man erkennt man deutliche Unterschiede in der Laufzeit der Fragmente und in der Trenneffizienz.

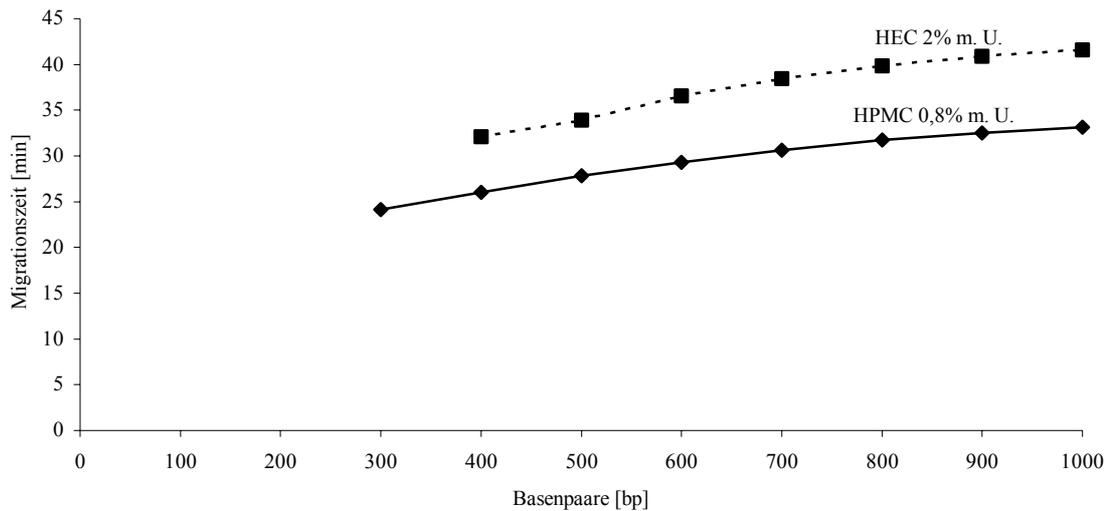


Abbildung 55: Vergleich HEC 2 % m. U. und HPMC 0,8 % m.U.; Viskosität von ca. 48,6 mm<sup>2</sup> / s

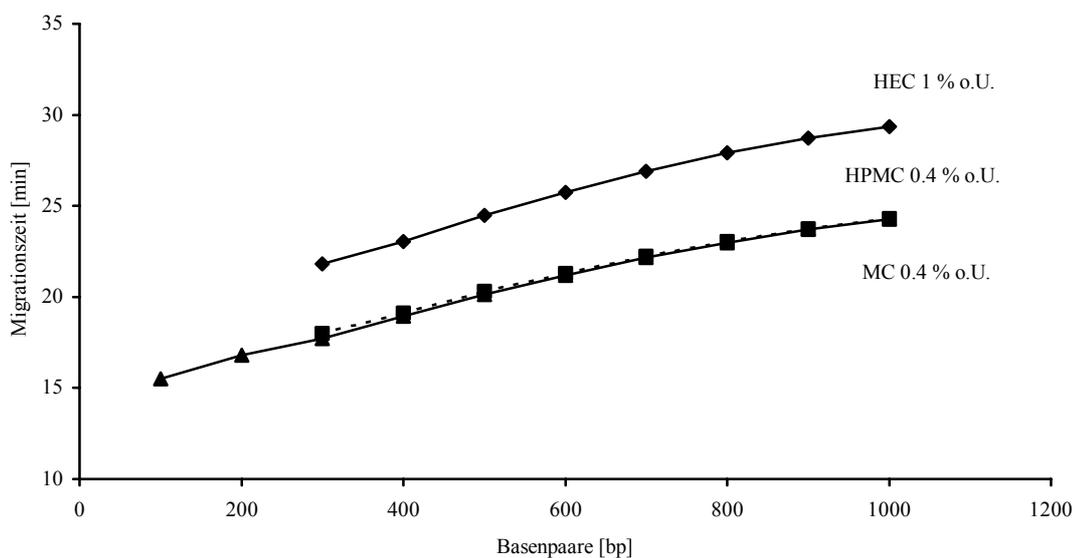


Abbildung 56: Vergleich HEC 1 % o.U.; HPMC 0,6 % o.U. und MC 0,4 % o.U.; Viskosität von ca. 14,4 mm<sup>2</sup> / s

Aus den oben gezeigten Ergebnissen geht eindeutig hervor, dass HPMC von den getesteten Zusätzen am besten geeignet ist, große und kleine Fragmente in einer akzeptablen Zeit zu trennen. Mit einer 0,4 % Lösung erfolgt eine vollständige Auftrennung der zehn DNA-Fragmente der Leiter. Gleichzeitig ist hier die Handhabung, besonders das Filtrieren durch die 0,45 µm Poren unkompliziert. Der HPMC-haltige Trennpuffer zeigt die beste Trenneffizienz im Vergleich zu HEC und MC und die Migrationszeiten sind gegenüber HEC deutlich kürzer. Das 1000 bp Fragment benötigt in HEC 1 % o.U. 29,3 min, im HPMC Puffer 0,4 % o.U. 24,3 min.

Zusammengefasst noch einmal die Vorteile von HPMC:

- die eingesetzten Konzentrationen sind niedriger
- bessere Trenneffizienz (vollständige Trennung aller Fragmente)
- geringere Migrationszeiten (besonders bei höheren Konzentrationen)
- leichtere Filtration durch Filter mit der Porengröße 0,45 µm

### **Abhängigkeit Trennleistung versus Viskosität**

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass alle drei getesteten Cellulosederivate zur Trennung von Nukleinsäuren geeignet sind. Besonders vorteilhaft ist außerdem die Vermeidung des Umgangs mit Acrylamid-basierten Gelen.

Es hat sich allerdings herausgestellt, dass es leider nicht möglich ist, direkt von der Viskosität der Puffer auf ihre Trenneffizienz zu schließen, es spielen noch weitere Effekte eine Rolle, wie z.B. die gebildete Porengröße, welche für jeden Gelbildner charakteristisch ausfällt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass für weitere Untersuchungen Hydroxypropylmethylcellulose als Polymerzusatz ausgesucht wurde. Sie ist für eine sehr breites Spektrum an DNA-Fragmenten geeignet und die Handhabung, besonders die Filtration der Polymerlösung, verläuft ohne große Schwierigkeiten. Es empfiehlt sich allerdings für jede anstehende Applikation Vorversuche machen, um die „ideale“ Konzentration des Trennpuffers herauszufinden.

---

## Molekularbiologische Anwendungen der CE

Im ersten Schritt wurde mit Hilfe der kommerziellen CE Gel-Kapillaren, gefüllt mit quervernetztem Polyacrylamid-Gel, das Potential der Methode überprüft. Dies geschah durch Messung unterschiedlichster Nukleinsäure-Fragmente. Das Spektrum der gemessenen Derivate umfasste Oligonukleotide, die als Primer in der PCR Einsatz finden, Antisense-Oligonukleotide, als potentielle Arzneimittel und DNA-Mutationen. Zum Einsatz kam der eCAP ssDNA 100 Gel Capillare Kit der Firma Beckman. Unter denaturierenden Bedingungen wurden die entsprechenden Nukleinsäure-Derivate nach Größe getrennt.

### Charakterisierung von Antisense-Oligonukleotiden

Oligonukleotide werden in der Pharmaforschung als potente Möglichkeit zum Eingriff in verschiedene physiologische und pathologische Prozesse betrachtet. Von besonderem Interesse sind hierbei chemische Modifikationen, die einerseits die Paarungseigenschaften mit der Zielsequenz verbessern, andererseits die Stabilität der Oligonukleotide erhöhen.

In unserer Arbeitsgruppe wurden unter anderem auch 2'-O-modifizierten Oligonukleotiden synthetisiert und charakterisiert. Zur Modifikation der 2'-O-Position von Nukleotiden<sup>[121]</sup> wurden verschiedene Alkyl- und Oxyethylenreste sowie ein Aminohexylrest in Adenosinbausteine eingeführt. Die verfremdeten Nukleotidbausteine wurden mittels Phosphoramidit-Festphasenmethode in verschiedene Oligomere eingebaut. Die eingeführten Modifikationen verändern je nach Art der Modifikation, Lipophilie und Solubilisierung der Sequenzen in unterschiedlicher Weise. Zur Untersuchung dieses Einflusses wurde ein kapillargelelektrophoretisches Verfahren zur Identitäts- und Reinheitsprüfung der synthetisierten Oligonukleotide eingeführt. Im Vergleich zu klassischen Flachbettgelen erreicht man bei der Kapillargelelektrophorese eine höhere Trenneffizienz, die bei Oligomeren bis zu 100 Basenpaaren genaue Auflösung bis auf eine Base ermöglicht.

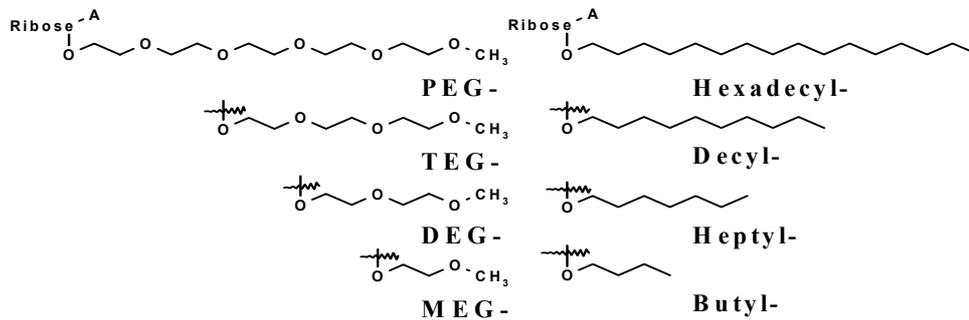


Abbildung 57: 2'-O-Modifikationen des Adenosins, die für diese Untersuchung in Oligonukleotiden eingeführt wurden.

Adenosin wurde nach der in früheren Arbeiten entwickelten Methode der direkten Alkylierung<sup>[122]</sup> in guter Ausbeute an der 2'-O-Position modifiziert (A\*). In nachfolgenden Standardreaktionen wurden geschützte und 2'-O-modifizierte Cyanoethylphosphoramidite hergestellt, die dann am DNA-Synthesizer für die automatische Synthese von Oligonukleotiden verwendet werden konnten. Es wurden A12-Phosphatdodekamere und Oligonukleotide mit gemischter Sequenz (ATGTTGCCCCATCATA\*A\*A\*T) mit einigen Modifikationen als Phosphorothioate hergestellt.

Da das Masse-Ladungsverhältnis bei homolog zusammengesetzten Nucleinsäuren gleich ist, erfolgt die Trennung ausschließlich durch den Siebeffekt der Matrix in der Kapillare, hier das quervernetzte Polyacrylamidgel. Bei der Trennung von modifizierten A12 Sequenzen beobachtet man allerdings einen zusätzlichen Effekt auf die Migration und Trennung der Nucleotide durch das größere Raumvolumen der angehängten Reste.

Die Testsequenzen wurden nach Ihrer Reinigung per HPLC in verdünnten Lösungen injiziert und die elektrophoretischen Läufe unter standardisierten Bedingungen durchgeführt und die elektrophoretische Mobilität bestimmt.

$$\mu = \frac{L}{E \cdot v_{ep}} \quad \text{Gleichung 41}$$

$v_{ep}$ : Geschwindigkeit des Analyten;  $E$ : elektrische Feldstärke,  $L$ : Gesamtlänge Kapillare

Um den Einfluss der Anzahl der Modifikation auf die Migrationszeit der Oligonukleotide wurden A12-Oligonukleotide gleicher Modifikation aber unterschiedlichen Modifikationsgrades zusammen mit einem unmodifizierten A12-Oligonukleotid analysiert.

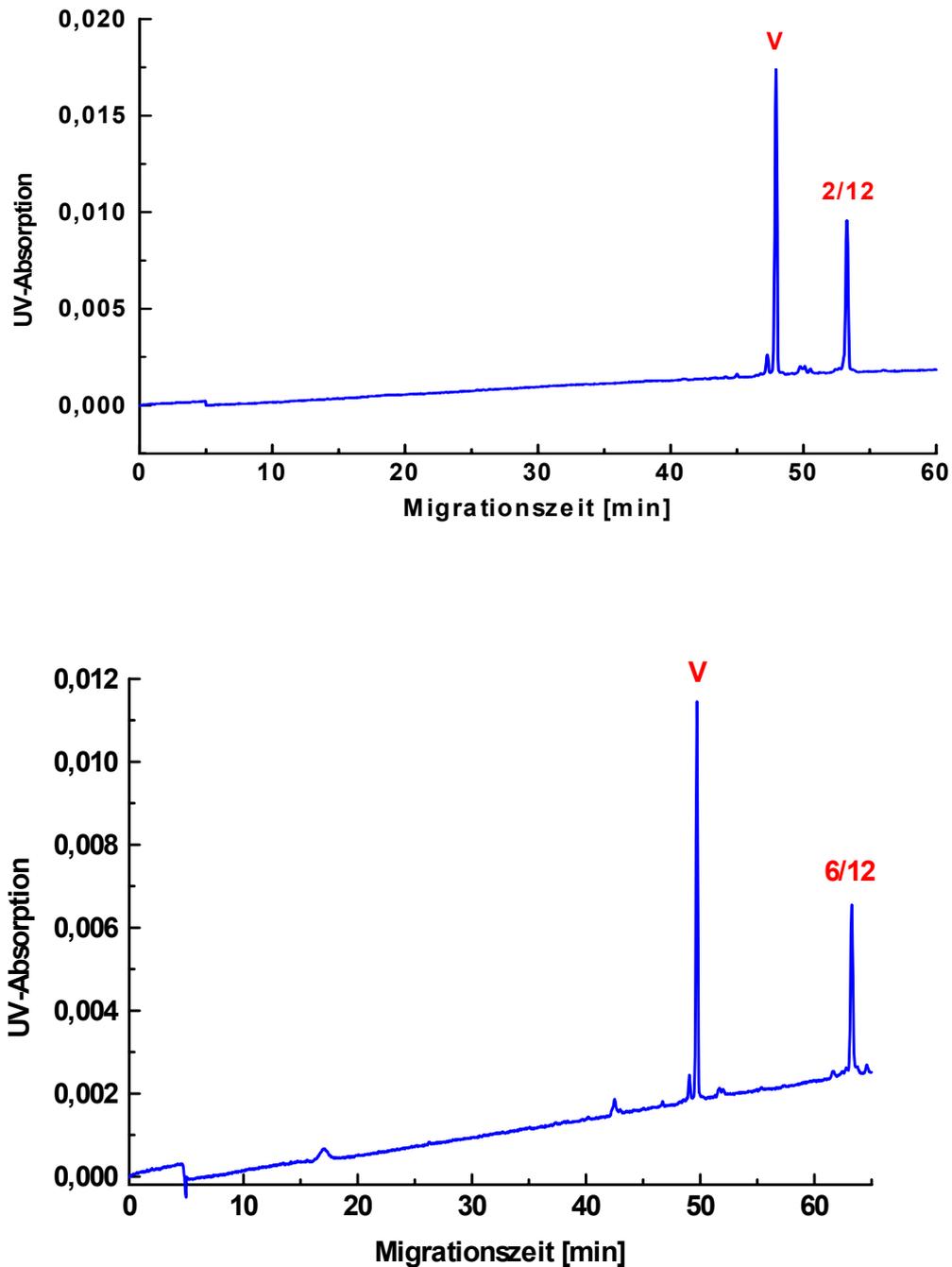


Abbildung 58: Kapillarelektropherogramme von A12-Dodecameren mit 2 und 6 Modifikationen.

