

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen

Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

Vorgelegt von

Diplom-Chemikerin Andrea Nies

aus Ludwigshafen am Rhein

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Oktober 2010

Markierung lipophiler Flüssigkeiten mit
oligomeren Peptidnukleinsäuren (PNAs) und
Desoxyribonukleinsäuren (DNAs)

Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Wolfrum

Prof. Dr. Markus Sauer

Meinem Vater

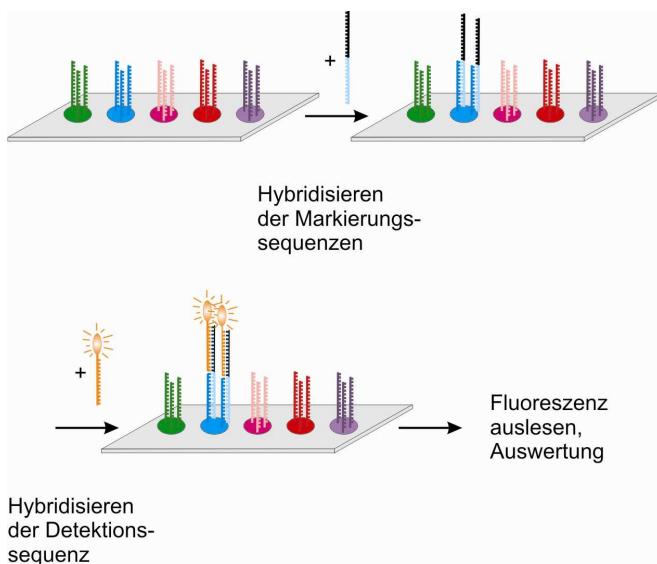
Jener, der sagt, es ist nicht zu schaffen,
sollte niemals jenen unterbrechen, der es tut.

Römische Weisheit

KURZZUSAMMENFASSUNG

Fälschungen industrieller Produkte, die erhebliche ökonomische und auch Sicherheitsprobleme aufwerfen, nehmen für zahllose Produktkategorien kontinuierlich zu. Neben monetären Einbußen sind vor allem gesundheitliche Risiken für die Verbraucher eine große Gefahr, welche beispielsweise von gefälschten Medikamenten ausgeht. Die Hersteller versuchen als Gegenmaßnahme ihre Waren fälschungssicher zu markieren, aktuell mit DNA als Markierungssubstanz. In ähnlicher Weise können auch Peptidnukleinsäure (PNAs) eingesetzt werden, die erhebliche Vorteile gegenüber der DNA besitzen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung eines solchen Systems für lipophile Medien, wie z.B. Öle und Künstlerfarben. Als Markierungssequenzen wählt man einsträngige 10- bis 25mere PNAs. Es werden durch beidseitig angehängte Phenylalaninreste lipophilisierte PNAs neben analogen, unmodifizierten PNAs, untersucht. Beide Substanzgruppen eignen sich gleichermaßen zur Dotierung lipophiler Flüssigkeiten, wie Nujol, Sonnenblumen-, Diesel- sowie Leinöl. Aus diesen Medien erfolgt die Extraktion mittels wässriger Säure. Die extrahierte PNA lässt sich im Anschluss am besten auf einer PEGMA-*Microarray*-Oberfläche detektieren, da



Schema I: Aufbau des Dreistrangsystems.

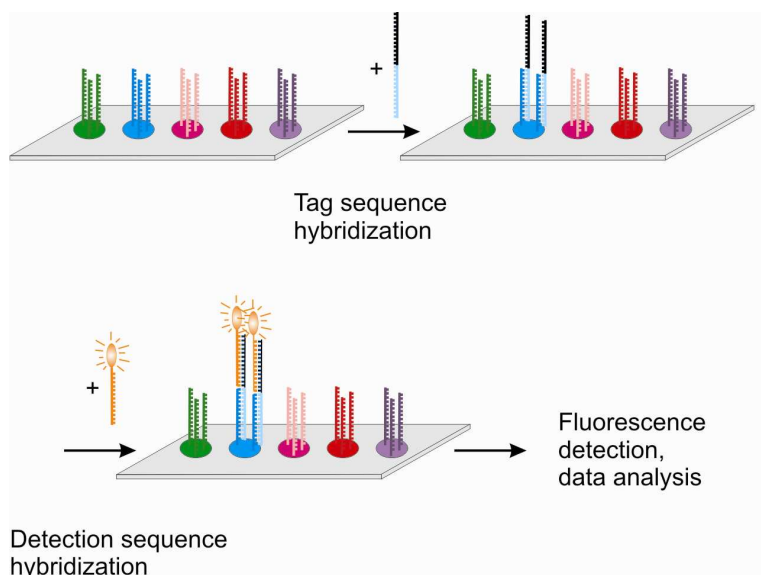
diese eine ausreichende Passivierung gegenüber dem stark adsorbierenden Polymer aufweist. Mittels eines im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Dreistranghybridisierungssystems (s. Schema I), bestehend aus zwei weiteren Oligomeren, ist die PNA-Detektion bis zu 300 amol möglich.

Das vorgestellte System wurde im Folgenden auf seine Tauglichkeit überprüft, um PNA-markierte Bleistifte von nicht markierten zu unterscheiden. Die Markierung wurde vom Hersteller (*Faber-Castell*) vorgenommen und war nicht bekannt. Die derart präparierten Stifte konnten mittels der beschriebenen Dreistranghybridisierung zweifelsfrei identifiziert werden.

ABSTRACT

Fakes of industrial products being the cause of tremendous economical and safety problems are going to increase in many product categories. Besides financial losses also health risks caused by fake drugs are great threats for the consumers. For the sake of anti-counterfeiting manufacturers start tagging their goods what is lately done with DNA being added. A similar way of labeling could be done by **Peptide Nucleic Acids (PNAs)**, which have certain advantages over DNA.

The ultimate aim of this thesis is the establishment of such a system. For this purpose single stranded PNAs of 10 to 25 units in length are chosen. The method is thought to be applied primarily to label lipophilic liquids like oils or artist colors. Thus



Scheme I: Setup of the three strand hybridization system.

besides PNAs also analogous PNAs modified at both ends with phenylalanine residues (to enhance lipophilicity) are used. Both types are suitable to tag lipophilic liquids such as nujol, sunflower oil, diesel oil and linseed oil. From these materials the PNAs can be extracted by aqueous acid. Using highly passivated PEGMA microarray surfaces

which effectively repel these strong adsorptive molecules, the PNAs can be subsequently detected by a three strand hybridization assay with a sensitivity of 300 amol (see Scheme I). This assay was developed within this thesis.

The system presented was challenged to identify unlabeled from PNA labeled pencils. The labeling was introduced directly by the manufacturer (*Faber-Castell*) and had not been declared. The label could be found out without any doubt by the procedure described.

ZUSAMMENFASSUNG

Fälschungen industrieller Produkte stellen heutzutage ein gravierendes Problem dar. Dies bezieht sich auf ökonomische Aspekte, mitunter aber auch auf solche der Produktsicherheit. Besorgniserregend erscheint, dass sich das Phänomen ständig weiter ausbreitet und dem Umfang sowie der Raffinesse nach kontinuierlich zunimmt. Das weitreichende Spektrum der Fälschungen umfasst so verschiedene Kategorien wie teure, exklusive Konsumartikel (z.B. Textilien, Uhren), technische Produkte (z.B. Ersatzteile, CDs, DVDs) bis hin zu Pharmaka (z.B. Viagra, Antibiotika). Mittlerweile sind jedoch alle industriellen Erzeugnisse, d.h. auch billige Waren mit hohen Verkaufszahlen, von Fälschung betroffen.

Als Gegenmaßnahmen verwenden Hersteller heute Methoden, welche sich an neueren Forschungsergebnissen orientieren und oft einen hohen technischen Standard voraussetzen. Kommerzielle Dienstleister bieten solche Verfahren an. Beispielsweise werden den Produkten geringe Mengen synthetischer oligomerer Desoxynukleotide oder auch Bruchstücke natürlicher doppelsträngiger DNA (*Deoxyribonucleic Acid* - Desoxyribonukleinsäure) beigefügt. Solche Dotierungen sorgen durch ihre systemimmanente Komplexität für hohe Fälschungssicherheit. Im Falle der Markierungen mittels DNA kann man bei der Detektion auf molekularbiologische Methoden zurückgreifen. Die Produktauthentizität lässt sich damit sicher und schnell, inklusive Hochdurchsatzverfahren, bestätigen. Hierbei ermöglicht die PCR (*Polymerase Chain Reaction* – Polymerasekettenreaktion) die Echtheitszertifizierung des Produkts unter Verwendung minimaler Probengrößen sowie geringster Mengen der ursprünglichen Markierung. Zurzeit stellt die Markierung mittels DNA ein besonders sicheres und anwendungserprobtes System zur Wahrung der Produktauthentizität dar.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung eines innovativen Markierungssystems, ähnlich dem für DNA beschriebenen. Insbesondere sollen Wege aufgezeigt werden, wie sich lipophile Medien, z.B. leinöhlhaltige Künstlerfarben, markieren lassen, da spezielle Verfahren für diese Problematik bisher nicht existieren. Es ist darauf zu achten, die Komplexität mit der daraus resultierenden Fälschungssicherheit beizubehalten. Wesentliche Nachteile, wie z.B. chemische Sensibilität der DNA oder ihre Instabilität gegen enzymatische Faktoren, sind jedoch zu vermeiden.

Im Gegensatz zu DNA erfüllen Peptidnukleinsäuren (PNAs – **P**eptide **N**ucleic **A**cids) alle geforderten Kriterien an ein Markierungsmolekül. PNAs sind synthetische, lineare Polymere, die an kurzen Seitenketten die natürlichen Nucleobasen in freiwählbarer Sequenz tragen und somit der DNA strukturell nahe stehen. Diese Eigenschaft bildet die Basis für ein Markierungssystem hoher Komplexität. Insbesondere sind jene Polymere wie DNA zur hochspezifischen Hybridisierung mit einem komplementären Gegenstrang unter Duplexbildung fähig. Die Vorteile gegenüber DNA bestehen darin, dass PNA i. höhere chemische Stabilität aufweist, ii. kein Substrat für Proteasen sowie Nucleasen darstellt, da sie eine xenobiotische Substanz repräsentiert und iii. kein negativ geladenes, sondern ein neutrales Rückgrat besitzt, was eine relativ höhere Lipophilie bedingt. Letzteres wirkt sich positiv auf das angestrebte Einsatzgebiet aus. Als Nachteil eines PNA-Systems ließe sich die Nicht-Amplifizierbarkeit der PNA anführen. Setzt man zur Markierung kurze DNA-Oligomere ein, so lassen sich jene allerdings auch nicht durch PCR vervielfältigen. Aus diesem Aspekt ergibt sich eine Gleichrangigkeit der beiden Markierungssubstanzen. Insgesamt bewertet, bieten PNAs erhebliche Vorteile zur Lösung des gestellten Problems.