Deutlich ist zu sehen, dass stärker modifizierte Oligonukleotide eine längere Migrationszeit aufweisen. Die unterschiedlichen Migrationszeiten des unmodifizierten Vergleichs sind mit Kapillaralterung und damit verbundenem erhöhtem elektrischen Widerstand zu erklären. Die Migrationszeiten können dennoch miteinander verglichen werden, wenn unter Einbeziehung der elektrischen Feldstärke die elektrophoretischen Mobilitäten miteinander<sup>[123]</sup> in Beziehung gesetzt werden, woraus die relative elektrophoretische Mobilität resultiert:

$$\mu_{rel} = \frac{\mu_R}{\mu_P} \quad \text{Gleichung 42}$$

$\mu_R$ : elektrophoretische Mobilität Referenz;  $\mu_P$ : elektrophoretische Mobilität Probe

Trägt man die Anzahl der Modifikationen gegen die relative Migrationszeit in einem Graph auf, erhält man folgenden linearen Zusammenhang:

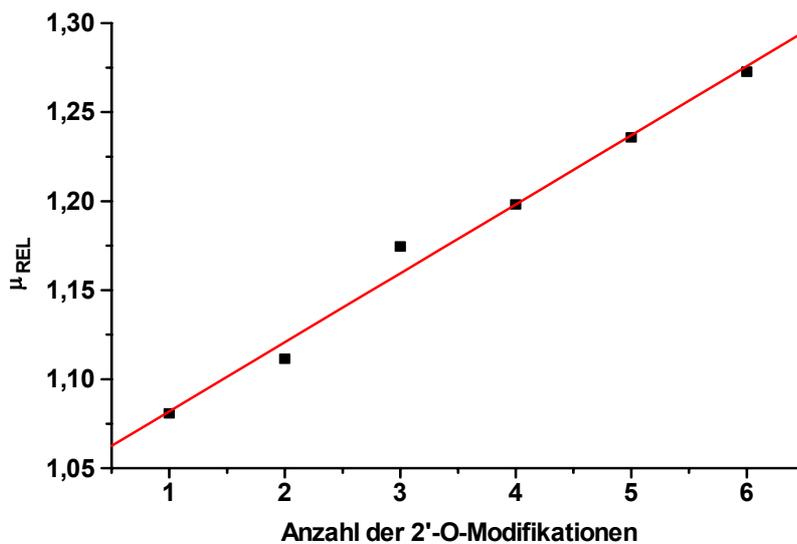


Abbildung 59: Relative Elektrophoretische Mobilitäten einer A12-Reihe mit zunehmendem Modifikationsgrad.

Die erhaltene Steigung und y-Achsenabschnitt sind charakteristisch für eine Modifikation, und kann als zusätzlicher physikalischer Parameter zur Charakterisierung von Oligonukleotidmodifikationen herangezogen werden.

## Detektion von Genmutation

Immer wichtiger wird die Detektion von DNA Mutationen und natürlichen Variationen zur Charakterisierung und Diagnose von Krankheiten<sup>[124]</sup>. Da die Kapillarelektrophorese die Möglichkeit bietet, DNA-Fragmente von geringer unterschiedlicher Größe zu trennen, kann man leicht Gene, die sogar einer Punktmutation unterlagen, erfassen<sup>[125]</sup>.

Bei dem vorliegenden Probenmaterial handelte es sich um Proben des Apolipoprotein B-Gens. Apolipoprotein B ist die einzige Proteinkomponente in LDL, dem wichtigsten Cholesteroltransporter im Plasma. Personen mit einem hohen Anteil an Apolipoprotein B zeigen eine hohe Prädisposition zu Atherosklerose. Ein genetischer Defekt in diesem Gen führt zu der Deletion von drei hydrophoben Aminosäuren im Deletionstyp DEL, während der „Wildtyp“ INS aus 27 Aminosäuren besteht<sup>[126]</sup>. Der Verlust der drei Aminosäuren äußert sich in strukturellen Veränderungen, die zu einer Erniedrigung der Affinität von LDL am LDL-Rezeptor, was eine Erhöhung des Risikos der Koronaren Herzkrankheit führt<sup>[127]</sup>. Die Verteilung in der Bevölkerung beider Gene ist 3:1 von INS:DEL. Die schnelle Identifizierung des Apolipoprotein-Typs könnte ein Weg sein, um die Therapie der Hyperlipidämie zu optimieren<sup>[128]</sup>.

Für die beiden Proben wurde genomische DNA aus peripherem Blut isoliert. Mittels PCR erhielt man das Probenmaterial, das gereinigt unter denaturierenden Bedingungen in einer Gelkapillare getrennt wurde. Die Probe Insertion INS hatte eine Länge von 93 Basenpaare und die Probe Deletion DEL 84 Basenpaare.

Zur genaueren Größenbestimmung der Zielfragmente wurden folgende Größenstandards eingesetzt:

Standard 1 enthält Poly (dA) in der Länge von 20 und 40 Basen.

Standard 2 enthält Poly (dA) von einer Länge zwischen 40-60 Basen.

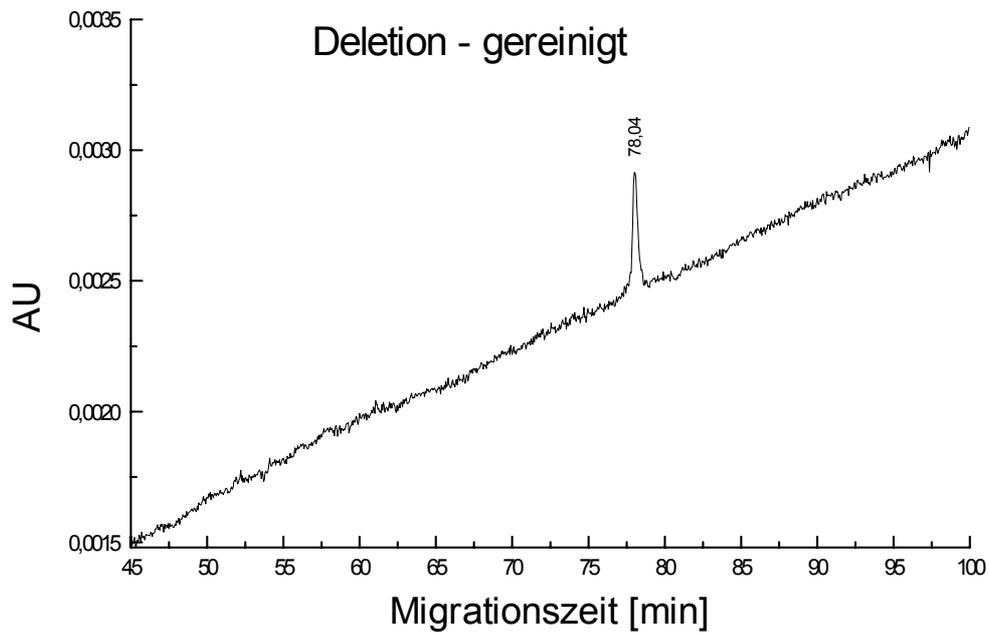


Abbildung 60: DEL gereinigt

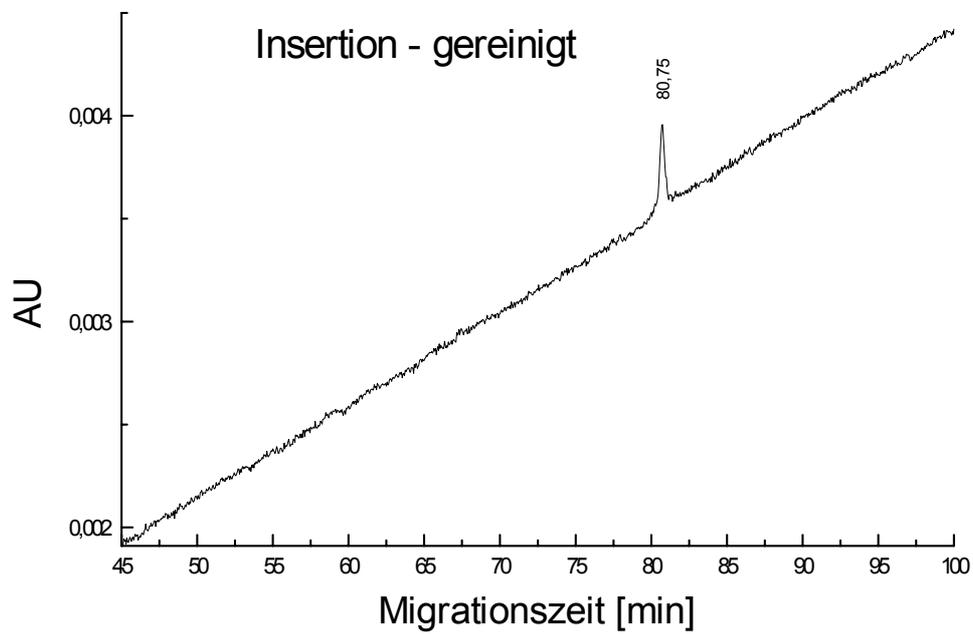


Abbildung 61: INS gereinigt

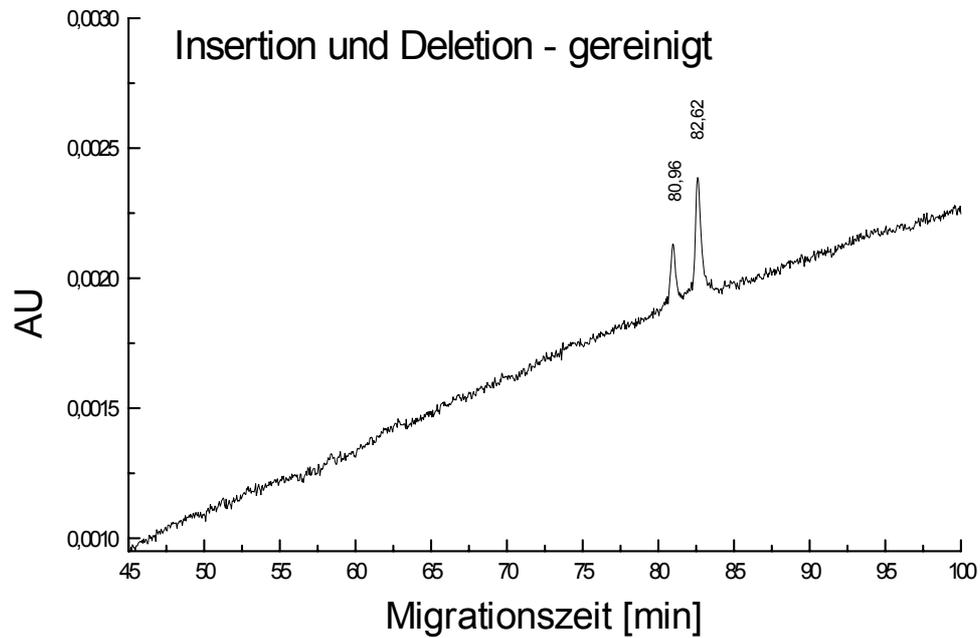


Abbildung 62: DEL und INS gereinigt

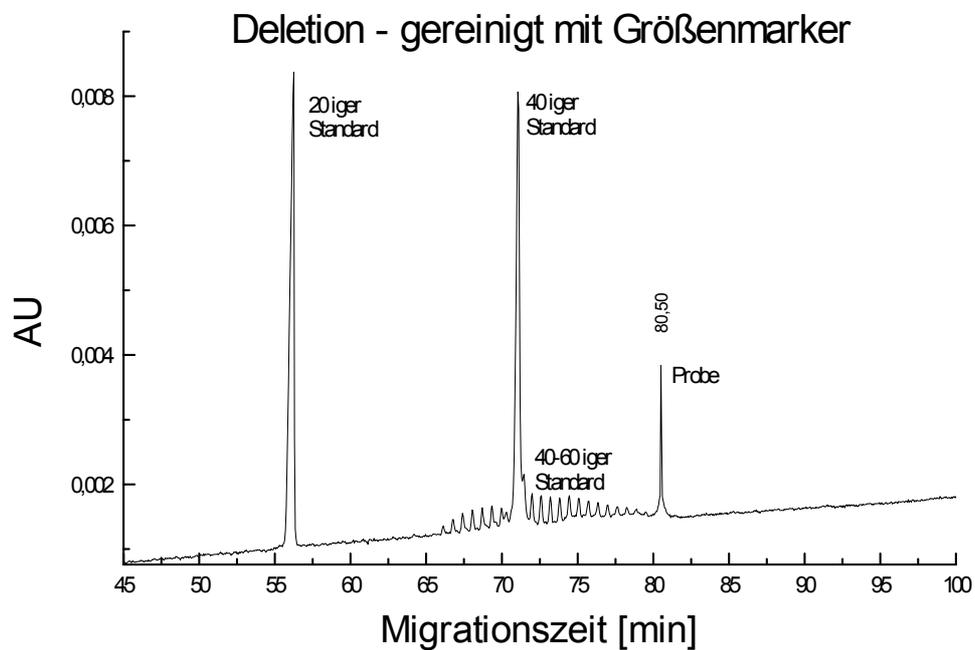


Abbildung 63: DEL mit beiden Größenmarker

Die gemessenen Proben zeigen wie erwartet unterschiedliche Migrationszeiten, bedingt durch den Größenunterschied von 9 Basen. Das Signal der Probe Deletion erscheint bei

78,04 min und das der Probe Insertion bei 80,75 min. Die Schwankungen der Migrationszeiten deuten auf eine eintretende Degradation des Polyacrylamid-Gels hin, eine übliche „Alterungserscheinung“ von Gelkapillaren.