Zur Dotierung von Produkten werden synthetische Oligomere eingesetzt. Neben PNA- kommen im Zuge der Entwicklung ebenfalls DNA-Sequenzen zum Einsatz. Die Polymerlänge beträgt etwa 10 bis 25 Einheiten. Diese Größenordnung erlaubt eine ausreichend hohe Anzahl an Permutationen (bei einem 10mer $4^{10} = 1\,048\,576$) und damit Fälschungssicherheit bei minimierten Kosten und synthetischem Aufwand.

Aus den genannten Gründen ergeben sich für die Entwicklung eines PNA-basierten Markierungssystems die folgenden einzelnen Problemstellungen. Zur Erlangung reiner PNA-Sequenzen als Ausgangsmaterial wird eine Methode zur effizienten Aufreinigung der Oligomere benötigt, welche ohne HPLC auskommt. Die PNAs müssen in der Folge in lipophile Medien eingebracht und ebenso effektiv daraus extrahiert werden. Im Anschluss stellt sich das Problem der sensitiven und spezifischen Detektion der verwendeten PNA-Sequenzen sowie das der Adaption des Verfahrens an konkrete Anwendungsparameter. Demzufolge gliedert sich die vorliegende Arbeit in die Abschnitte Aufreinigung, Lipophilisierung, Einbringung in lipophile Medien sowie Extraktion aus diesen, Detektion und industrielle Anwendung des Verfahrens.

Ein zentrales Problem ist die Bereitstellung reiner PNAs zur Dotierung. Dies ermöglicht die eindeutige Beurteilung experimenteller Ergebnisse und demzufolge eine beschleunigte Methodenentwicklung. Die herkömmliche Methode zur Gewinnung molekular einheitlicher PNAs ist die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*), die aber nur geringen Probendurchsatz gestattet. Demzufolge ist zu klären, welches nicht-chromatographische Hochdurchsatzverfahren zur Reinigung angewendet werden kann. Als innovative, alternative Möglichkeit, PNAs rein darzustellen, wurde eine auf Derivatisierung basierende Aufreinigung bearbeitet. Ein besonderes Merkmal des Verfahrens besteht in der mehrfachen Verwendung von Festphasenreaktionen, was die praktische Durchführung erheblich erleichtert. Die wichtigste Reaktion stellt die inverse *Diels-Alder*-Zyklisierung zwischen einer tetrazinfunktionalisierten Festphase (Dien) sowie einer PNA-tragenden Dimedonkomponente (Dienophil) dar. Ein großer Vorteil liegt in der vollständigen Abspaltbarkeit der benötigten Linker von den jeweiligen Oligomeren. Aus Kostengründen erfolgt die Methodenentwicklung mit Peptiden anstelle von PNA-Gemischen, da beide im Konzept des Aufreinigungssystems analoge, primäre Amine darstellen und in für die Problematik wichtigen Eigenschaften weitgehend übereinstimmen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es unter Anwendung dieser Reaktion erstmals, Peptide ohne chromatographische Verfahren aufzureinigen. Die Methodik sollte sich auf PNAs übertragen lassen.

Eingangs muss das Problem der Löslichkeit der Markierungssubstanzen in den entsprechenden lipophilen Medien bewältigt werden. Ein Teil der Arbeit befasst sich aufgrund dessen mit der Lipophilisierung von Markierungsoligomeren. Zur Methodenentwicklung kommt zunächst doppelsträngige, wohlfeile Lachs-DNA (ca. 300 Basenpaare) zum Einsatz. Die negativen Ladungen der DNA werden durch Komplexierung mittels geeigneter Kationen neutralisiert. Nach verschiedenen experimentellen Ansätzen kann dies mit dem quartären Ammoniumsalz Dihexadecyldimethylammoniumbromid erreicht werden. Auf eine solche Weise komplexierte DNA lässt sich in Chloroform lösen. Die erfolgreiche Übertragung des Verfahrens auf synthetische, doppelsträngige DNA-Oligomere ist möglich, nicht jedoch auf analoge, einsträngige Sequenzen. Eine Ursache hierfür stellt die ungenügende Komplexierung des Oligonukleotids aufgrund der geringeren negativen Gesamtladung dar. Bei den eigentlich als Markierungssequenzen vorgesehenen PNAs soll ebenfalls eine

Lipophilisierung durch Modifikation mit Phenylalaninresten an jedem Ende erreicht werden. Andererseits erscheinen PNAs lipophil genug, um direkt als solche zum Einsatz zu kommen.

Die derart vorbereiteten Oligomere werden nun in lipophile Medien eingebracht, wofür stellvertretend Nujol, Sonnenblumen- sowie Dieselöl Verwendung finden. Ersteres erleichtert das experimentelle Vorgehen durch seine Einfachheit im chemischen Sinne, seine Stabilität sowie seine Durchlässigkeit für UV-Licht. Damit ist die Anwesenheit von DNAs oder PNAs in einer Probe via UV-Photometer feststellbar. Sonnenblumen- und Dieselöl stellen Medien aus dem täglichen Leben dar. In die drei erwähnten Öle werden die lipophilisierte Lachs-DNA sowie das doppelsträngige DNA-Oligomer als Chloroformlösung eingebracht. Dies gelingt problemlos in homogener Verteilung. Entsprechende Versuche mit PNA oder phenylalaninderivatisierten PNAs verlaufen analog, wobei letztere keinen Vorteil gegenüber der unmodifizierten Variante erkennen lassen.

Im nächsten Schritt muss die Isolierung der Dotierungen aus den lipophilen Flüssigkeiten erfolgen. Hierzu finden zunächst geeignete Festphasen in Form kommerziell erhältlicher Kartuschen Anwendung, da diese eine gängige und wirksame Methode der Probenvorbereitung darstellen. Das gewünschte Ziel ist damit jedoch in keinem Fall zu erreichen. Als Alternative wird eine Extraktion mit Wasser, bei der stickstoffbasenhaltigen PNA auch mit Säure, erfolgreich durchgeführt. Beispielsweise gelingt aus Leinöl, einem Hauptbestandteil von Ölfarben, die Rückgewinnung von 66 % der zur Dotierung eingesetzten PNA.

Nach Isolierung der Markierungssubstanzen müssen diese in einem geeigneten Test nachgewiesen werden. Dies geschieht mittels Hybridisierung auf *Microarrays* (dt.: Biochips). Zum Nachweis sind zunächst *Molecular Beacons* (dt.: molekulare Leuchtfener) als Sonden vorgesehen. Unter letzteren versteht man Oligonukleotide mit einer Stamm-Schleifen-Struktur, die an einem Ende einen Fluoreszenzfarbstoff, am anderen ein Löschmolekül tragen, welche in geschlossener Form die Lichtemission des Fluorophors mittels elektronischer Wechselwirkungen unterdrücken. Ein geeignetes komplementäres Oligomer hybridisiert und öffnet den Stamm, was durch Zunahme der Fluoreszenzintensität angezeigt wird. Der verwendete *Molecular Beacon* wird in seinen Eigenschaften, u.a. der Spezifität, näher charakterisiert. In der Anwendung erweist sich die Detektionsmethode als nicht zufriedenstellend, da der

Fluoreszenzanstieg beim Nachweis von DNA-Sequenzen höchstens den Faktor neun, bei dem von PNA-Basenabfolgen lediglich einen sechsfachen Anstieg erreicht. Des Weiteren ist eine spezifische Detektion der aus den lipophilen Medien extrahierten Oligomere außer bei Nujol nicht möglich, da in den Extrakten Begleitstoffe vorhanden sind, welche ihrerseits zu einer Fluoreszenzintensitätszunahme führen. Auch Experimente in Lösung können dieses Ergebnis nicht verbessern.

Zur Lösung der Problematik kommen in der Folge oberflächengebundene DNA- oder PNA-Oligomere zum Einsatz, die intensive Waschprozesse und somit des Entfernen störender Begleitstoffe erlauben. Zunächst untersucht man ein Zweistrangsystem, d.h. an ein kovalent an die Oberfläche angebundenes Oligomer hybridisiert eine fluoreszenzfarbstoffmarkierte Gegensequenz (DNA oder PNA). Bei DNA-Proben ist das Nachweissystem erfolgreich, wohingegen bei PNAs starke Hintergrundsignale resultieren. Dies geht auf unspezifisch adsorbierte PNA-Moleküle auf der Oberfläche zurück. Um das Problem zu beheben, werden verschieden deaktivierte Oberflächen evaluiert. Trotz der unterschiedlichen Eigenschaften kann bei keiner Deaktivierungsart ein positives Resultat mit niedrigem Hintergrund registriert werden. Erheblich bessere Ergebnisse lassen sich mit PEGMA-Oberflächen (**P**oly**e**thylenglykol**m**ethacrylat) erzielen. Die praktische Anwendung des Systems ist teuer, da fluoreszente Markierungsmoleküle eingesetzt werden müssen. Eine signifikante Kostenreduktion wird in einem Dreistrangsystem auf PEGMA-Oberflächen erreicht, deren schematische Funktionsweise Abbildung I erläutert. Auf der Chipoberfläche sind PNA-Sequenzen an definierten Positionen kovalent angebunden. Die gesuchte Sequenz ist komplementär zu derjenigen auf dem *Microarray*, trägt aber an einem Ende eine PolyT-Sequenz. Nach Hybridisierung der komplementären Abschnitte lässt sich der überstehende PolyT- über einen fluoreszenzmarkierten PolyA-Strang ebenfalls hybridisieren und detektieren.

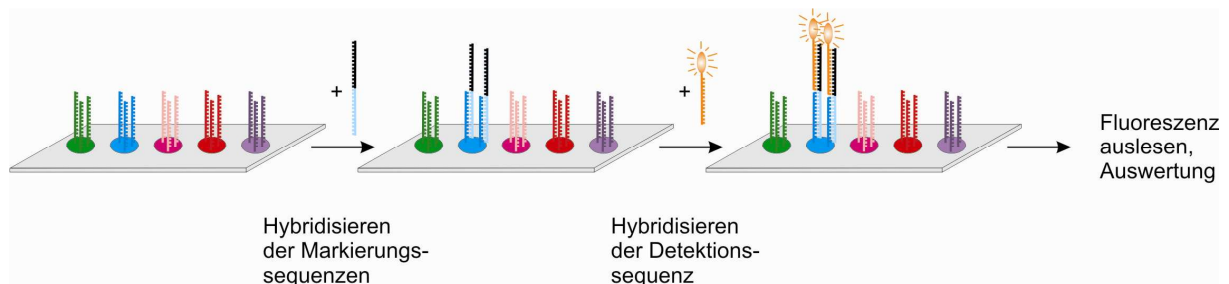


Abbildung I: Funktionsweise der Dreistranghybridisierung.

Damit ist zusätzlich eine vorzeitige Zerstörung, während seiner mitunter langen Verweildauer im Produkt, ausgeschlossen. Mit diesem System kann eine Nachweisgrenze von 300 amol PNA erreicht werden. Die Dreistranghybridisierung ist somit dahingehend optimiert, in kommerziellen Anwendungen als kostengünstiges, effizientes und sicheres Markierungssystem Verwendung zu finden.

Die Anwendung des vorgestellten PNA-basierten Echtheitsnachweises sollte in einem industriellen Produkt, möglichst aus dem Bereich Künstlermaterialien, erfolgen. Hierfür konnte das Unternehmen *Faber-Castell* gewonnen werden, welches die PNA-Markierung in den Kappenlack von Grip 2001-Bleistiften einbrachte, ohne die dotierten Bleistifte zu kennzeichnen. Mit dem zuletzt beschriebenen Detektionssystem gelang die zweifelsfreie Unterscheidung der markierten von den unmarkierten Stiften. Damit hat sich das im Rahmen dieser Arbeit etablierte System in einem ersten Test bewährt und seine Tauglichkeit für den industriellen Einsatz eindeutig unter Beweis gestellt.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2	THEORIE	8
2.1	Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie	8
2.1.1	Lichtabsorption	8
2.1.2	Lichtemission	10
2.1.3	Lebensdauer und Quantenausbeute der Fluoreszenz	13
2.1.4	Fluoreszenzlöschung	15
2.1.5	Fluoreszenzlöschung durch <i>Quencher</i>	15
2.1.6	Fluoreszenzlöschung durch Guanin	17
2.2	Nukleinsäuren	18
2.2.1	Eigenschaften und Struktur der DNA	18
2.2.2	Denaturierung und Renaturierung der DNA	21
2.2.3	Eigenschaften und Struktur der PNA	22
2.2.4	<i>Molecular Beacons</i>	26
2.3	Biochips	28
2.4	Diels-Alder-Reaktion	30
2.4.1	Grundlagen	30
2.4.2	Inverse Diels-Alder-Reaktion	35

3	MATERIALIEN UND METHODEN	39
3.1	Chemikalien	39
3.1.1	Puffer	41
3.2	Materialien	42
3.3	Oligonukleotide	43
3.3.1	Eingesetzte DNA-Oligomere	43
3.3.2	PNA-Synthese	44
3.3.3	Verwendete PNA-Oligomere	44
3.4	Geräte	46
3.4.1	<i>Thermocycler</i>	46
3.4.2	UV/Vis-Spektrophotometer	46
3.4.3	<i>NanoDrop</i>	47
3.4.4	Aufreinigung lipophilisierter DNA	48
3.4.5	<i>Typhoon</i>	48
3.4.6	MALDI-Massenspektroskopie	49
3.5	Derivatisierung von Oberflächen	49
3.5.1	Silanisierung von Glasoberflächen	49
3.5.2	Aktivierung von Oberflächen mittels Di-(N,N'-succinimidyl)-carbonat (DSC)	50
3.6	Auftragen der DNA- oder PNA-Oligomere (<i>Spotting</i>) auf silanisierte Objektträger	51

3.7	Auftragen (<i>Spotting</i>) der PNA-Oligomere auf PEGMA-Oberflächen	54
3.8	Hybridisierung der <i>Microarrays</i> mit komplementären Sequenzen	56
3.9	<i>Microarray</i>-Scanner	57
3.10	Software	59
3.10.1	<i>mFold</i>	59
3.10.2	MALDI-Software	60
3.10.3	<i>GenePix</i>	60
4	EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE	61
4.1	Gewinnung reiner Oligomere durch Anwendung inverser <i>Diels-Alder</i>-Reaktionen	62
4.1.1	Schematischer Ablauf	62
4.1.2	Tetrazinfunktionalisierte Festphasen	64
4.1.3	Herstellung der Dimedonkomponente	65
4.1.4	Umsetzung der beiden Tetrazinkomponenten mit dem Dimedonderivat	68
4.2	Lipophilisierung von DNA und PNA zum Zweck der Einbringung in lipophile Flüssigkeiten sowie Rückgewinnung durch Extraktion	70
4.2.1	Lipophilisierung von Lachs-dsDNA-Bruchstücken sowie ss- bzw. dsDNA-Oligomeren	70
4.2.2	Lipophilisierung von PNA	72

4.2.3	Einbringung in lipophile Medien	73
4.2.4	Extraktion und Anreicherung aus lipophilen Flüssigkeiten	75
4.3	Detektion extrahierter Oligomere mit <i>Molecular Beacons</i>	79
4.3.1	Aufbau des Nachweissystems	79
4.3.2	Detektion mittels <i>Microarray</i> -Scanner	82
4.3.2.1	Charakterisierung des <i>Molecular Beacon</i>	82
4.3.2.2	Etablierung der Hybridisierungsbedingungen	85
4.3.2.3	Zeitabhängige Entwicklung des Fluoreszenzsignals	86
4.3.2.4	Konzentrationsabhängigkeit des Fluoreszenzsignals	87
4.3.2.5	Nachweis der extrahierten Oligonukleotide	88
4.3.3	Detektion des Fluoreszenzsignals in Lösung	91
4.4	Nachweis mittels oberflächengebundener DNA- und PNA-Oligomeren	92
4.4.1	Zweistrangsystem	92
4.4.2	PNA-Hybridisierung auf verschieden deaktivierten Oberflächentypen	95
4.4.3	Dreistrangsystem auf PEGMA-Oberflächen	99
4.5	Industrielle Anwendung des Systems in Kooperation mit dem Unternehmen <i>Faber-Castell</i>	103
4.5.1	Anwendungsgebiet und Zielsetzung	103

4.5.2	Aufbereitung der Proben	105
4.5.3	Nachweis der Markierung	105
5	DISKUSSION UND AUSBLICK	107
6	LITERATUR	113

1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Fälschungen stellen heutzutage ein erhebliches Problem für die Produzenten verschiedenster Güter dar. Das breitgefächerte Spektrum reicht von Textilien über Pharmaka bis hin zu hochwertigen Lebensmitteln, wie teurem Wein oder Olivenöl [International Anit Counterfeiting Coalition 2010; WHO 2010a]. In erster Linie betrifft der Schaden monetäre Aspekte (s. Abbildung 1-1), doch kommen beispielsweise bei Fälschungen pharmazeutischer Produkte potentiell erhebliche gesundheitliche Risiken für den Verbraucher hinzu [Group 2008]. Letztere gehen darauf zurück, dass solche Produkte auf Gewinnmaximierung für die Fälscher abzielen, was u.a. den Einsatz minderwertiger Rohstoffe oder auch nicht GMP (*Good Manufacturing Practice* [WHO 2007] – gute Herstellungspraxis)–konformer Praktiken der Herstellung und der Qualitätssicherung fördert [Newton 2010]. All dies kann neben massiven Qualitäts- und Haltbarkeitsmängeln auch Schadensersatzforderungen gegen einen betroffenen Rechteinhaber zur Folge haben.

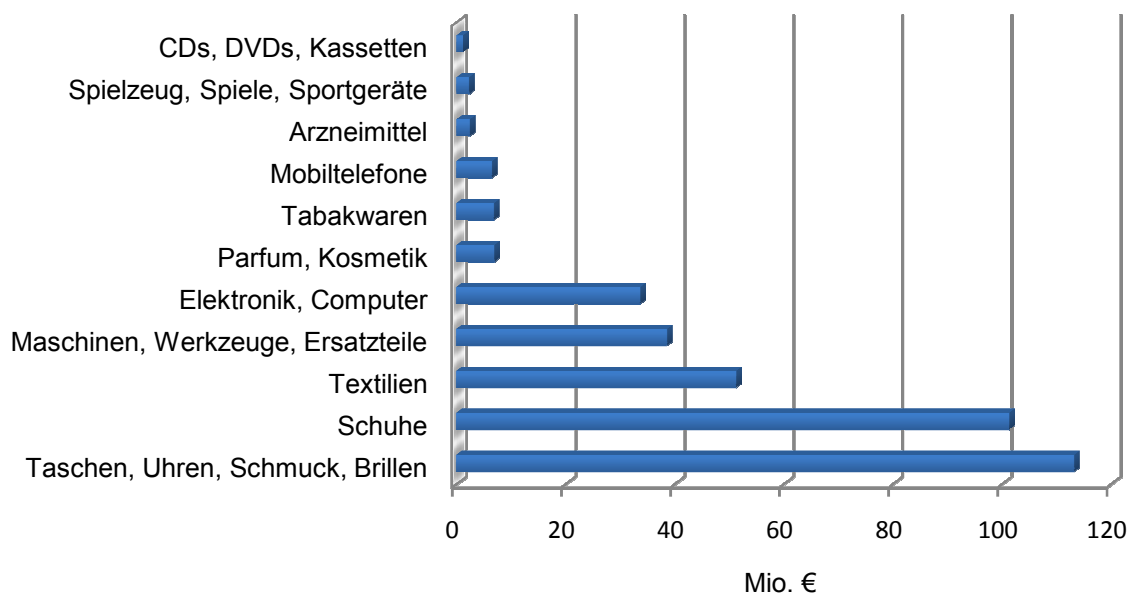


Abbildung 1-1: Wertmäßige Aufstellung der vom deutschen Zoll aufgegriffenen, gefälschten Waren im Jahr 2009 [Bundeszollverwaltung 2010].