Der Einsatz beider Größenmarker erlaubt keine genaue Aussage über die Größe der ss-DNA, da sich im 2.Standard deutlich Artefakte gebildet haben, bedingt durch längere Lagerung.

Die durchgeführten Versuche zeigen, dass die Kapillarelektrophorese als Methode zur Detektion von ss-DNA unterschiedlicher Länge geeignet ist. Leider erkennt man auch deutlich die Nachteile der vorhandenen, kommerziellen Gelkapillaren. Um die Nachteile zu beseitigen, kommen immer mehr Polymerlösungen als Trennmatrices zum Einsatz.

### **Reinheitsprüfung von Oligonukleotiden**

Oligonukleotide finden eine breite Verwendung in der Molekularbiologie. In der Regel werden diese Nukleotide in Auftrag gegeben und als Lyophilisat erhalten. Die Herstellung erfolgt an einem DNA-Synthesizer und anschließend werden die Nukleotide über eine reversed phase per HPLC gereinigt. Die produkthaltigen Fraktionen werden gesammelt, im Rotavapor vom Acetonitril befreit und danach lyophilisiert. In der Regel ist die Fraktionierung relativ grob, so dass die erhaltenen Endlösungen nicht nur die gewünschte Endgröße enthält, sondern auch eine Reihe von kurzketigen Oligonukleotiden. Eine schnelle Methode die Reinheit dieser Oligonukleotide zu überprüfen, bietet die Kapillarelektrophorese.

Die Testung erfolgte mit der etablierten Standardmethode, als Trennpuffer wurde eine 2,5 % HEC Polymerlösung verwendet.

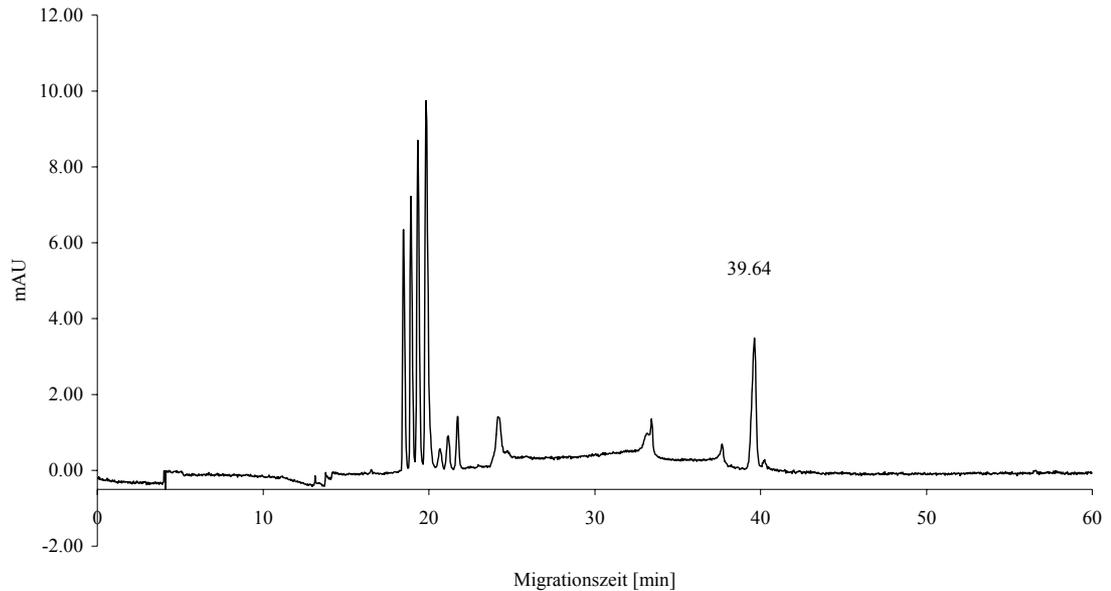


Abbildung 64: Reinheitsprüfung eines Oligonukleotides; Zielsequenz bei 39,64 min

Das Elektropherogramm zeigt deutlich Abbruchstücke vor der Zielsequenz, die bei einer Migrationszeit von 39,64 min eluiert.

Gerade beim Einsatz der Oligonukleotide in der PCR, ist eine hohe Reinheit der eingesetzten Primer von Vorteil, da sonst bei der Amplifikation diverse Zielsequenzen entstehen, die die weiteren Untersuchungen stören.

Die Kapillarelektrophorese stellt eine schnelle und einfache Methode dar, Reinheitsprüfung von Oligonukleotiden durchzuführen.

## **Detektion von DNA-Fragmenten während der Apoptose**

Bei der Apoptose entstehen außer der DNA-Leiter, mit Fragmenten von 180 bp und Vielfache davon, auch Fraktionen mit extrem großen DNA-Stücken<sup>[129]</sup>. Zur Trennung beider Fraktionen, wurde die etablierte Standardmethode zur Trennung von ds-DNA auf diese Applikation übertragen.

Die bei der Apoptose erhaltenen DNA-Fragmente treten in einer niedrigen Konzentration auf, so wurde YOPRO-1 als fluoreszierender Interkalator neu in die Standardmethode integriert. Konkret wurde die Detektionsart von UV auf LIF umgestellt, wodurch eine Sensitivitätssteigerung um den Faktor 100 erreicht wird. Diese Optimierung führte dazu, dass die etablierte Methode als Tool zur Apoptosedetektion verwendet werden kann.

Als LIF Detektor kam ein Argon-Laser von Beckman Instruments (München, D), mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emission bei 520 nm, zum Einsatz.

Als Polymerlösung ist eine 0,8 % HPMC-Lösung verwenden worden.

Die Anwendbarkeit der Methode auf die Trennung der DNA-Fragmente wurde zunächst mit verschiedenen DNA-Längenstandards untersucht. Der Längenstandard II von der Firma Roche enthält acht doppelsträngige DNA-Fragmente deren Größe zwischen 125 - 23130 Basenpaare liegen. Die resultierende Kalibrationskurve des Längenstandards II aus sieben Messungen ergibt einen Bestimmtheitsgrad von  $r^2=0.905$ .

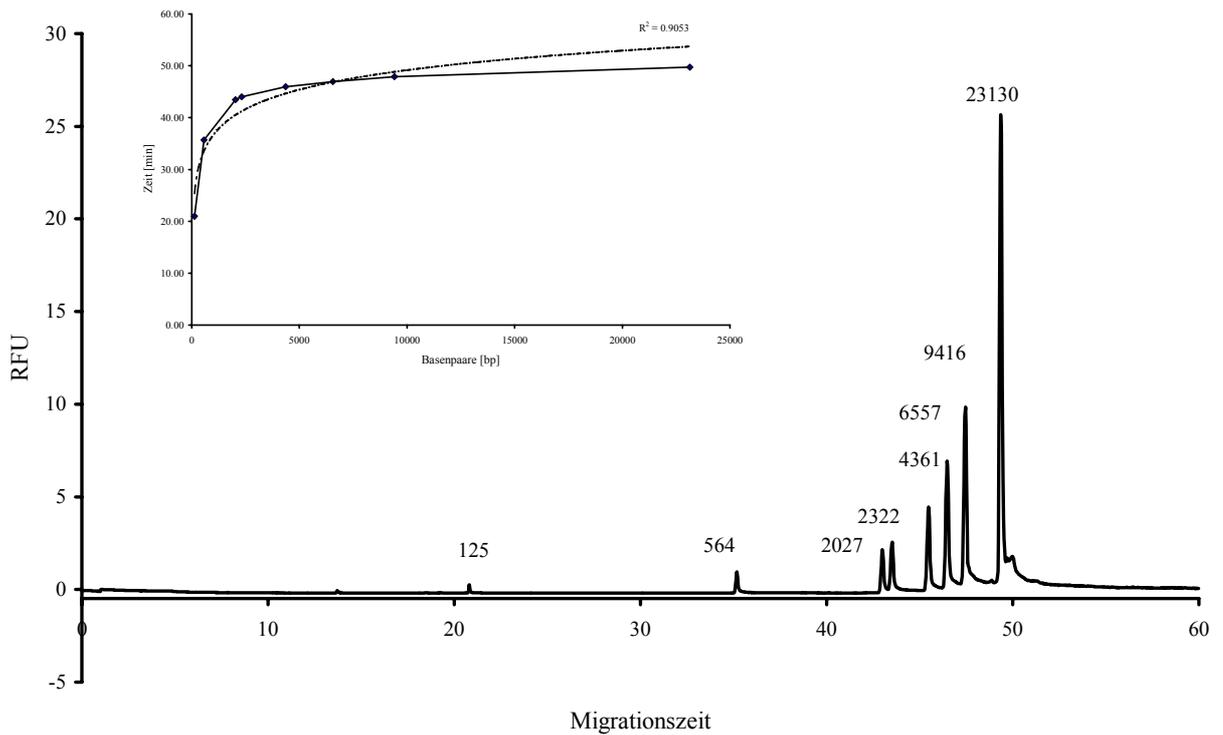


Abbildung 65: Elektropherogramm des DNA-Längenstandard II und dazugehörige Kalibrationswerte aus sieben Messungen

Zwei weitere Marker wurden dazu benutzt, um die Bandbreite der Auflösung der Methode zu überprüfen. Dabei handelt es sich um eine 1 kb DNA-Leiter und um  $\Phi$ 174 DNA Hae III. Die 1 kb Leiter enthält 14 ds-DNA Fragmente mit einer Länge zwischen 250-10000 bp. Die 1000 und 3000 bp Fragmente sind zur besseren Erkennung in einer höheren Konzentration in der Mischung vorhanden.

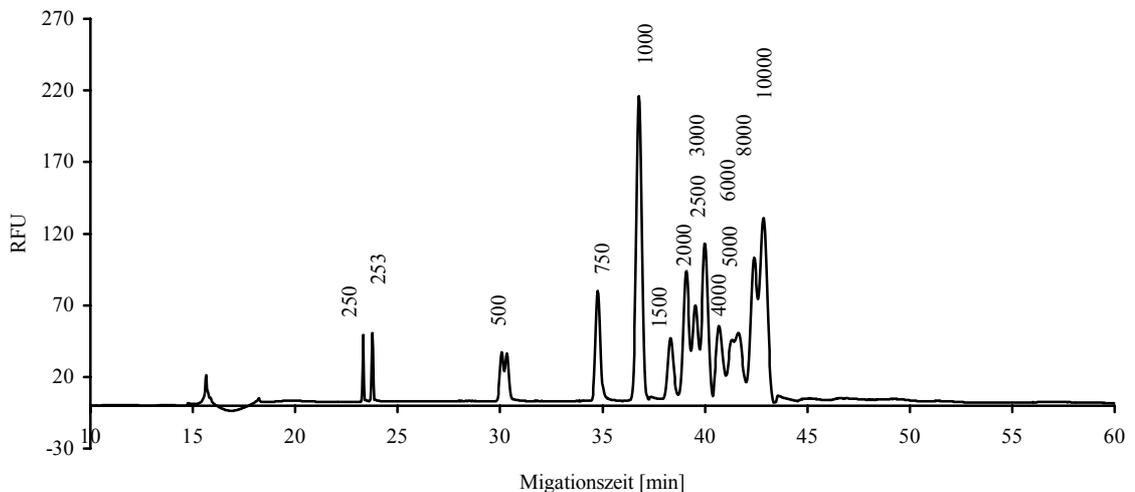


Abbildung 66: Auftrennung der 14 ds-DNA Fragmenten einer 1 KB Leiter

Bei dem zweiten verwendeten DNA-Marker handelt es sich um  $\Phi$ 174 DNA mit Hae III verdaut. Daraus resultieren 11 Fragmente von der Größe zwischen 72- 1353 bp.