Bereits seit der gallorömischen Epoche kam es zu Nachahmungen und Produktpiraterie. Der Begriff bezeichnet die Herstellung von Gütern, welche der Originalware zum Verwechseln ähnlich sehen und einen Käufer absichtlich täuschen

sollen. Damals brachten z.B. Töpfer die Siegel ihrer Hauptkonkurrenten auf den Hälsen der eigenen Amphoren an. Im Laufe der Zeit erfuhren diese Methoden eine kontinuierliche Weiterentwicklung. Heute erstrecken sich die Fälschungen auf unzählige Bereiche des Welthandels [Europäische Kommission 2010].

Laut einer Studie der OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development* – Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung) aus dem Jahr 2005 ist das Volumen des weltweiten Handels mit gefälschten Produkten auf schätzungsweise 200 Milliarden US-Dollar zu beziffern, wobei die Volksrepublik China bei der Herstellung von Kopien den Spitzenplatz einnimmt (s. Abbildung 1-2) [Yang 2009; Bundesministerium der Justiz 2010]. Diese Summe enthält weder die im Inland hergestellten und konsumierten Fälschungen noch die beträchtliche Anzahl an raubkopierten, digitalen, über das Internet vertriebenen Produkten. Bei einer Hinzurechnung letzterer würde das Gesamtvolumen der Produkt- und Markenpiraterie weltweit um mehrere Hundert Milliarden US-Dollar ansteigen [OECD 2008].

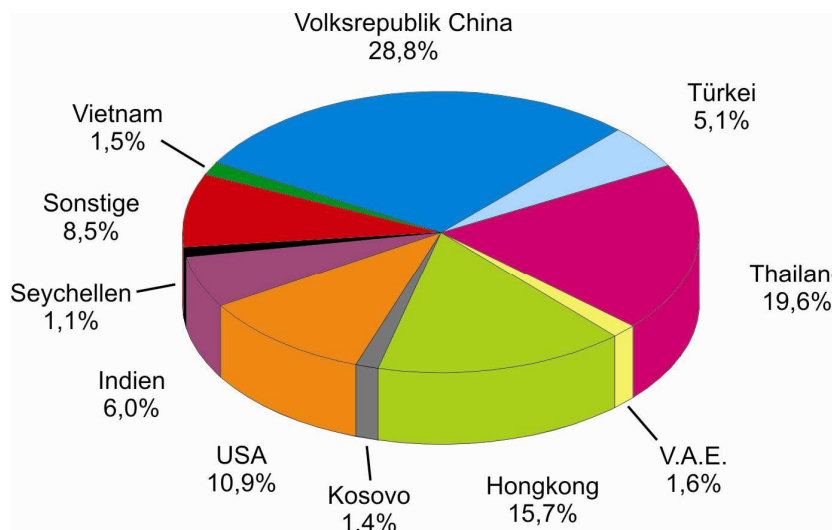


Abbildung 1-2: Prozentuale Aufteilung der Anzahl von Aufgriffen gefälschter Waren durch den deutschen Zoll im Jahr 2009 nach Herkunftsländern [Bundesministerium der Finanzen 2010].

Ein recht junges, aber sehr dynamisch wachsendes Tätigkeitsfeld der Produktpiraten stellen gefälschte Medikamente dar (s. Abbildung 1-3). Potentielle Auswirkungen für den Patienten beinhalten die ganze Bandbreite von Nicht-Wirksamkeit über erhebliche Gesundheitsschäden bis hin zum Tod [Pinel 1997; Kelesidis 2007]. So sind beispielsweise mit Leitungswasser hergestellte Meningitisimpfstoffe, aus

industriellen Lösungsmitteln bestehender Paracetamolsirup, Anti-Baby-Pillen aus Mehl oder auch Antibiotika ohne aktiven Inhaltsstoff auf dem Markt zu finden [Newton 2002; Deisingh 2005].

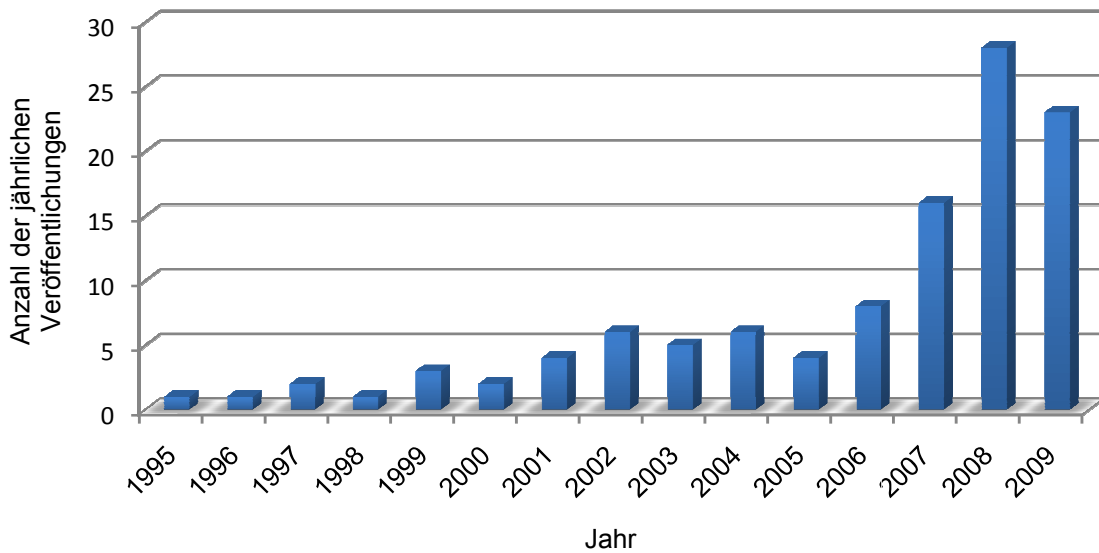


Abbildung 1-3: Entwicklung der Anzahl der Veröffentlichungen auf dem Gebiet gefälschter Medikamente von 1995 bis 2009.

Abbildung 1-4 zeigt die von der WHO aufgelisteten, hauptsächlich anzutreffenden Fälschungstypen von Medikamenten. Bezeichnenderweise entfällt nur ein Prozent auf die Kopie von Originalen, was für den Verbraucher die harmloseste Variante ist.

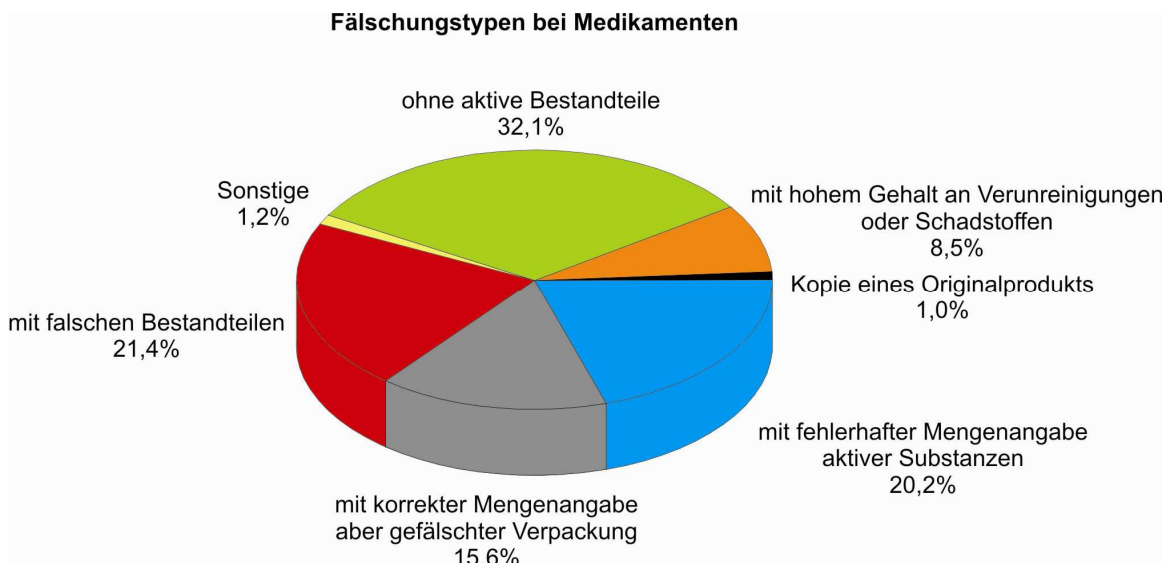


Abbildung 1-4: Fälschungstypen bei Medikamenten [WHO 2010b].

Um den geschilderten Problemen zu entgehen, entwickelt ein darauf spezialisierter Forschungsbereich unterschiedlichste Technologien zur Markierung von Produkten mit dem Ziel der Authentizitätssicherung [Fernandez 2008; Seiter 2009]. Es hat sich mittlerweile sogar ein eigener, kommerzieller Dienstleistungssektor zur Produktsicherung gegen Fälschung etabliert, welcher verschiedene, im Detail geheimgehaltene Markierungsmethoden anbietet [Kaura 2006; International Anti Counterfeiting Coalition 2010]. Die Markierung muss in höchstem Maße fälschungssicher, d.h. vor allen Dingen schwer kopierbar sein. Ein solches Prinzip wird z.B. mit mäßigem Erfolg bei Geldscheinen angewandt. Vorteilhafter wäre jedoch eine Produktmarkierung, welche von dem Fälscher – anders als bei Geldscheinen – nicht erkannt und aufgrund ihrer Komplexität auch nicht durch „*trial and error*“ (dt.: systematisches Ausprobieren) herausgefunden werden kann. Des Weiteren sollte sie günstig und einfach handhabbar sein, um das Produkt – auch in höheren Stückzahlen – nicht übermäßig zu verteuern.

Ein Verfahren, welches die genannten Kriterien erfüllt, stellt die Markierung von Produkten mittels DNA (*Deoxyribonucleic acid* - Desoxyribonukleinsäure) dar. Letztere, aus beliebigen, natürlichen Organismen isoliert, überzeugt nicht nur durch ihren Preis, sondern auch durch die leichte Zugänglichkeit. Ihre komplexe Struktur erfüllt viele Anforderungen, die man an eine Markierungssubstanz stellt. Die Variationsbreite der DNA rührt daher, dass jede 2'-Desoxyribose des polymeren Zucker-Phosphat-Rückgrats eine der vier folgenden Basen trägt: die Pyrimidin-derivate Cytosin (C) bzw. Thymin (T) oder die Purinderivate Adenin (A) bzw. Guanin (G) [Nelson 2008]. DNA besteht aus einem 2'-Desoxyribose-Phosphat-Polymer, von dem ein spezifisches Muster der vier „Nukleobasen“ CTAG abzweigt. Die potentielle Vielfalt einer solchen Basensequenz bedingt die Komplexität der DNA. Mit einem DNA-Oligomer von nur zehn 2'-Desoxyribose-Phosphat-Einheiten (einem „10mer“) lassen sich bereits 4^{10} (ca. 10^6) Permutationen, d.h. verschiedene Basenabfolgen, realisieren.

Für die Zwecke von Produktmarkierungen reichen billige Bruchstücke (z.B. 100 – 300 Basenpaare) natürlicher DNA aus. Jene weisen eine ganz bestimmte Sequenz auf, da sie aus einem beliebigen, aber speziellen Organismus gewonnen wurden. Bei der geschilderten Vielfalt von möglichen DNA-Sequenzen ergibt sich eine hohe Fälschungssicherheit, auch dann, wenn statt natürlicher längerer, doppelsträngiger

DNA-Bruchstücke synthetische, kurze, einzelsträngige Oligodesoxynukleotide (z.B. 10- bis 12mere) als Markierungsmoleküle zum Einsatz kommen.

Außerdem sei angemerkt, dass der Produktfälscher die Sequenz kennen und sie zufügen, anstatt vernichten muss, woraus ein Teil der Fälschungssicherheit resultiert.

Daneben ist die Basensequenz nur demjenigen bekannt, der die unsichtbare Kennzeichnung durchgeführt hat. Bei der Produktmarkierung mit DNA sollte man die prinzipiell vorhandene chemische Sensibilität der DNA berücksichtigen. Die Methodik für eine stabile und somit haltbare DNA-Markierung wird in den Produktinformationen verschiedener Anbieter der „*Anti-Counterfeiting*“-Branche angedeutet, aus nahe- liegenden Gründen jedoch nicht detailliert offenbart.

Die geschilderte Markierung zur Kennzeichnung industrieller Produkte durch DNA lässt sich auch auf andere Zielrichtungen, beispielsweise ökologische Probleme, erweitern. Hier steht nicht die Fälschung eines Produkts im Mittelpunkt, sondern dessen zweifelsfreie Identifizierung, z.B. bei illegalen Rohölkontaminationen des Meeres durch unbekannte Verursacher. In diesem Fall müsste die Rohölladung im Voraus markiert werden, um den Umweltsünder zu enttarnen.

Eine vielleicht nicht vermutete Anwendung der Produktmarkierung mittels Nukleinsäuren lässt sich auf einem gänzlich anderen Sektor erkennen: in der Kunstmalerei spielen, wegen potentiell exorbitant hoher Preise, Fälschungen und auch Zuweisungen eines Werkes eine erhebliche Rolle. Albrecht Dürers Gemälde „Selbstbildnis im Pelzrock“ auf Lindenholz aus dem Jahre 1500 zeigt, dass selbst Siegel und Stempel die Echtheit eines Werkes nicht garantieren können (s. Abbildung 1-5): der Nürnberger Rat vertraute 1799 dem Maler Wolfgang Kufner Dürers Selbstbildnis zum Kopieren an. Dieser zersägte die Lindenholzplatte parallel zur Bildebene in zwei Teile. Den vorderen Teil mit dem Original behielt er für sich. Den rückwärtigen Teil, welcher Siegel und Stempel trug, bemalte er mit seiner Kopie des Originals und gab sie dem Rat als Original zurück. Zur Entlarvung der Fälschung kam es erst 1805, als Kufner das Originalbild an den Kurfürsten Maximilian Joseph von Bayern verkaufte [www1].



Abbildung 1-5: links: Albrecht Dürer (1471-1528), Selbstbildnis im Pelzrock, 1500, Alte Pinakothek München; rechts: Wolfgang Kufner (1760-1817), Schwarz-Weiß-Ausschnitt der Fälschung, Albrecht-Dürer-Haus Nürnberg [www2].

Nach dem dargelegten Sachverhalt ist es Ziel der vorliegenden Arbeit, die Markierung lipophiler Flüssigkeiten durch Nukleinsäureoligomere oder deren Analoga, z.B. PNAs, zu etablieren.

Wie am Beispiel des lipophilen Rohöls und der Künstlerfarben zu vermuten, wäre es in vielen Fällen vorteilhaft, bei Markierungen mit DNA nicht diese selbst, sondern deren lipophilisierte Formen einzusetzen, um eine homogene und damit effektivere Markierung zu erreichen. Gleiches gilt für die Markierung anderer lipophiler Flüssigkeiten wie Nahrungs-/Genussmittel, Pharmazeutika oder technische Öle.

Zur Herstellung lipophilisierter DNA sollen, neben natürlicher doppelsträngiger DNA, auch ein- sowie doppelsträngige Oligomere zum Einsatz kommen, um die Verfahren unter definierten Bedingungen zu entwickeln. Gleichzeitig soll die Markierung mittels DNA-analogen Peptidnukleinsäuren (PNAs) untersucht werden. Letzteres sind kurze synthetische Oligomere, die gegenüber DNAs mit identischer Sequenz potentielle Vorteile aufweisen. Bei analogen PNAs kann man aufgrund ihrer von Natur aus niedrigeren Polarität auf eine Lipophilisierung möglicherweise verzichten. Außerdem böte die Verwendung von PNAs den Vorteil einer nicht biologisch abbaubaren Markierung sowie einer höheren chemischen Stabilität.

Im nächsten Schritt erfolgt die Einbringung lipophilisierter Nukleinsäuren bzw. deren Analoga in geeignete Lösungsmittel, die sich in geringer Konzentration homogen in lipophilen Medien verteilen lassen. Beispielhaft werden Nujol, Sonnenblumen- sowie Dieselöl dotiert.

Der darauffolgende Teil dieser Arbeit beschäftigt sich folglich mit der Entwicklung einfacher Methoden zur Anreicherung der Dotierung aus den jeweiligen lipophilen Umgebungen. Hierbei ist eine möglichst vollständige Rückgewinnung der eingebrachten Dotierung anzustreben, um die benötigte Substanzmenge gering zu halten.

Entsprechend muss die verwendete Detektionstechnologie hochempfindlich sein, was oberflächenbasierte Fluoreszenzdetektionsmethoden gewährleisten. Der Nachweis der angereicherten DNA- bzw. PNA-Markierung kann über Hybridisierung erfolgen, wobei als Sonden sowohl lineare Sequenzen als auch *Molecular Beacons* evaluiert werden.

Könnte man Künstlerfarben oder andere künstlerische Materialien sicher markieren, so wäre die Authentizität eines Kunstwerkes leicht zu verifizieren. Dieser neue Aspekt wird daher in der vorliegenden Arbeit als Anwendungsbeispiel einer Produktmarkierung mittels Nukleinsäuren experimentell untersucht.

2 THEORIE

2.1 Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie

2.1.1 Lichtabsorption

Im Gegensatz zu den Schwingungs- und Rotationsfreiheitsgraden, welche bei der Absorption von Photonen im Infrarotbereich angeregt werden, erzeugt die Lichtabsorption im ultravioletten und sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums bei den absorbierenden Molekülen zusätzlich elektronische Übergänge. Aufgrund der geringen Anregungsenergie sind die höheren Rotationsniveaus bereits bei Raumtemperatur von Molekülen bevölkert. Unter Standardbedingungen liegen letztere im Schwingungsgrundzustand vor, da eine Besetzung angeregter Schwingungszustände erst bei höheren Temperaturen eintritt.

Bedingt durch die großen Energieunterschiede der elektronischen Niveaus im Bereich zwischen 1,5 bis 3 Elektronenvolt kommt es auch bei höheren Temperaturen nur zu einer Bevölkung des elektronischen Grundzustands S_0 (*Boltzmann-Verteilung*). Die Anhebung eines Elektrons aus dem HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital* – höchstes besetztes Molekülorbital) in das LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital* – niedrigstes unbesetztes Molekülorbital) eines Fluorophors resultiert in einem elektronisch energiereicheren Zustand, beispielsweise dem ersten angeregten Zustand S_1 . Ein solcher Übergang verläuft nach dem *Franck-Condon-Prinzip*, welches besagt, dass die Elektronenübergänge derart erfolgen, dass die Atomkerne in diesem Zeitintervall unbewegt bleiben. Somit verbleibt ihnen keine Zeit, um auf die veränderten elektronischen Gegebenheiten zu reagieren, da ihre Bewegungen aufgrund ihrer großen Masse viel langsamer als die der Elektronen sind. Absorptionszeiten und elektronische Übergänge liegen im Bereich von Femtosekunden (10^{-15} s), wohingegen Kernschwingungen in der Größenordnung von Picosekunden (10^{-12} s) anzusiedeln sind. Demnach stellt das Prinzip keine allzu große Näherung dar. Aus dem *Franck-Condon-Prinzip* ergibt sich im Potentialdiagramm ein vertikaler Übergang, welcher aus dem Zustand der größten Wahrscheinlichkeitsdichte Ψ^2 erfolgt. Im Zustand S_1 ist jedoch im Normalfall der Gleichgewichtsabstand r_{g1} zu größeren Werten hin verschoben, woraus nach elektronischer Anregung ein schwingungsangeregter Zustand resultiert (Abbildung 2-1).