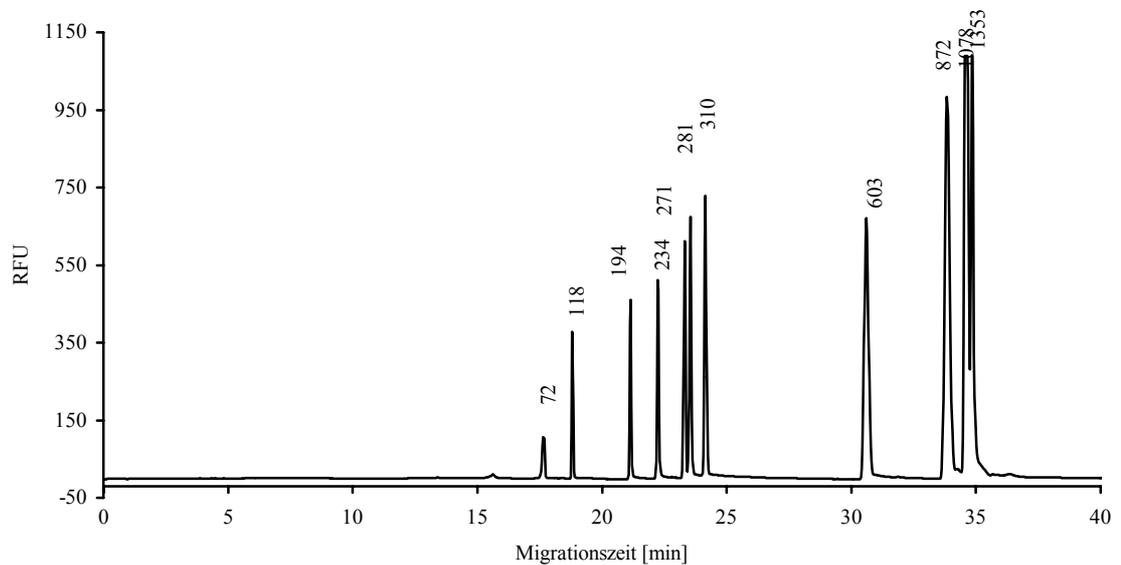


Abbildung 67: Auflösung der 11 Fragmenten des HAE III Marker

Die Trennergebnisse zeigen eine hohe Auflösung aller Größenfragmente der drei verwendeten Standards. Fragmente von 72 bp bis zu 23130 bp werden mit der vorliegenden Methode erfasst. Diese breit gefächerte Größenskala erlaubt eine sichere Erfassung der bei der Apoptose entstehenden DNA-Fractionen, zum Einen die Bestandteile der DNA-Leiter mit 180 bp und Vielfache zum Anderen die hochmolekularen Fraktionen um 50 kb.

Die vorliegende Methode ist geeignet für die Identifizierung von DNA-Fragmenten, die bei Apoptose bzw. bei Nekrose gebildet werden.

## **Erfassung der DNA-Fragmentation an apoptotischen und nekrotischen Zellen**

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, ist die Apoptose ein koordinierter Prozess, der zum Absterben von Zellen führt, das umliegende Gewebe aber nicht schädigt. Dieser physiologische Prozess des Zellsterbens, verhindert Schäden im Organismus durch entartete, kranke oder überflüssige Zellen und ermöglicht das Fortbestehen des Gesamtorganismus.

Gerät der Mechanismus der Apoptose aus seinem Gleichgewicht, kommt es zur Ausbildung von Krankheiten. Ein zuviel an Apoptose prägt neurodegenerative Krankheiten, ein zuwenig begünstigt die Entstehung von Tumoren. Gerade dieser Aspekt ist für die Entwicklung von potentiellen Wirkstoffen von erheblichem Interesse.

Die Möglichkeit Apoptose sicher nachzuweisen ist wesentlicher Bestandteil der aktuellen Krebsforschung. Es gibt bereits verschiedene Methoden zum Nachweis von Apoptose. Morphologische Veränderungen lassen sich mit Hilfe von Mikroskopie oder Flachbettgelelektrophorese nachweisen. Weitere Methoden erfassen biochemische Marker, wie z.B. der TUNEL Assay, der die Translokation von Phosphatidylserin von der Innenseite der Zelle auf die Außenstrukturen anzeigt.

Am häufigsten wird die Flachbettgelelektrophorese zum Nachweis der DNA-Fragmentierung in 180 bp Fragmente und Vielfache davon, als ein wichtiger morphologischer Marker der Apoptose, herangezogen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente in die sogenannte DNA-Leiter im Flachbettgel zeigt die gleichen Nachteile, wie bereits in der Einleitung erwähnt, zusätzlich ist die Detektion der ausgebildeten Leiter nicht trivial. Aus diesem Grund wurde die Auftrennung und Detektion auf die Kapillarelektrophorese übertragen.

Für die Trennmethode kam erneut die etablierte Standardmethode zum Einsatz, die an diese Applikation angepasst wurde. Der Trennpuffer enthielt 89 mM TRIS, 89 mM Borsäure und 2 mM EDTA, 0,8 % Hydroxypropymethylcellulose als Gelbildner und 400 nM YOPRO-1 als Interkalator. Die Detektion erfolgte bei 520 nm.

Zur Bestimmung der DNA-Fragmentierung als Folge der Apoptose wurden sowohl C6 Zellen als auch MCF-7 Zellen untersucht.

## Apoptose Assay in C6 Zellen

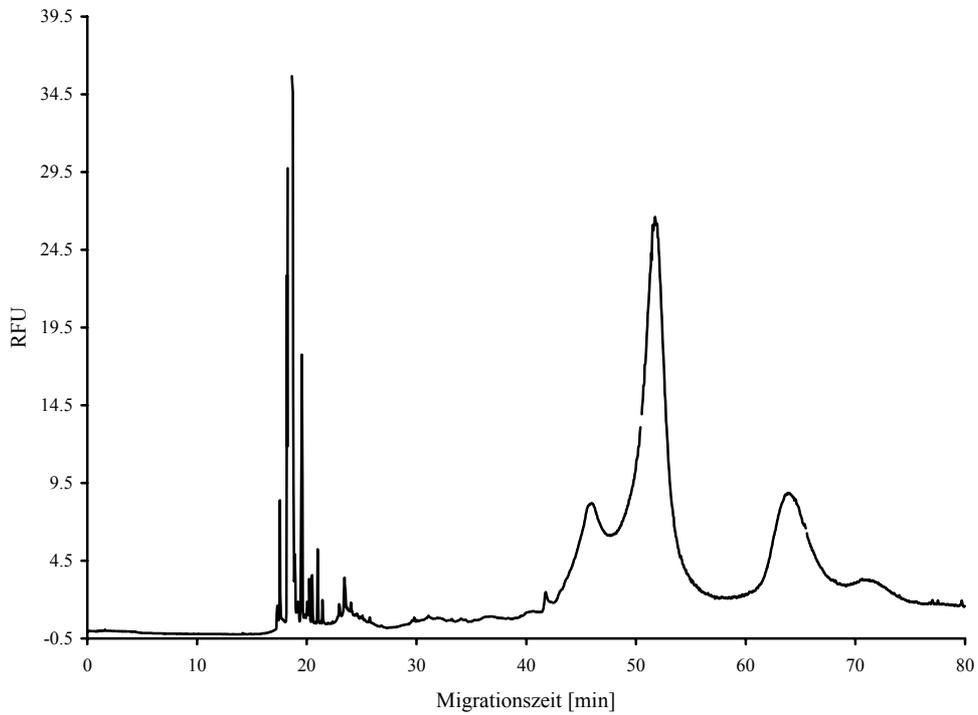


Abbildung 68: DNA von C6 Gliomazellen in Medium mit 1% Serum (Kontrolle)

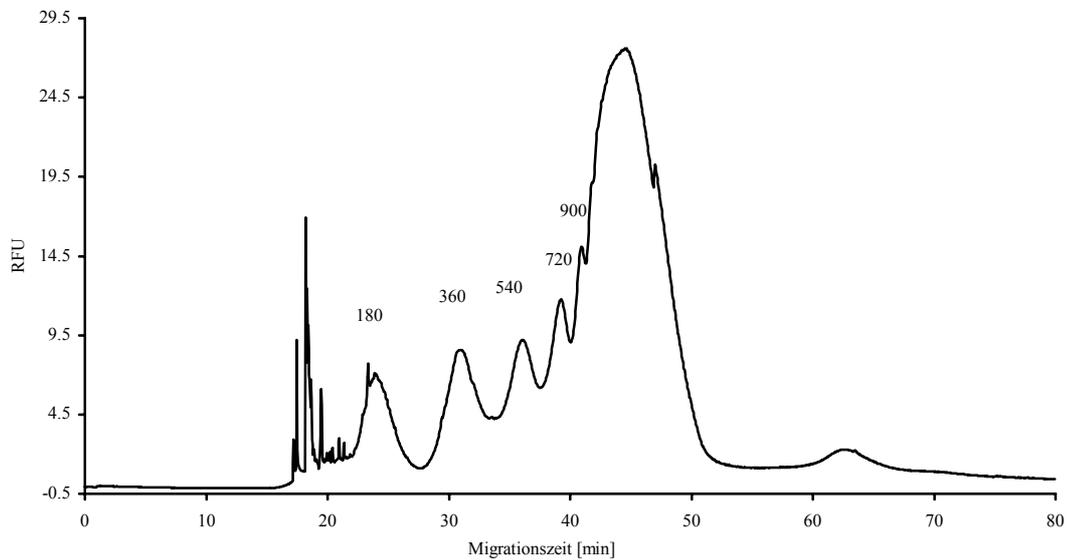


Abbildung 69: DNA von C6 Gliomazellen 48 h Behandlung mit 20  $\mu$ M Etoposid

Das aufgenommene Elektropherogramm Abbildung 69 zeigt eine deutliche Fragmentierung der genomischen DNA nach Inkubation der Zellen für 48 Stunden mit 20  $\mu$ M Etoposid. Man erkennt fünf Nukleosomeneinheiten in diskreten Banden im

Gegensatz zu scharfen Peaks bei Messung des DNA-Standards. Diese Unschärfe der Peaks ist auf die nukleosomale Fragmentierung zurückzuführen, die nicht sequentiell, sondern strikt nach Lage um das Nukleosom erfolgt. Dadurch entstehen bei der Fragmentierung eine Vielzahl von DNA-Fragmenten mit gleicher Länge aber unterschiedlicher Sequenz, die in der Polymerlösung unterschiedlich wandern <sup>[130]</sup>.

Um zu testen, ob unterschiedliche Konzentrationen an Etoposid einen Einfluß auf die Apoptoseinduktion haben, wurde unterschiedliche Mengen Etoposid dem Kulturmedium zugesetzt. Folgende Elektropherogramme wurden aufgezeichnet:

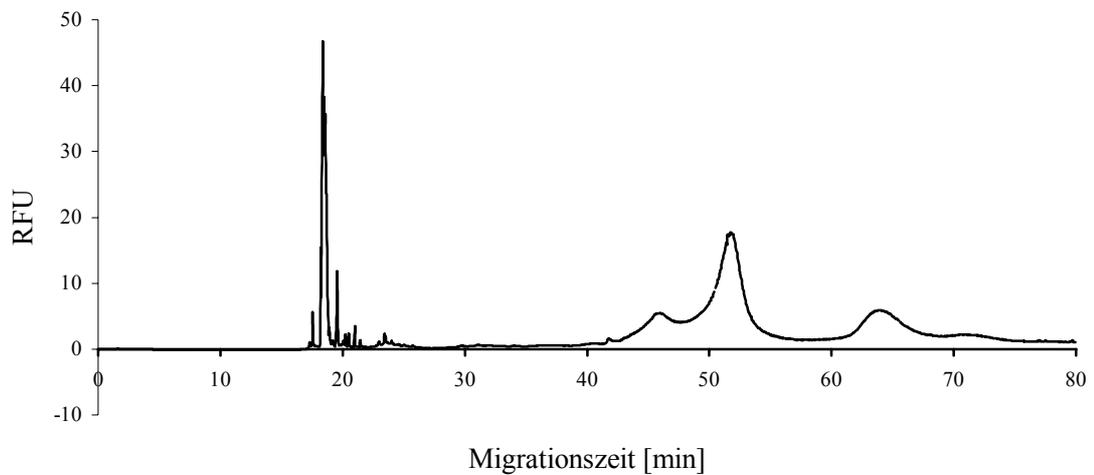


Abbildung 70: Elektropherogramm von DNA aus C6 Zellen in Normalserum

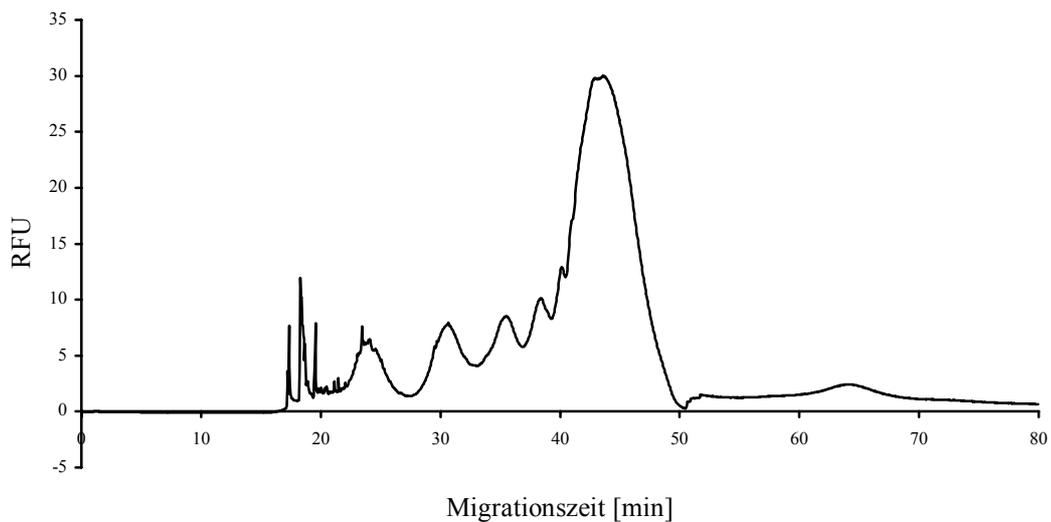


Abbildung 71: Elektropherogramm von DNA aus C6 Zellen mit 20 µl Etoposidlösung inkubiert