Folgende Bedingungen sind Voraussetzung für das Auftreten eines derartigen Übergangs:

1. Erfüllung der *Bohr'schen* Frequenzbedingung $\Delta E = h \cdot \nu$, d.h. es sind lediglich Übergänge mit der Energie eines Vielfachen des *Planck'schen* Wirkungsquantums ($h = 6,626 \cdot 10^{-34}$ Js) erlaubt.
2. Das entsprechende Übergangsdipolmoment $M_{EA} = \langle \Psi_E | \hat{\mu} | \Psi_A \rangle$ mit Ψ_A und Ψ_E als Wellenfunktionen und $\hat{\mu}$ als Dipolmomentoperator des Systems, muss eine Projektion auf den elektrischen Feldstärkevektor des Anregungslichts besitzen.
3. Das Übergangsdipolmoment darf nicht Null sein: $M_{EA} = \langle \Psi_E | \hat{\mu} | \Psi_A \rangle \neq 0$.

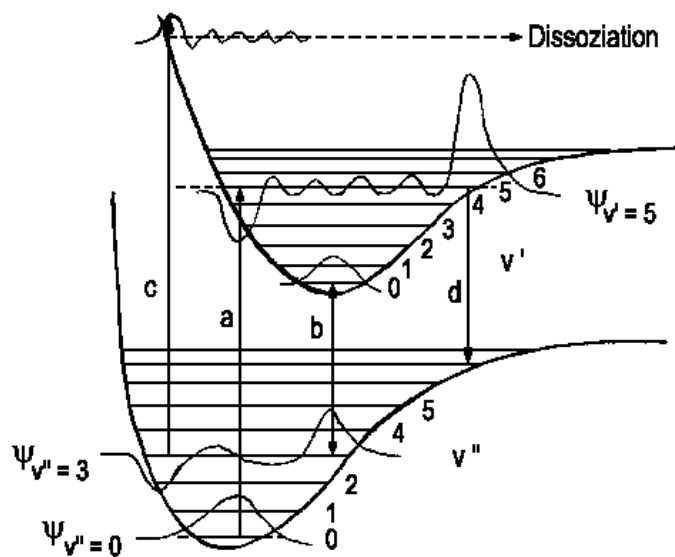


Abbildung 2-1: Potentialkurven des Grund- und des ersten angeregten Zustands eines zweiatomigen Moleküls mit Schwingungsniveaus und den Wellenfunktionen Ψ nach Boltzmann [www3].

Der dekadische, molare Extinktionskoeffizient $\varepsilon(\lambda)$ stellt ein Maß für die Lichtabsorption der Wellenlänge λ in $l^*(\text{cm} \cdot \text{mol})^{-1}$ dar, wobei $\varepsilon(\lambda)$ neben der Temperatur auch von der Art des Lösungsmittels abhängig und über das *Lambert-Beer'sche* Gesetz (Gleichung 2.1) zu bestimmen ist:

$$A(\lambda) = \log_{10} \frac{I_0}{I(\lambda)} = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d \quad \text{Gleichung 2.1}$$

Die Absorption $A(\lambda)$ entspricht dem Logarithmus des Verhältnisses von Referenz I_0 zur Messstrahlintensität $I(\lambda)$. Die Variablen c und d stehen für die Konzentration in mol/l bzw. die Schichtdicke in cm.

2.1.2 Lichtemission

Mithilfe des sogenannten *Jablonski-Diagramms* (s. Abbildung 2-2) lassen sich die nach der Absorption eines Lichtquants ablaufenden Vorgänge abbilden [Jablonski 1935].

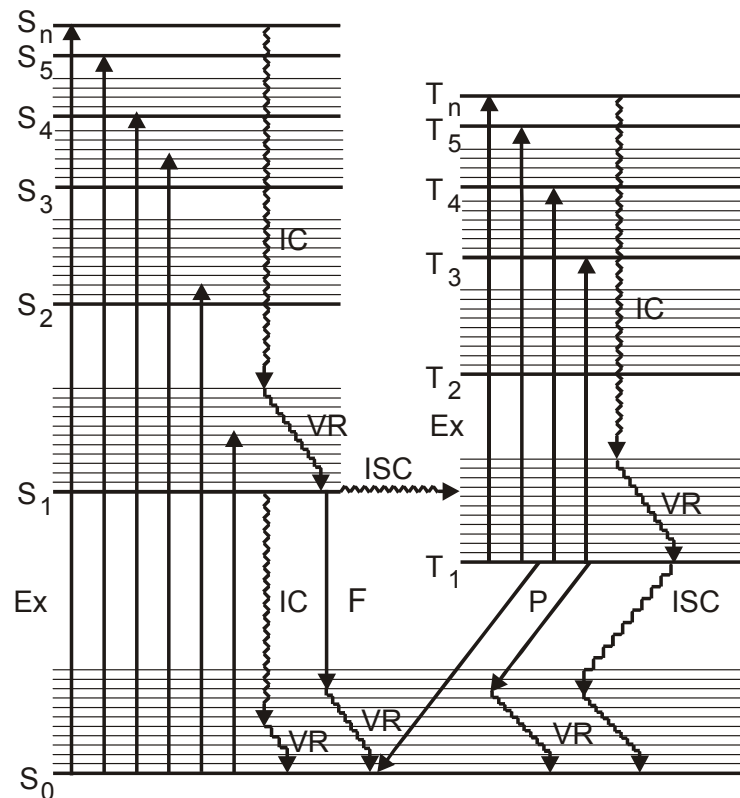


Abbildung 2-2: *Jablonski-Diagramm* (ohne Berücksichtigung der Rotationsenergieniveaus), IC: *Internal Conversion* (strahlungslose Desaktivierung), Ex: *Excitation* (Anregung), ISC: *Intersystem Crossing* (Übergang mit verbotener Spinumkehr), VR: *Vibrational Relaxation* (Schwingungsrelaxation), S_x : Singulettzustände, T_x : Triplettzustände, F: Fluoreszenz, P: Phosphoreszenz.

Nach der in Femtosekunden erfolgenden Anregung ($k_{\text{ex}} \approx 10^{15} \text{ s}^{-1}$) befindet sich das Molekül im ersten oder in einem höher angeregten Rotations-Schwingungs-Niveau eines Singulettzustandes (S_n mit $n \geq 1$).

Die Elektronenanregung wird stets sowohl von vibratorischer ΔE_{vib} - als auch rotatorischer ΔE_{rot} -Anregung begleitet, wodurch meist nur noch eine breite, aus vielen Übergängen zusammengesetzte Absorptionsbande sichtbar ist. Die Energieabgabe (Emission) kann nach unterschiedlichen Mechanismen ablaufen. Wurden die Farbstoffmoleküle in höhere Zustände als S_1 bzw. in höhere Schwingungsniveaus angeregt, relaxieren diese zunächst in Picosekunden (10^{-12} s) in die *Boltzmann*-Verteilung des S_1 -Zustandes unter Wärmeabgabe durch Stöße mit anderen Molekülen (*Internal Conversion*).

Danach stehen aus S_1 verschiedene Deaktivierungsvarianten zur Energieabgabe zur Verfügung. Ein weiterer strahlungsloser Übergang (IC) ist denkbar, welcher sich jedoch aufgrund der höheren Energiedifferenz nicht so schnell wie die vorangegangenen aus höheren Zuständen vollzieht, da die Übergangswahrscheinlichkeit proportional zu ΔE ist. Alternativ kann das Molekül in den Triplettzustand T_1 übergehen (*Intersystem Crossing*). Thermodynamisch ist ein solcher Übergang wegen der energetisch tieferen Ansiedlung des T_1 -, verglichen mit dem S_1 -Zustand, immer möglich. Abgesehen von einigen Ausnahmen kommt er jedoch aufgrund des quantenmechanischen Verbots, verursacht durch die unterschiedlichen Spinmultiplizitäten, relativ selten vor. Generell erleichtert eine starke Spin-Bahn-Kopplung einen Übergang zwischen Zuständen verschiedener Spinmultiplizität. Der anschließende T_1 - S_0 -Übergang zur weiteren Deaktivierung ist ebenfalls spinverboten, er kann entweder strahlungslos oder unter Lichtemission (Phosphoreszenz) ablaufen. Das Spinverbot resultiert in einer meist sehr langen Lebenszeit des T_1 -Zustandes (10^{-5} s). In festen Matrices kann diese bis zu einigen Minuten betragen. Der Prozess der Fluoreszenz beschreibt einen Übergang vom S_1 - in den S_0 -Zustand unter Photonenabgabe.

Ein Fluoreszenzübergang erfolgt stets vom niedrigsten Schwingungsniveau des S_1 -Zustandes, da er deutlich langsamer (10^{-9} s) verläuft als die schnellere Schwingungsrelaxation (10^{-12} s) (*Kasha*-Regel). Endpunkte des Übergangs sind angeregte Schwingungsniveaus des Grundzustands. Bei größeren organischen Molekülen ist deshalb ein diskretes und vielfältiges Linienspektrum zu erwarten,

welches jedoch nicht zu beobachten ist, da aufgrund von Wechselwirkungen mit der den Farbstoff umgebenden beweglichen und variierenden Solvathülle eine starke Verbreiterung der Schwingungsübergänge erfolgt. Daraus ergeben sich bei Raumtemperatur in Lösung lediglich breite Emissionsbanden ohne Feinstruktur. Die Abgabe der restlichen Schwingungsenergie geschieht durch strahlungslose Stoßdeaktivierung. Zusammenfassend sind die verschiedenen Relaxationsprozesse in Tabelle 2-1 dargestellt.

Tabelle 2-1: Mögliche Zustandsübergänge in angeregten Molekülen

Übergang	Name
$S_1 \xrightarrow{k_{IC}} S_0 + \text{Wärme}$	strahlungslose Desaktivierung (IC)
$S_1 \xrightarrow{k_f} S_0 + h\nu_f$	Fluoreszenz (F)
$S_1 \xrightarrow{k_{ISC}} T_1$	<i>Intersystem Crossing</i> (ISC)
$T_1 \xrightarrow{k_{ISC}} S_0 + \text{Wärme}$	<i>Intersystem Crossing</i> (ISC)
$T_1 \xrightarrow{k_p} S_0 + h\nu_p$	Phosphoreszenz (P)

Da aus den zuvor beschriebenen Gründen vor und nach dem Fluoreszenzübergang strahlungslose Schwingungsrelaxationen stattfinden, besitzt die emittierte Strahlung stets eine größere Wellenlänge bzw. geringere Energie als die absorbierte. Als *Stokes-Verschiebung* bezeichnet man die bathochrome, spektrale Verschiebung der Fluoreszenz- gegenüber der Absorptionsbande in den langwelligeren Bereich (Abbildung 2-3) [Stokes 1852].

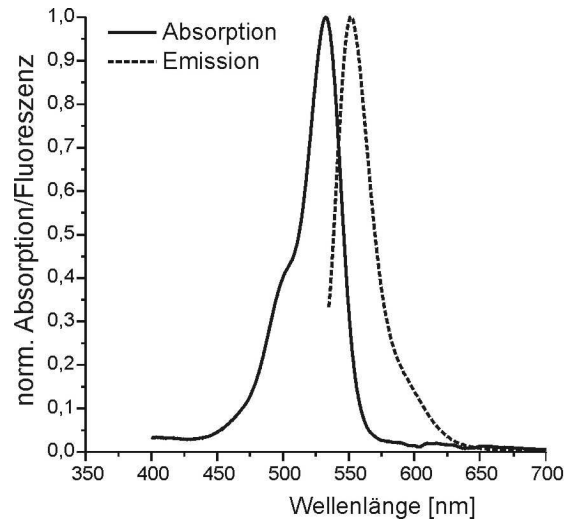


Abbildung 2-3: Stokes-Verschiebung zwischen Absorptions- und Emissionsspektrum eines Farbstoffs.

2.1.3 Lebensdauer und Quantenausbeute der Fluoreszenz

Unter Fluoreszenzlebensdauer versteht man die Entvölkerung des ersten angeregten Singulettzustandes S_1 in den Grundzustand S_0 . Sie bezeichnet dabei die Zeit, nach welcher sich die Anzahl der angeregten Moleküle oder die Fluoreszenzintensität $[F(t)^*]$ auf $1/e$ des Startwertes $[F(t_0)^*]$ reduziert hat. Dieser Prozess gehorcht oftmals einem Geschwindigkeitsgesetz erster Ordnung, dessen integrierte Form in Gleichung 2.2 wiedergegeben ist:

$$[F(t)^*] = [F(t_0)^*] e^{-t/\tau} \quad \text{Gleichung 2.2}$$

Hierbei symbolisiert τ sämtliche, zur Entvölkerung von S_1 beitragenden Geschwindigkeitskonstanten (s. Gleichung 2.3).

$$\tau = \frac{1}{k_{fl} + k_{IC} + k_{ISC}} \quad \text{Gleichung 2.3}$$

Die Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz wird durch k_{fl} , die ebenfalls ablaufenden strahlungslosen Konkurrenzprozesse IC sowie ISC durch k_{IC} bzw. k_{ISC} ausgedrückt. Für Chromophore liegt die Fluoreszenzlebensdauer im einstelligen Nanosekundenbereich.

Durch zeitabhängige Messung der Fluoreszenzintensitätsabnahme ist die Fluoreszenzlebensdauer experimentell zugänglich, da zwischen beobachtbarer Intensität und Anzahl der angeregten Zustände eine direkte Proportionalität besteht.

Tritt kein streng monoexponentielles Abklingverhalten auf, muss es nach

$$F(t)^* = \sum_i A_i \cdot e^{-t/\tau_i} \quad \text{Gleichung 2.4}$$

als Summe mehrerer Exponentialterme angenähert werden. Der präexponentielle Faktor A_i repräsentiert die Amplitude der Komponente i mit der zugehörigen Lebensdauer τ_i .

Das Verhältnis von emittierten N_{em} zu absorbierten Photonen N_{abs} entspricht der Fluoreszenzquantenausbeute Φ , welche sich aufgrund dieser Definition immer zwischen 0 und 1 bewegt [Becker 1983].

$$\Phi = \frac{N_{em}}{N_{abs}} \quad \text{Gleichung 2.5}$$

Φ lässt sich außerdem über die Geschwindigkeitskonstanten aller konkurrierenden Prozesse ermitteln, die zur Desaktivierung eines elektronisch angeregten Zustandes beitragen.

$$\Phi = \frac{k_{fl}}{k_{fl} + \sum k_i} \quad \text{Gleichung 2.6}$$

k_{fl} beschreibt die Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz, $\sum k_i$ die Summe der Geschwindigkeitskonstanten aller anderen zur Desaktivierung führenden Prozesse.

2.1.4 Fluoreszenzlöschung

Aufgrund der sich ändernden elektronischen Eigenschaften sind im angeregten Zustand Reaktionen möglich, welche im Grundzustand nicht ablaufen würden. Neben Verringerungen der Fluoreszenzintensität kann es auch zu einer Verkürzung der Lebensdauer kommen, was im Allgemeinen mit Fluoreszenzlöschung beschrieben wird. Voraussetzung für letztere stellen die unmittelbare Nähe von angeregtem Fluorophor und Löschmolekül oder das Vorhandensein eines energieübertragenden Systems dar [Kan 1999]. Es handelt sich dabei überwiegend um bimolekulare Prozesse, wie Energie-, Elektronen- und Protonen-Transfer oder Exciplex-Bildung. Im ersten Fall, dem von Förster beschriebenen **Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)**, ist ein Dipol-Dipol-Mechanismus für die strahlungslose Übertragung der Anregungsenergie vom angeregten Farbstoff auf ein geeignetes Löschmolekül verantwortlich. Bedingung ist die Überlappung des Emissionsspektrums des Farbstoffs mit dem Absorptionsspektrum des Löschmoleküls [Förster 1948; Stryer 1978]. Da die Effizienz des Energietransfers eine starke Abstandsabhängigkeit aufweist ($\sim 1/r^6$), kann dieser Effekt zur Messung kleinster Molekülabstände im Ångströmbereich herangezogen werden. Demgegenüber basiert der **Photoinduzierte Elektronentransfer (PET)** auf Redoxreaktionen. Redoxpotentiale, Abstand sowie Lage der Reaktanden zueinander bestimmen dabei die Reaktionsgeschwindigkeit. Trägt der Fluorophor saure oder basische Gruppen, kann ein sogenannter Protonen-Transfer ablaufen, wobei es zur Änderung der pK_a - bzw. pK_b -Werte des Fluorophors beim Übergang in den angeregten Zustand kommt. Die Exciplex-Bildung ist ein Spezialfall des Elektronentransfers, bei dem die chemische Reaktion mittels Elektronenübertragung induziert wird. Daraus resultiert ein nur im angeregten Zustand stabiles Molekül, welches durch strahlungslose Deaktivierung wieder in seine Ausgangskomponenten zerfällt.

2.1.5 Fluoreszenzlöschung durch *Quencher*

Quencher oder Löschmolekül bezeichnet ein nicht fluoreszierendes Molekül, welches in der Lage ist, verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe zu löschen, indem es deren

Emissionsenergie aufnimmt. Der Energietransfer ist umso effizienter, je weitgehender das Emissionsspektrum des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappt. Besonders gute Akzeptoren stellen Moleküle dar, welche ein breites Absorptionsspektrum und keine Eigenfluoreszenz aufweisen. Dieser Gruppe der sogenannten *Dark Quencher* gehören die *Black Hole Quencher* an. Letztere eignen sich zur Löschung einer weiten Bandbreite an Farbstoffen (s. Abbildung 2-4).

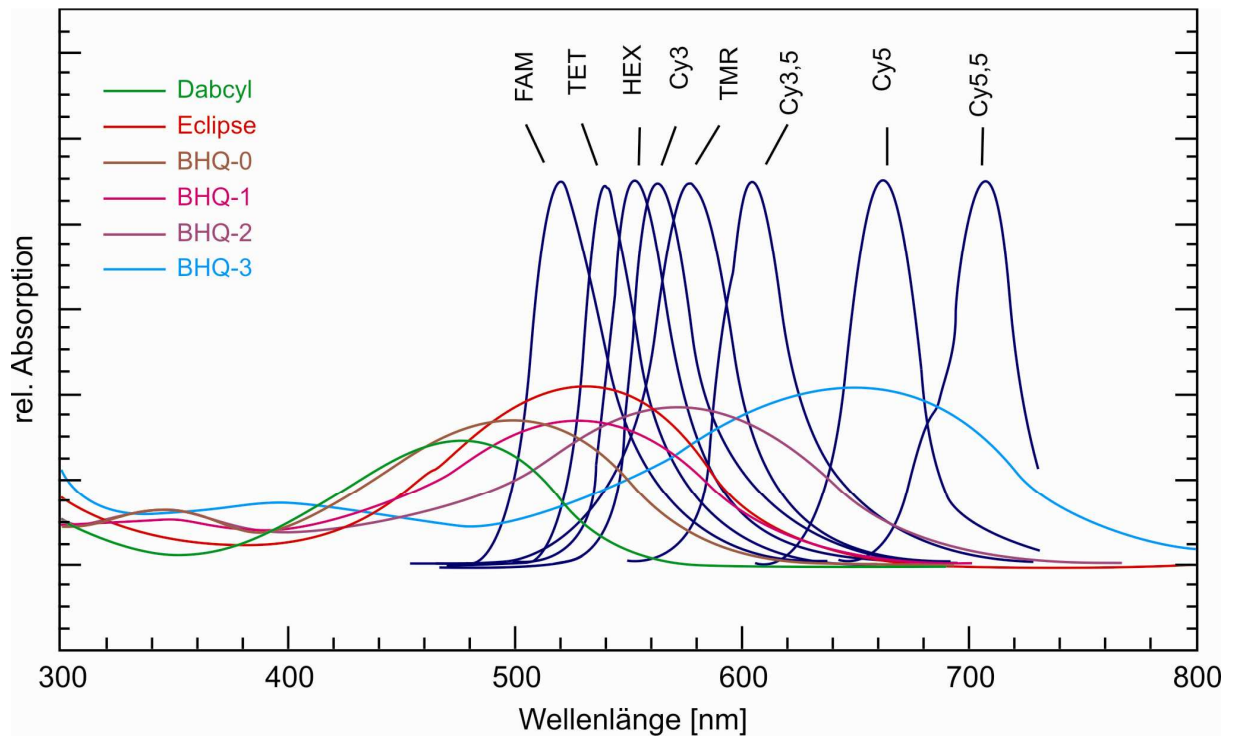


Abbildung 2-4: Absorptionsspektren (untere farbige Kurvenzüge) verschiedener *Quencher* sowie Emissionsbanden (blau, oberer Teil) einiger experimentell häufig benutzter Fluorophore (mit deren Abkürzungen) [www4].