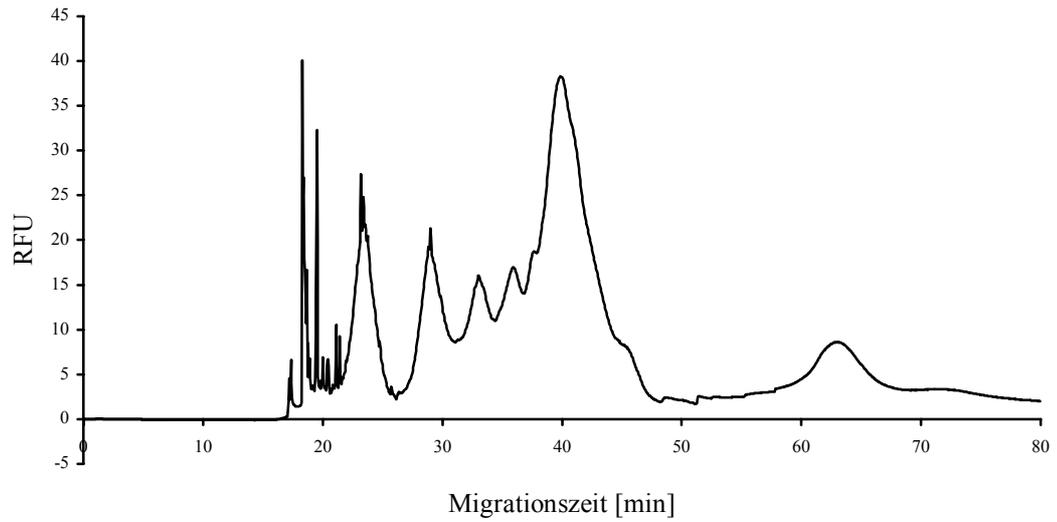


Abbildung 72: Elektropherogramm von DNA aus C6 Zellen mit 30 µl Etoposidlösung inkubiert

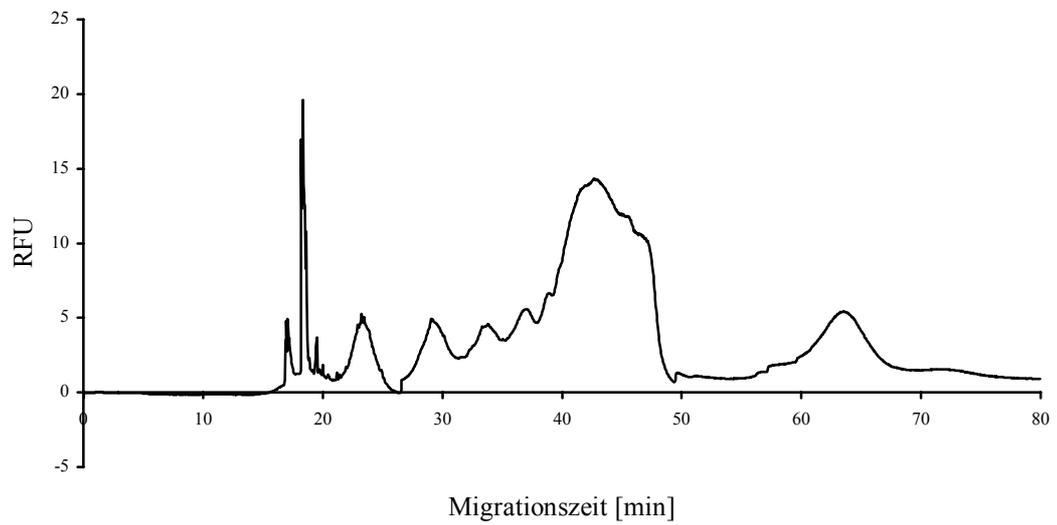


Abbildung 73: Elektropherogramm von DNA aus C6 Zellen mit 40 µl Etoposidlösung inkubiert

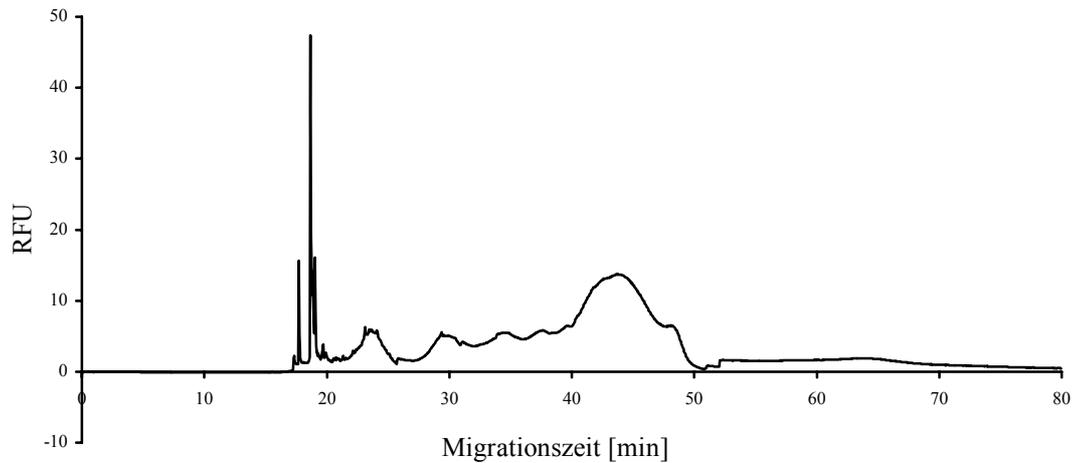


Abbildung 74: Elektropherogramm von DNA aus C6 Zellen mit 60 µl Etoposidlösung inkubiert

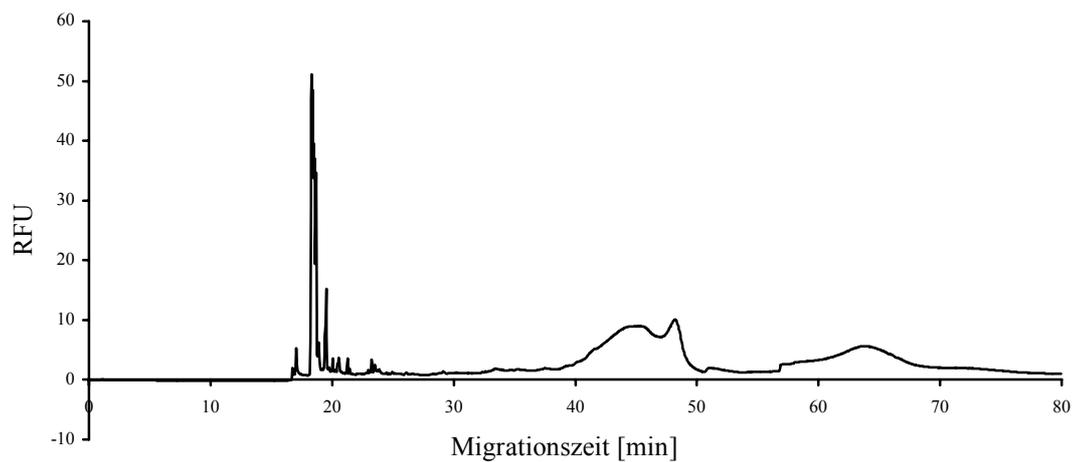


Abbildung 75: Elektropherogramm von DNA aus C6 Zellen ohne Serum inkubiert

Man erkennt, dass hohe Konzentrationen keine Steigerung in der Fragmentierung der DNA bewirken, im Gegenteil bei zu hohen Konzentrationen wird die DNA so stark geschädigt, dass die Fragmentierung abnimmt. Es tritt eine nekrotische Schädigung der Zelle ein, das DNA-Muster nähert sich deutlich dem der Probe ohne Serum im Kulturmedium an.

## Apoptose Assay in MCF 7 Zellen

In MCF 7 Zellen konnte keine Apoptose mittels Etoposid induziert werden.

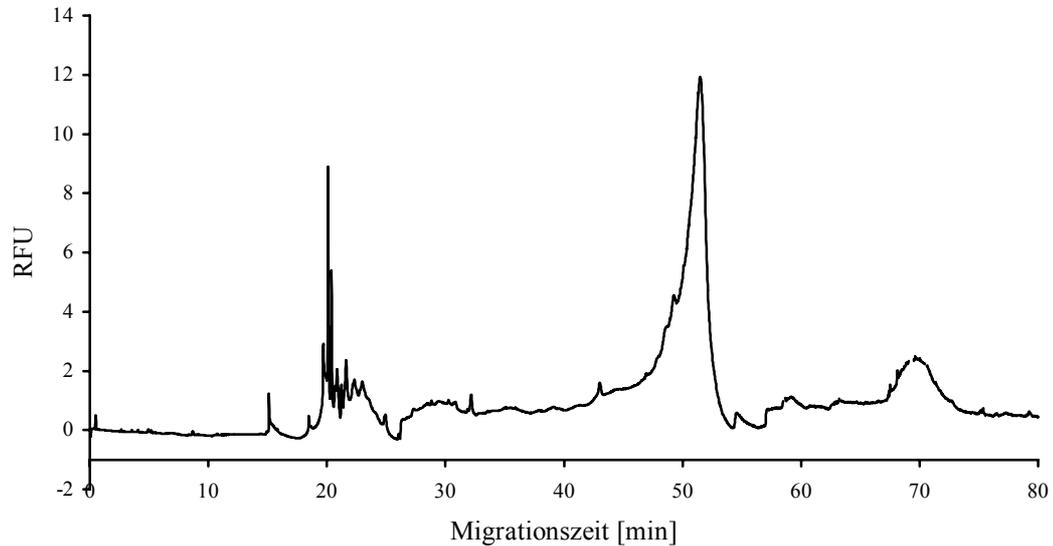


Abbildung 76: Elektropherogramm von DNA aus MCF 7 Zellen mit Etoposid inkubiert

Diese Nichtfragmentierung der DNA wird auf das Fehlen der Caspase 3 zurückgeführt<sup>[131, 132]</sup>. Das Fehlen der Caspase 3 wird in Zusammenhang mit der Resistenz von Brustkrebszellen auf verschiedene chemische Therapeutika gebracht.

Die Induktion der Apoptose gelingt in den MCF-7 Zellen durch Entzug von Serum<sup>[133]</sup>. Die Durchführung erfolgte analog zu den C6 Zellen. Nach einer Wachstumsphase wurde zu den fast konfluenten Zellen serumfreies Medium gegeben. Die Aufarbeitung der apoptotischen Zellen erfolgte nach dem gleichen Schema wie oben beschrieben.

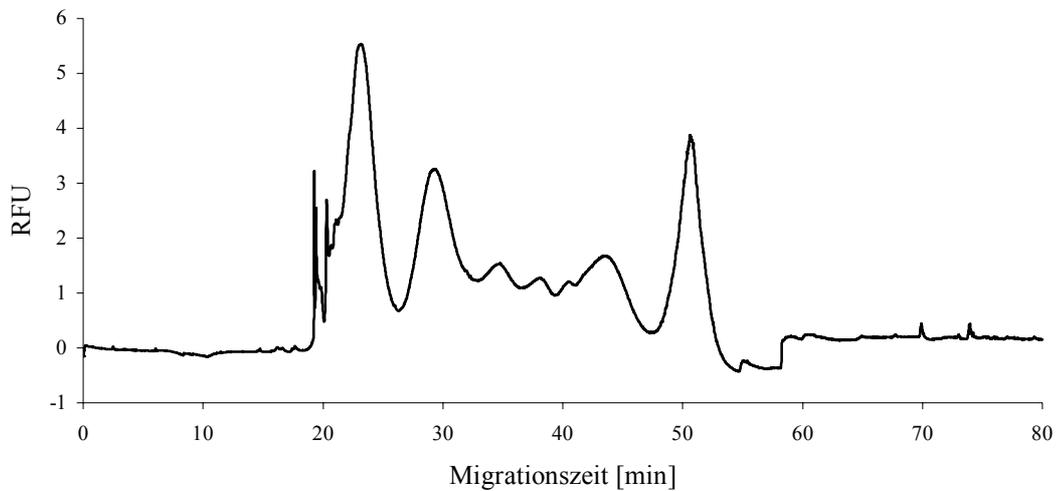


Abbildung 77: Elektropherogramm von DNA aus MCF 7 Zellen ohne Serum inkubiert

Man erkennt hier eine deutliche Fragmentierung der DNA, allerdings mit einem etwas anderen Muster im Vergleich zu den C6 Zellen. Die kleinen Teile der DNA-Leiter werden in höheren Konzentrationen gebildet als die größeren Fragmente.

### **Wirkung von VITAMIN D Analoga auf C6 Zellen**

Bei verschiedenen Tests unseres Arbeitskreises stand die Antitumor-Wirkung von Vitamin D im Vordergrund. Ein Einsatz in der Therapie von Gehirntumoren ist leider wegen des hohen hypercalcemischen Effekts und der geringen Bioverfügbarkeit nicht möglich. Aus diesem Grund ist man auf der Suche nach modifizierten Analoga, die diese beiden negativen Eigenschaften nicht zeigen. Im Fokus standen Analoga, die an der C3 Position eine Hydroxylgruppe in  $\alpha$ -Position statt der  $\beta$ -Position tragen<sup>[134]</sup>.

Apoptose wurde mittels zwei verschiedener Methoden nachgewiesen. Zum Einen durch Anfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst No. 33258, durch Zählung der Zellen mit apoptotischen Körperchen, und zum Anderen mittels Kapillarelektrophorese, um die Fragmentierung der DNA nachzuweisen.

Die Studie verglich die Effekte von verschiedenen Vitamin D-Analoga und deren Epimeren auf Wachstum und Apoptoseinduktion in C6 Gliomazellen. Dazu wurden zu C6 Gliomazellen verschiedene Konzentrationen von 0.3 bis 90 nM der Analoga gegeben und bis zu einer Woche inkubiert. Das Wachstum der Zellen wurde mittels Neutral Rot Test überprüft.

Zur Positivkontrolle wurde die Fragmentierung nach Einwirkung mit Etoposid herangezogen. Für die bessere Erkennung der Fragmentgrößen wurde die Standard DNA-Leiter mit zehn Fraktionen in 100er Schritten eingesetzt. Die Auftrennung des Standards erfolgte unmittelbar vor Lauf des DNA-Extraktes.

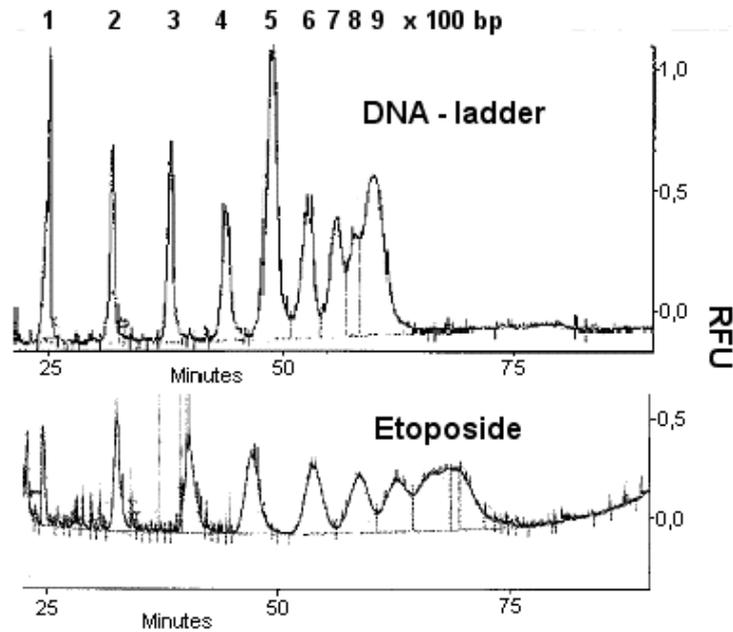


Abbildung 78: Elektropherogramme eines DNA-Standards (100 – 1000 bp in 100-er Schritten) und DNA-Extrakt von C6 Zellen, mit Etoposid für 118.5 h inkubiert, als Positivkontrolle

Die nächsten Elektropherogramme zeigen DNA-Extrakte, die mit natürlichen Vitamin D Metaboliten oder Analoga inkubiert wurden. In beiden Fällen wurde die DNA-Fraktionierung auch mittels Anfärbung mit Farbstoff Hoechst 33258 nachgewiesen.

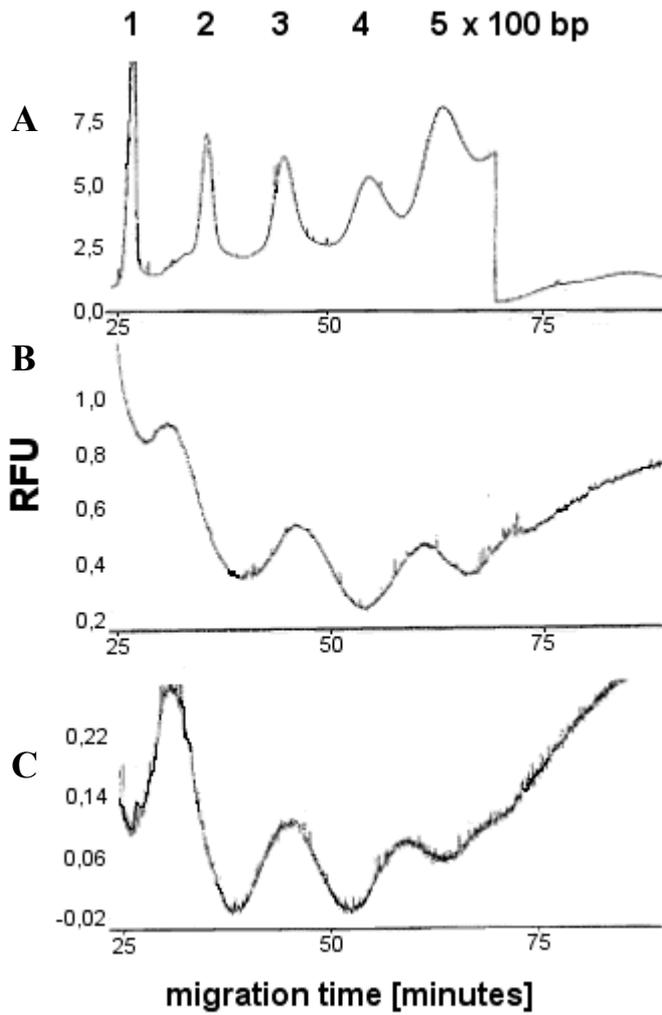


Abbildung 79: Elektropherogramme des DNA-Standards [A] und der DNA-Extrakte von C6 Zellen inkubiert mit 90 nM  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{-3-epi-D}_3$  [B] and  $1\alpha,25\text{-(OH)}_2\text{-16-ene-23-yne-26,27-F}_6\text{-D}_3$  [C] für 118.5h

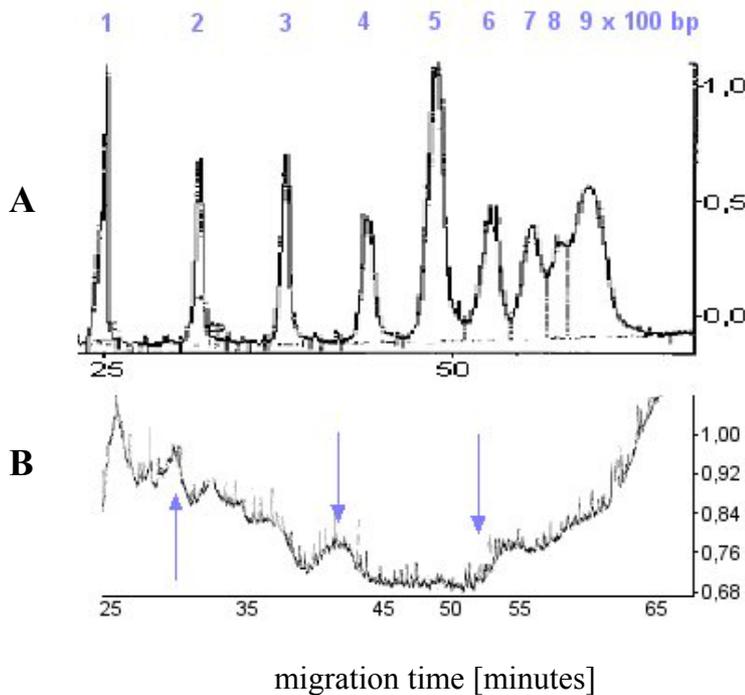


Abbildung 80: Elektropherogramme von Standard [A] und DNA-Extrakt von C6 Zellen inkubiert mit 90 nM  $1\alpha,25-(OH)_2D_3$  [B] für 118.5 h

Man erkennt eine apoptotische Wirkung aller getesteten Substanzen. Im Vergleich zu dem natürlichen Vitamin D (Abbildung 80. B) zeigen die Analoga eine stärkere Wirkung (Abbildung 79, B und C), erkennbar an den deutlicheren Fragmenten in den Elektropherogrammen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die von mir etablierte kapillarelektrophoretische Methode sehr gut geeignet ist die Fragmentierung der DNA und somit Apoptose in unterschiedlichen Zelllinien zu detektieren. Durch die Automatisierbarkeit, die geringe Probenmenge, und die online-Detektion ist die Kapillarelektrophorese der herkömmlichen Flachbettgelelektrophorese weit überlegen.

Die Assays bieten die Möglichkeit zum Screening von möglich apoptose-induzierenden Agentien. Im Gegensatz zu den herkömmlichen Cytotox-Assays ist dieser Assay spezifisch und zur Unterscheidung von Apoptose und Nekrose geeignet.

## ZUSAMMENFASSUNG

Am Anfang dieser Arbeit wurde die CE als hervorragende Methode zur Identifizierung und Charakterisierung von Nukleinsäuren und Nukleinsäure-Analoga etabliert. Die Anwendung der kommerziell erhältlichen Gelkapillaren führte zwar zu guten Trennergebnissen, zeigte jedoch erhebliche Mängel im praktischen Umgang (Giftigkeit der Agentien), eingeschränkte Lebensdauer der Gele aufgrund von Degradationsprozessen, in der Sensitivität sowie in der Reproduzierbarkeit der erhaltenen Ergebnisse.

Aus diesem Grund wurde die Methode im Bezug auf die Gelbildner und die verwendete Detektionsmethode erheblich verbessert. Die Verwendung von Cellulosederivaten als Gelbildner führte zu einer extrem robuster, sensitiven, preiswerten und ungiftigen Methode zur Trennung von komplexen Nukleinsäuregemischen. Die Möglichkeit die Trennmatrix für jeden Lauf zu erneuern, verbesserte die Reproduzierbarkeit der Methode enorm. Für verschiedene Trennprobleme kann durch einfache Veränderung der Viskosität oder der Konzentration des Gelbildners die Methode einfach und schnell optimiert werden.

Die etablierte Standardmethode konnte zur Detektion und Charakterisierung unterschiedlichster DNA-Fragmente herangezogen werden. So konnte eine Reinheitsprüfung für Oligonukleotide eingeführt werden, Mutationen detektiert werden oder ein weiterer Parameter zur Charakterisierung von Antisense-Oligonukleotide etabliert werden.

Die zusätzliche Einführung der laserinduzierten Detektion (LIF) in die Standardmethode führte zu einer enormen Steigerung der Sensitivität der Methode. Hiermit können 100-fach kleinere Konzentrationen von Nukleinsäuren detektiert werden, als mit der herkömmlichen UV-Detektion.

Basierend auf diesen Optimierungen ist es gelungen die entwickelte CE Methode als ein wesentlichen Bestandteil eines hochselektiven und spezifischen zellbasierten Modells zur Detektion von apoptotischen Vorgängen zu etablieren.

Dieses Modell hat, im Gegensatz zu den zahlreichen, existierenden Cytotox-Assays, den entscheidenden Vorteil, dass es auf Wirkebene detektiert und nicht nur Surrogatparameter, wie zum Beispiel Zellmembranschäden, erfasst. Trotzdem ist es

einfach und schnell durchführbar. Dadurch ist das etablierte Modell zur klaren Unterscheidung von Apoptose und Nekrose in der Lage. Diese klare Unterscheidung macht ein Wirkstoff-Screening von potentiell apoptose-induzierenden Wirkstoffen einfach und schnell möglich.

Wie gezeigt wurde, kann durch die Verwendung von Tumorzelllinien mit verschiedenen Prädispositionen die Unterscheidung von unspezifisch induzierter Apoptose, wie z.B. durch Serumentzug, und von spezifisch induzierter Apoptose, wie z.B. durch Etoposid bei Caspase-3 enthaltenden Zelllinien und Vitamin-D-Analoga bei Vitamin-D3-Rezeptor tragenden Tumorzelllinien, möglich gemacht werden.

Das Potential des etablierten Modells kann durch Einsatz verschiedenster Tumorzellen erweitert werden. So kann man die Wirksamkeit sowie die Resistenz der Tumorzellen gegenüber vorhandenen und neuen Tumorthapeutika ohne größere Probleme zeigen.

---

## LITERATUR

1. Tiselius, A., *A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures*. Trans Faraday Soc, 1937. **33**: p. 524-31.
2. Hjerten, S., *Free zone electrophoresis*. Chromatogr Rev, 1967. **9**(2): p. 122-219.
3. Mikkers, F.E.P., Everaerts, F.M., Verheggen, P.E.M., *High-performance zone electrophoresis*. Journal of chromatography, 1979. **169**: p. 11-20.
4. Jorgenson, J.W. and K.D. Lukacs, *Free-zone electrophoresis in glass capillaries*. Clin Chem, 1981. **27**(9): p. 1551-3.
5. Lachmann, B., *Dissertation Universität Frankfurt, 2000*. 2000.
6. Engelhardt H., B.W., Schmitt T., *Kapillarelektrophorese - Methoden und Möglichkeiten*. Verlagsgesellschaft Vieweg; Braunschweig, Wiesbaden, 1994.
7. Chiari, M., Cretich, M., *Capillary coatings (Capillary Electrophoresis of Nucleic Acids, Vol.1) edited by K.R. Mitchelson and J. Cheng, Humana Press Inc.* : p. 125-37.
8. Horvath, J. and V. Dolnik, *Polymer wall coatings for capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 2001. **22**(4): p. 644-655.
9. Righetti, P.G., Gelfi, C., Verzola, B., Castelletti, L., *The state of the art of dynamic coatings*. Electrophoresis, 2001. **22**: p. 603-11.
10. Foret, F., *et al.*, *Capillary zone electrophoresis of rare earth metals with indirect UV absorbance detection*. Electrophoresis, 1990. **11**(9): p. 780-3.
11. Shihabi, Z.K., *Analysis and general classification of serum cryoglobulins by capillary zone electrophoresis*. Electrophoresis, 1996. **17**(10): p. 1607-12.
12. Baryla, N.E., Lucy, C.A., *Simultaneous separation of cationic and anionic proteins using zwitterionic surfactants in capillary electrophoresis*. Analytical chemistry, 2000. **72**: p. 2280-84.

13. Figeys, D., Aebersold, R., *Capillary electrophoresis of peptides and proteins at neutral pH in capillaries covalently coated with polyethyleneimine*. Journal of Chromatography B, 1997. **695**(1): p. 163-68.
14. Deyl, Z., I. Miksik, and F. Tagliaro, *Advances in capillary electrophoresis*. Forensic Sci Int, 1998. **92**(2-3): p. 89-124.
15. Gordon, G.B., *US-Patent 5,061,361*, . 1991.
16. Chervet, J.P., *US-Patent 5,057,216*, . 1991.
17. Lottspeich, F., Zorbas, H., *Bioanalytik; Spektrum.Akad.Verlag, Heidelberg, Berlin*. 1998.
18. Swinney, K. and D.J. Bornhop, *Detection in capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 2000. **21**(7): p. 1239-1250.
19. Blaschke, G., Chankvetadze, B., *Enantionmer separation of drugs by capillary electromigration techniques*. Journal of Chromatography A, 2000. **875**: p. 3-25.
20. Fanali, S., *Enantioselective determination by capillary electrophoresis with cyclodextrins as chiral selectors*. J Chromatogr A, 2000. **875**(1-2): p. 89-122.
21. Armstrong, D.W., Rundlett, K.L., Chen, J.R., *Evaluation of the macrocyclic antibiotic vancomycin as a chiral selector for capillary electrophoresis*. Chirality, 1994. **6**(6): p. 496-509.
22. Hjerten, S., Mosbach, R., *"Molecular-sieve" chromatography of proteins on columns of cross-linked polyacrylamide*. Analytical Biochemistry, 1962. **3**: p. 109-18.
23. Mazzeo, J.R., Krull, I.S., *Capillary isoelectric focusing of proteins in uncoated fusedSilica capillaries using polymeric additives*. Analytical Chemistry, 1991. **63**: p. 2852-57.
24. Stegehuis, D.S., *et al.*, *Isotachophoresis as an on-line concentration pretreatment technique in capillary electrophoresis*. J Chromatogr, 1991. **538**(2): p. 393-402.
25. Colón, L.A., Maloney, T.D., Fermier, A.M., *Packing columns for capillary electrochromatography*. Journal of chromatography A, 2000. **887**: p. 43-53.
26. Altria, K.D., *Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography*. Journal of Chromatography A, 1999. **856**: p. 443-63.

- 
27. Sunada, W.M. and H.W. Blanch, *Polymeric separation media for capillary electrophoresis of nucleic acids*. *Electrophoresis*, 1997. **18**(12-13): p. 2243-2254.
  28. Noolandi, J., *et al.*, *Generalized tube model of biased reptation for gel electrophoresis of DNA*. *Science*, 1989. **243**(4897): p. 1456-8.
  29. Lerman, L.S., Frisch, H.L., *Why does the electrophoretic mobility of DNA in gels vary with the length of the molecule?* *Biopolymers*, 1982. **21**(5): p. 995-7.
  30. Lumpkin, O.J., P. Dejardin, and B.H. Zimm, *Theory of gel electrophoresis of DNA*. *Biopolymers*, 1985. **24**(8): p. 1573-93.
  31. Slater, G.W. and J. Noolandi, *New biased-reptation model for charged polymers*. *Physical Review Letters*, 1985. **55**(15): p. 1579-1582.
  32. Duke, T. and J.L. Viovy, *Theory of DNA electrophoresis in physical gels and entangled polymer solutions*. *Physical Review. E. Statistical Physics, Plasmas, Fluids, and Related Interdisciplinary Topics*, 1994. **49**(3): p. 2408-2416.
  33. Heller, C., *Principles of DNA separation with capillary electrophoresis*. *Electrophoresis*, 2001. **22**(4): p. 629-643.
  34. Lux, J.A., H.F. Yin, and G. Schomburg, *A simple method for the production of gel-filled capillaries for capillary gel electrophoresis*. *J. High Resolut. Chromatogr.*, 1990. **13**(6): p. 436-7.
  35. Hjerten, S., *High-performance electrophoresis. Elimination of electroendosmosis and solute adsorption*. *J. Chromatogr.*, 1985. **347**(2): p. 191-8.
  36. Cohen, A.S., Karger, B.L., *High-performance sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel capillary electrophoresis of peptides and proteins*. *J. of chromatography*, 1987. **397**: p. 409-17.
  37. Cohen, A.S., *et al.*, *Rapid separation of DNA restriction fragments using capillary electrophoresis*. *J Chromatogr*, 1988. **458**: p. 323-33.
  38. Kasper, T.J., *et al.*, *Separation and detection of DNA by capillary electrophoresis*. *J Chromatogr*, 1988. **458**: p. 303-12.
  39. Heller, C., *et al.*, *Free-solution electrophoresis of DNA*. *J. Chromatogr., A*, 1998. **806**(1): p. 113-121.

- 
40. Heller, C., *Finding a universal low-viscosity polymer for DNA separation*. Electrophoresis, 1998. **19**(10): p. 1691-1698.
  41. Heller, C., *Finding a universal low viscosity polymer for DNA separation (II)*. Electrophoresis, 1998. **19**(18): p. 3114-3127.
  42. Bocek, P. and A. Chrambach, *Capillary electrophoresis of DNA in agarose solutions at 40.degree.C*. Electrophoresis (Weinheim, Fed. Repub. Ger.), 1991. **12**(12): p. 1059-61.
  43. Bocek, P. and A. Chrambach, *Capillary electrophoresis in agarose solutions: extension of size separations to DNA of 12 kb in length*. Electrophoresis (Weinheim, Fed. Repub. Ger.), 1992. **13**(1-2): p. 31-4.
  44. Bode, H.J., *The use of liquid polyacrylamide in electrophoresis. I. Mixed gels composed of agar-agar and liquid polyacrylamide*. Analytical Biochemistry, 1977. **83**(1): p. 204-10.
  45. Bode, H.J., *The use of liquid polacrylamide in electrophoresis. II. Relationship between gel viscosity and molecular sieving*. Analytical Biochemistry, 1977. **83**(2): p. 364-71.
  46. Brandrup, J., Immergut, E.H., *Polymer Handbook*. John Wiley Sons, New York, .
  47. Grossman, P.D. and D.S. Soane, *Capillary electrophoresis of DNA in entangled polymer solutions*. J Chromatogr, 1991. **559**(1-2): p. 257-66.
  48. Grossman, P.D. and D.S. Soane, *Experimental and theoretical studies of DNA separations by capillary electrophoresis in entangled polymer solutions*. Biopolymers, 1991. **31**(10): p. 1221-8.
  49. Barron, A.E., Blanch, H.W., Soane, D.S., *A transient entanglement coupling mechanism for DNA separation by capillary electrophoresis in ultradilute polymer solutions*. Electrophoresis, 1994. **15**(5): p. 597-615.
  50. Hubert, S.J., Slater, G.W., *Theory of capillary electrophoretic separation of DNA using ultradilute polymer solutions*. Macromolecules, 1996. **29**: p. 1006-09.
  51. Sunada, W.M. and H.W. Blanch, *A theory for the electrophoretic separation of DNA in polymer solutions*. Electrophoresis, 1998. **19**(18): p. 3128-3136.

- 
52. Kerr, J., Wyllie, AH and Currie, AR., *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**: p. 239-57.
  53. Wyllie, A., Morris, RG, Smith, AL and Dunlop, D., *Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis*. J. Pathol, 1984. **142**: p. 67-77.
  54. Hinchliffe, J., *Cell death in embryogenesis*. 1981: London: Chapman and Hall.
  55. Oppenheim, R.C.G.a.n.d.I.N., 248., *Cyclic GMP and neurone death [letter]*. Nature, 1985. **313**: p. 248.
  56. Hurle, J.C.d.i.d.s.M.A.E.P., **55-86.**, *Cell death in developing systems*. Methods Achiev Exp Pathol, 1988. 13: p. 55-86.
  57. Kerr, J., Harmon, B and Searle, J., *An electron-microscope study of cell deletion in the anuran tadpole tail during spontaneous metamorphosis with special reference to apoptosis of striated muscle fibers*. J Cell Sci, 1974. **14**: p. 571-85.
  58. Shi, Y., Sahai, BM and Green, DR. (1989). Cyclosporin A inhibits activation-induced cell death in T- and -. cell hybridomas and thymocytes. Nature **339**: p. 625-6.
  59. Stacey, N., Bishop, CJ, Halliday, JW, Halliday, WJ, Cooksley, WG, Powell, LW and Kerr, JF., *Apoptosis as the mode of cell death in antibody-dependent lymphocytotoxicity*. J Cell Sci, 1985. **74**: p. 169-79.
  60. Loo, D., Copani, A, Pike, CJ, Whitemore, ER, Walencewicz, AJ and Cotman, CW., *Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons*. Proc Natl Acad Sci USA, 1993. **90**: p. 7951-5.
  61. Takashima, A., Noguchi, K, Sato, K, Hoshino, T and Imahori, K., *Tau protein kinase I is essential for amyloid beta-protein-induced neurotoxicity*. Proc Natl Acad Sci USA, 1993. **90**: p. 7789-93.
  62. Terai, C., Kornbluth, RS, Pauza, CD, Richman, DD and Carson, DA., *Apoptosis as a mechanism of cell death in cultured T lymphoblasts acutely infected with HIV-1*. J Clin Invest, 1991. **87**: p. 1710-5.

- 
63. Strasser, A., Harris, AW, Bath, ML and Cory, S., *Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2*. Nature, 1990. **348**: p. 331-3.
  64. Strasser, A., Whittingham, S, Vaux, DL, Bath, ML, Adams, JM, Cory, S and Harris, AW., *Enforced BCL2 expression in B-lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease*. Proc Natl Acad Sci USA, 1991. **88**: p. 8661-5.
  65. Levine, B., Huang, Q, Isaacs, JT, Reed, JC, Griffin, DE and Hardwick, JM., *Conversion of lytic to persistent alphavirus infection by the bcl-2 cellular oncogene*. Nature, 1993. **361**: p. 739-42.
  66. Raff, M., *Social controls on cell survival and cell death*. Nature, 1992. **356**: p. 397-400.
  67. Purves, D., Snider, WD and Voyvodic, JT., *Trophic regulation of nerve cell morphology and innervation in the autonomic nervous system*. Nature, 1988. **336**: p. 123-8.
  68. Oppenheim, R., *Cell death during development of the nervous system*. Annu Rev Neurosci, 1991. **14**: p. 453-501.
  69. Hengartner, M.a.H., HR., *The ins and outs of programmed cell death during C. elegans development*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1994a. **345**: p. 243-6.
  70. Ellis, R., Jacobson, DM and Horvitz, HR., *Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in Caenorhabditis elegans*. Genetics, 1991a. **129**: p. 79-94.
  71. Raff, M., Barres, BA, Burne, JF, Coles, HS, Ishizaki, Y and Jacobson, MD., *Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system*. Science, 1993. **262**: p. 695-700.
  72. Wyllie, A., Beattie, GJ and Hargreaves, AD., *Chromatin changes in apoptosis*. Histochem J, 1981. **13**: p. 681-92.
  73. Walker, N., Harmon, BV, Gobe, GC and Kerr, JF., *Patterns of cell death*. Methods Achiev Exp Pathol, 1988. **13**: p. 18-54.

- 
74. Savill, J.a.F., V., *Corpse clearance defines the meaning of cell death*. Nature, 2000. **407**: p. 784-8.
75. Holmgren, L., Szeles, A, Rajnavolgyi, E, Folkman, J, Klein, G, Ernberg, I and Falk, KI., *Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies*. Blood, 1999. **93**: p. 3956-63.
76. Nicholson, D.a.T., NA, *Caspases: killer proteases*. Trends Biochem. Sci, 1997. **22**: p. 299-306.
77. Kuida, K., Haydar, TF, Kuan, CY, Gu, Y, Taya, C, Karasuyama, H, Su, MS, Rakic, P and Flavell, and R, *Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9*. Cell, 1998. **94**: p. 325-337.
78. Cryns, V.a.Y., J, *Proteases to die for*. Genes Dev, 1998. **12**: p. 1551-70.
79. Gervais, F., Xu, D, Robertson, GS, Vaillancourt, JP, Zhu, Y, Huang, J, LeBlanc, A, Smith, D, and M. Rigby, Shearman, MS et al, *Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid- beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formatio*. Cell, 1999. **97**: p. 395-406.
80. Hendzel, M., Nishioka, WK, Raymond, Y, Allis, CD, Bazett-Jones, DP and Th'ng, JP, *Chromatin condensation is not associated with apoptosis*. J Biol Chem, 1998. **273**: p. 24470-8.
81. Robertson, J., Orrenius, S and Zhiotovskiy, B, *Review: nuclear events in apoptosis*. J. Struct Biol, 2000. **129**: p. 346-58.
82. Enari, M., Hase, A and Nagata, S., *Apoptosis by a cytosolic extract from Fas-activated cells*. Embo J, 1995. **14**: p. 5201-8.
83. Enari, M., Sakahira, H, Yokoyama, H, Okawa, K, Iwamatsu, A and Nagata S, *A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD*. Nature, 1998. **391**: p. 43-50.
84. Sakahira, H., Enari, M and Nagata, S, *Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis*. Nature, 1998. **391**: p. 96-99.
85. Nagata, S., *Apoptotic DNA fragmentation,*. Exp Cell Res, 2000. **256**: p. 12-18.
86. Wyllie, A.H., Kerr, J.F., Currie, A.R., *Cell death: the significance of apoptosis*. Int Rev Cytol, 1980. **68**: p. 251-306.

- 
87. Arends, M.J., Morris, R.G., Wyllie, A.H., *Apoptosis. The role of endonuclease.* American Journal of Pathology, 1990. **136**(3): p. 593-608.
  88. Ucker, D.S., Obermiller, P.S., Eckhart, W., Apgar, J.R., Berger, N.A., Meyers, J., *Genome digestion is a dispensable consequence of physiological cell death mediated by cytotoxic T lymphocytes.* Mol. Cell. Biol., 1992. **12**: p. 3060-69.
  89. Wang, J., *Recent studies of DNA topoisomerases.* Biochim Biophys Acta, 1987. **909**: p. 1-9.
  90. Bossy-Wetzel, E., Newmeyer, DD and Green, DR., *Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD- specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization.* . Embo J, 1998. **17**: p. 37-49.
  91. Horwitz, S.a.H., MS, *Effects of camptothecin on the breakage and repair of DNA during the cell cycle.* Cancer Res, 1973. **33**: p. 2834-6.
  92. Capranico, G., Zunino, F, *DNA topoisomerase-trapping antitumor drugs.* Eur J Cancer, 1992. **28**: p. 2055-60.
  93. Schuster, I., Egger, H., Astecker, N., Herzig, G., Reddy, G.S., Stuetz, A., Stuetz, P., Vorisek, G., *Selective inhibition of vitamin D hydroxylases in human keratinocytes.* Steroids, 2001a. **66**: p. 409-22.
  94. Schuster, I., Egger, H., Bikle, D., Herzig, G., Schüssler, M., Vorisek, G., *Selective inhibitors of CYP24: mechanistic tools to explore vitamin D metabolism in human keratinocytes.* Steroids, 2001b. **66**: p. 451-62.
  95. Jones, G., Strugnell, S., DeLuca, H-F., *Current understanding of the molecular actions of vitamin D.* D. Physiol. Rev, 1998. **78**: p. 1193-31.
  96. Carlberg, C., Quarck, M., Herdick, M., Bury, Y., Polly, P., Toell, A., *Central role of VDR conformations for understanding selective actions of vitamin D(3) analogues.* Steroids, 2001. **66**(3-5): p. 213-21.
  97. Walters, M.R., *Newly identified actions of the vitamin D endocrine system.* Endocr rev, 1992. **13**: p. 719-64.
  98. Mathieu, C., Adorini, L., *The coming of age of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) analogs as immunomodulatory agents.* Trends Mol Med, 2002. **8**: p. 174-9.

- 
99. Garcion, E., Wion-Barbot, N., Montero-Menei, C.N., Berger, F., Wion, D., *New clues about vitamin D functions in the nerous system*. Trends Endocrinol Metab, 2002. **13**: p. 100-15.
  100. Schmalzing, D., *et al.*, *Characterization and performance of a neutral hydrophilic coating for the capillary electrophoretic separation of biopolymers*. J. Chromatogr., 1993. **652**(1): p. 149-59.
  101. Evans, M.D., *et al.*, *Analysis of internucleosomal DNA fragmentation in apoptotic thymocytes by dynamic sieving capillary electrophoresis*. J. Chromatogr., A, 1995. **700**(1 + 2): p. 151-62.
  102. Katalog, M.P., .
  103. Lindl, T., *Zell- und Gewebekultur*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin. 2000.
  104. Sato, G., *The growth of cells in serum-free hormon-supplemented medium*. in Jakoby, W.B., Parlan, I.H. 8eds): Methods in enzymology. Acad. Press New York,, 1979: p. 94-109.
  105. Russel, W.C.e.a., *A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses*. Nature, 1975. **253**: p. 461-62.
  106. Mullis, K.B., *Eine Nachtfahrt und die Polymerase-Kettenreaktion*. Spektrum der Wissenschaft, 1990. **6**: p. 60-67.
  107. Kuppeveld van, F.J.M., Johansson, K.-E., Galama, J.M.D., Kissing, J., Bölske, G., Logt van der, J.T.M., Melchers, W.J.G., *Detection of mycoplasma contamination in cell cultures by a mycoplasma group-specific PCR*. Applied and Enviromental Microbiology, 1994. **60**(1): p. 149-52.
  108. Soule, H.D., Locke, E.R., Brooks, S.C., *A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma*. J. Natl. Cancer Inst., 1973. **51**: p. 1409-16.
  109. Benda, P., *Differentiated rat glial cell strain in tissue culture*. Science, 1968. **161**: p. 370-71.
  110. Burden, D.A., *et al*, *Topoisomerase II-etoposide interactions direct the formation of drug-induced enzyme-DNA cleavage complexes*. . J. Biol. Chem., 1996. **271**: p. 29238-29244.

- 
111. Hande, K.R., *Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor*. Eur. J. Cancer, 1998. **34**: p. 1514-1521.
  112. Chow, K.C., and Ross, W.E, *Topoisomerase-specific drug sensitivity in relation to cell cycle progression*. Mol. Cell Biol, 1987. **7**: p. 3119-3123.
  113. Inaba, M., et al, *Different modes of cell-killing action between DNA topoisomerase I and II inhibitors revealed by kinetic analysis*. Jpn. J. Cancer Res., 1994. **85**: p. 187-193.
  114. Sambrook, J.F., E.F.; Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 1982.
  115. Elbashir, S.M.H., J.; Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T., *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. Nature, 2001. **411**: p. 494-8.
  116. Stellwagen, N.C., Gelfi, C., Righetti, P.G., *The free solution mobility of DNA*. Biopolymers, 1997. **42**: p. 687-703.
  117. Han, F., Huynh, B.H., Ma, Y., Lin, B., *High-Efficiency DNA Separation by Capillary Electrophoresis in a Polymer Solution with Ultralow Viscosity*. Anal. Chem., 1999. **71**: p. 2385-89.
  118. Heller, C., *Separation of double-stranded and single-stranded DNA in polymer solutions. Part I. Mobility and separation mechanism*. Electrophoresis, 1999. **20**(10): p. 1962-1977.
  119. Barron, A.E., W.M. Sunada, and H.W. Blanch, *The effects of polymer properties on DNA separations by capillary electrophoresis in uncross-linked polymer solutions*. Electrophoresis, 1996. **17**(4): p. 744-757.
  120. Todorov, T.I., Morris, M.D., *Comparison of RNA, single-stranded DNA and double-stranded DNA behavior during capillary electrophoresis in semidilute polymer solutions*. Electrophoresis, 2002. **23**: p. 1033-44.
  121. Cotten, M., Oberhauser, B., Brunar, H., Holzner, A., Issakides, G., Noe, C.R., Schaffner, G., Wagner, E., Birnstiel, L.M., *2'-O-methyl, 2'-O-ethyl oligoribonucleotides and phosphorothioate oligodeoxyribonucleotides as inhibitors of the in vitro U7 snRNP-dependent mRNA processing event*. Nucleic Acids Research, 1991. **19**: p. 2629-2635.

- 
122. Wagner, E., Oberhauser, B., Holzner, A., Brunar, H., Issakides, G., Schaffner, G., Cotten, M., Knollmüller, M., Noe, C.R.; *A simple procedure for the preparation of protected 2'-O-methyl or 2'-O-ethyl ribonucleoside-3'-O-phosphoramidites*. Nucleic Acids Research, 1991. **19**: p. 5965-5971.
123. Kambhori, M. and H. Kambara, *Characteristics of single-stranded DNA separation by capillary gel electrophoresis*. Electrophoresis, 1996. **17**(9): p. 1476-1484.
124. Righetti, P.G., Gelfi, C., *Capillary electrophoresis of DNA for molecular diagnostics*. Electrophoresis, 1997. **18**(10): p. 1709-14.
125. Mitchelson, K.R., Cheng, J., Kricka, L.J., *The use of capillary electrophoresis for point-mutation screening*. Trends BioTech, 1997. **15**: p. 448-58.
126. Glisic, S., Sunjevaric, I., Alavantic D., *Genotyping apolipoprotein B signal peptide insertion/deletion: A comparison of three methods*. Electrophoresis, 1995. **16**: p. 899-902.
127. Baba, Y., Tomisaki, R., Sumita, C., Morimoto, I., Sugita, S., Tshako, M., Miki, T., Ogihara, T., *Rapid typing of variable number of tandem repeat locus in the human apolipoprotein B gene for DNA diagnosis of heart disease by polymerase chain reaction and capillary electrophoresis*. Electrophoresis, 1995. **16**: p. 1437-40.
128. Lehmann, R., Koch, M., Pfohl, M., Voelter W., Häring, H.-U., Liebich H.M., *Screening and identification of familial defective apolipoprotein B-100 in clinical samples by capillary gel electrophoresis*. J.of Chromatography A, 1996. **744**: p. 187-94.
129. Oberhammer, F., Wilson, J.W., Dive, C., Morris, I.D., Hickmann, J.A., Wakeling, A.E., Walker, P.R., Sikorska, M., *Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in absence of internucleosomal fragmentation*. EMBO J, 1993. **12**: p. 3679-84.
130. Siles B. A., N.Z.E., Collier B. G., *Analysis of DNA fragmentation using a dynamic size-sieving polymer solution in capillary electrophoresis*. J. Chromatogr. A, 1997. **771**: p. 319-29.
131. Yang, X.-H., Sladek T.L., Liu, X., Butler, B.R., Froelich, C.J., Thor A.D., *Reconstitution of Caspase 3 Sensitizes MCF-7 Breast Cancer Cells to Doxorubicin- and Etoposid-induced Apoptosis*. Cancer research, 2001. **61**: p. 348-54.

- 
132. Porter, A.G., Janicke, R.U., *Emerging roles of caspase-3 in apoptosis*. Cell Death Differ., 1999. **6**(2): p. 99-104.
  133. Pirianov, G., Colston K.W., *Interaction of vitamin D analogs with signaling pathways leading to active cell death in breast cancer cells*. Steroids, 2001. **66**: p. 309-28.
  134. Nakagawa, K., Sowa, Y., Kurobe, M., Otono, K., Siu-Caldera, M.L., Reddy, G.S., Uskokovic, M.R., Okano, T., *Differential activities of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy-16-ene-vitamin D(3)analogs and their 3-epimers on human promyelocytic leukemia (HL-60) cell differentiation and apoptosis*. Steroids, 2001. **66**: p. 327-37.

---

# LEBENS LAUF

## PERSÖNLICHE DATEN

geboren am 24.05.1967, Heltau, Rumänien

deutsch

ledig

## BERUFLICHE TÄTIGKEITEN UND PRAKTIKA

- seit 12.2003                    **Leiter Qualitätskontrolle Rohstoffe**, Pharmazeutische Qualitätskontrolle, Merck KGaA, Darmstadt
- 05.2003-11.2003            **Fachreferentin Rohstoffe**, Pharmazeutische Qualitätskontrolle, Merck KGaA, Darmstadt
- 01.1998-12.2003            **Wissenschaftliche Angestellte** am Institut für Pharmazeutische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main  
Betreuung des Studentenpraktikums „Arzneibuchanalytik“ und Durchführung von Seminaren
- 03.1997-12.1997            **Wissenschaftliche Hilfskraft** am Institut für Pharmazeutische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt
- 11.1995-12.1996            **Praktisches Jahr**: Main Apotheke, Frankfurt; Viktoria Apotheke, Frankfurt; Fresenius AG (Rohstoffkontrolle), Friedrichsdorf
- 04.1989-03.1991            **Pharmazeutisch-technische Assistentin** in der Central Apotheke, Bad Nauheim
- 08.1988-02.1989            **Praktische Ausbildung** zur PTA in der Central Apotheke, Bad Nauheim

## **BILDUNGSWEG**

- 03.1997-12.2002      Promotion am Institut für Pharmazeutische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt mit dem Thema „Kapillarelektrophorese von Nukleinsäuren“ unter der Leitung von Prof. Dr. Noe  
Forschungsaufenthalte am Institut für Medizinische/Pharmazeutische Chemie der Universität Wien, Österreich
- 06.02.1997            Approbation als Apothekerin
- 04.1991-10.1995      Pharmaziestudium, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
- 22.03.1989            Erlaubnis zur Führung der Berufsbezeichnung PTA
- 08.1986-08.1988      Lehranstalt für pharmazeutisch-technische Assistenten in der Stiftung Collegium Pharmaceuticum Frankfurt Main

## **SCHULBILDUNG**

- 12.1982-06.1986      Ernst-Ludwig-Gymnasium, Bad Nauheim; Abitur
- 30.11.1982            Übersiedlung in die Bundesrepublik Deutschland
- 1981-1982            Lyzeum für Mathematik und Physik, Hermannstadt, Rumänien
- 1973–1980            Grundschule, Hermannstadt, Rumänien

## **AKADEMISCHE LEHRER**

G. Dannhardt, Th. Dingermann, J. Dressmann, E. Ehlers, J. Kreuter, G. Lambrecht, H. Linde, E. Mutschler, C.R. Noe, D. Steinhilber

---

# PRÄSENTATIONEN

## Poster

C. Edling, A. Riniotis, B. Lachmann, D. Werner und C. R. Noe: "**Einfluß der 2'-O-Modifikation auf das kapillarelektrophoretische Verhalten von Oligonukleotiden**"; Poster 7, Analytica Conference 98, 21. bis 24.4.1998, München; *Analytica Conference Abstractband S. 491.*

Edling, C. Fisher, E., Noe, C. R., Gross, W.: "**Separation of INS/DEL Polymorphism in the signal peptide sequence of Apolipoprotein B gene by capillary electrophoresis**"; Poster 28, European Graduate Student Meeting (DPHG/EUFEPS), 22. bis 22.2.1998, Frankfurt; *Die Pharmazie, Supplement 1, Vol. 53, (1998) 3, S. 13.*

C. Edling, B. Lachmann und C. R. Noe: "**Trenneffizienz und Viskosität verschiedener Cellulosederivate in der Kapillarelektrophorese**"; Poster 101, Analytica Conference 2000, 11. bis 14.4.2000, München.

C. Edling, B. Lachmann, I. Schuster, J. Elias und C. R. Noe: "**Detektion apoptotischer DNA-Fragmente mittels Kapillarelektrophorese und laser-induzierter Fluoreszenzdetektion**"; Poster Bio 5, Analytica Conference 2002, 23. bis 25.4.2002, München.

## Artikel

J. Elias, B. Marian, C. Edling, B. Lachmann, C. R. Noe, R. Schulte-Hermann and I. Schuster: „**Induction of apoptosis by vitamin D metabolites and analogs in a glioma cell line**“; *Recent Results in Cancer Research*, 2003, **164** (*Vitamin D Analogs in Cancer Prevention and Therapy*), S. 319-332