Abbildung 2-5 zeigt die Struktur von DABCYL (4-[(4-(Dimethylamino)phenyl)diazo]-benzoesäure), dessen Absorption im Bereich von 400 bis 550 nm liegt.

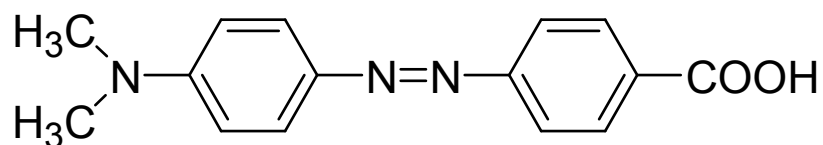


Abbildung 2-5: Struktur des Quenchers DABCYL.

2.1.6 Fluoreszenzlöschung durch Guanin

Als Spezialfall des photoinduzierten Elektronentransfers gilt die Fluoreszenzlöschung langwellig emittierender Oxazin- und Rhodaminfarbstoffe durch Guanin. Eine vergleichbare Wirkung unterbleibt jedoch bei den anderen DNA-Basen Adenin, Cytosin sowie Thymin [Sauer 1995]. Die genauere Untersuchung der zugrundeliegenden intra- und intermolekularen Löschemechanismen erfolgte durch *Sauer* [Sauer 1998], *Lieberwirth* [Lieberwirth 1998] und *Nord* [Nord 1998]. Letzterer zog den Schluss, dass es zur Ausbildung intramolekularer Grundkomplexe zwischen Fluorophoren und Oligonukleotidbasen kommt, wobei nur Guanin eine starke Fluoreszenzlöschung hervorruft.

Sind die Farbstoffe an guaninhaltige Oligonukleotide gekoppelt, kommt es aufgrund der räumlichen Nähe zu einer hohen lokalen Guaninkonzentration, was in einer effektiveren Löschung resultiert. Den Mechanismus dieses Vorganges zeigt Abbildung 2-6.

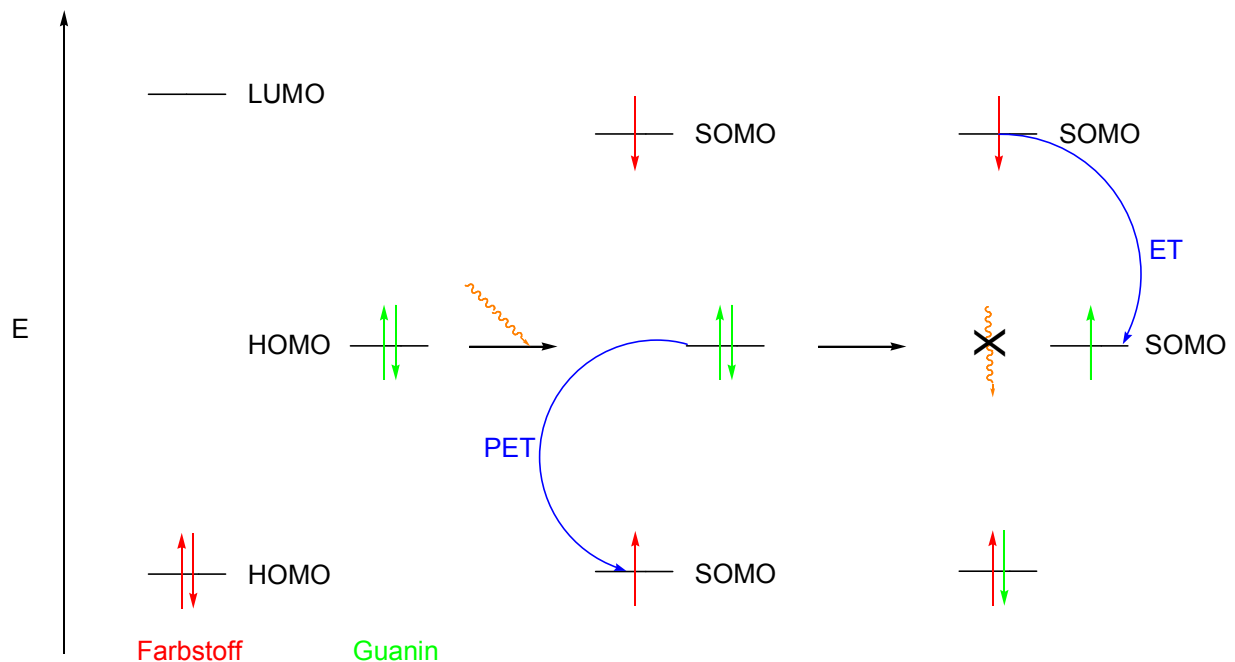


Abbildung 2-6: Schematische Darstellung der Fluoreszenzlöschung durch photoinduzierten Elektronentransfer vom Guanin zum Farbstoff.

Nach Anregung des Farbstoffs durch ein Photon, gelangt ein Elektron des benachbarten Guanins in das aus dem HOMO hervorgegangene SOMO (*Single Occupied Molecular Orbital* – einfach besetztes Molekülorbital). Aufgrund dessen wird die, auch ohne Löschmolekül in räumlicher Nähe, auftretende Fluoreszenz unterdrückt.

2.2 Nucleinsäuren

2.2.1 Eigenschaften und Struktur der DNA

Als Träger genetischer Informationen, und damit zentraler Baustein des Lebens, ist die Desoxyribonucleinsäure im Zellkern Bestandteil der artspezifischen Anzahl verschiedener Chromosomen [Löffler 2001]. Aufgrund ihrer "Entdeckung über die Molekularstruktur der Nucleinsäuren und ihre Bedeutung für die Informationsübertragung in lebender Substanz" erhielten *Watson* und *Crick* 1962 zusammen mit *Wilkins* den Nobelpreis für Medizin. Die DNA besteht aus zwei, als Doppelhelix vorliegenden Einzelsträngen, welche komplementär sowie antiparallel zueinander verlaufen, d.h. das 5'-Ende des einen Strangs liegt dem 3'-Ende des anderen gegenüber. Ein DNA-Einzelstrang stellt ein lineares Biopolymer aus 2'-Desoxyribosen dar, welche am C5'- sowie C3'-Atom über Phosphodiesterbrücken miteinander verknüpft sind. Am C1-Atom befindet sich stets eine β -N-glykosidisch gebundene Purin- (Adenin oder Guanin) oder Pyrimidinbase (Cytosin oder Thymin). Die Abfolge der Nucleobasen codiert innerhalb eines Gens die Primärstruktur von Proteinen oder auch RNAs.

Als Nucleosid bezeichnet man ein Molekül, welches von 2'-Desoxyribose und einer der vier Basen gebildet wird (Abbildung 2-7, blauer Rahmen). Ist an den Zucker am 5'-Kohlenstoffatom eine Phosphatgruppe gebunden, spricht man von einem Nucleotid (Abbildung 2-7, violetter Rahmen).

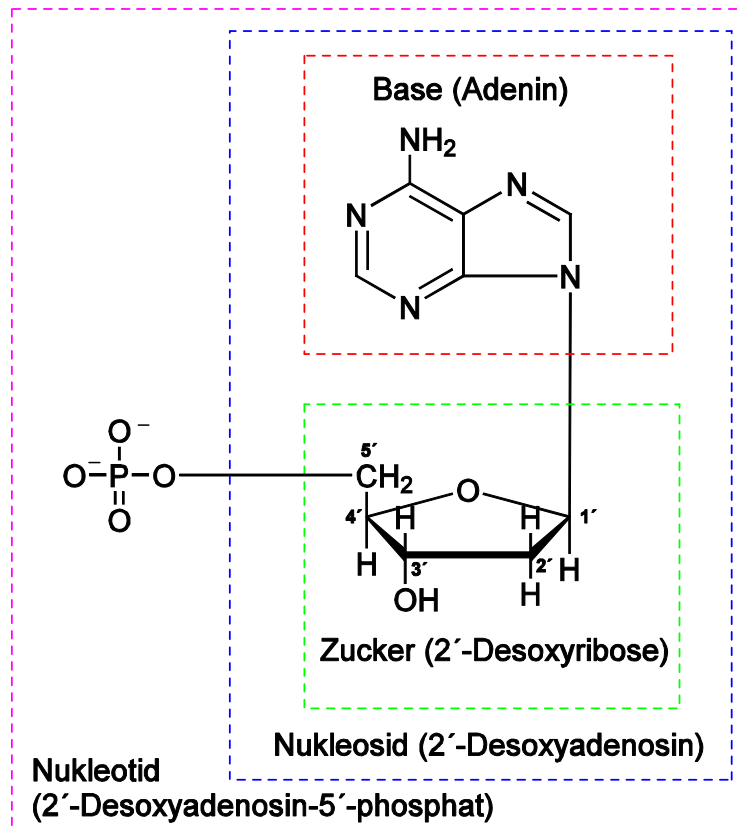


Abbildung 2-7: Aufbau eines Nukleotids (2'-Desoxyadenosin-5'-phosphat, AMP, violetter Rahmen), bestehend aus einer Phosphatgruppe und einem Nukleosid (2'-Desoxyadenin, blauer Rahmen). Letzteres wird von einer Base (Adenin, roter Rahmen) und einem Zucker (2'-Desoxyribose, mit nummerierten C-Atomen, grüner Rahmen) gebildet.

Die *Chargaff*-Regel besagt, dass Adenin und Thymin sowie von Guanin und Cytosin im gleichen molaren Verhältnis in der doppelsträngigen DNA vorliegen [Chargaff 1951; Chargaff 1979]. Nach der *Watson-Crick*-Basenpaarungsregel paaren sich immer Thymin mit Adenin über zwei und Guanin mit Cytosin über drei Wasserstoffbrückenbindungen (Abbildung 2-8). Daraus ergibt sich eine höhere Stabilität der Guanin-Cytosin- gegenüber der Thymin-Adenin-Bindung.

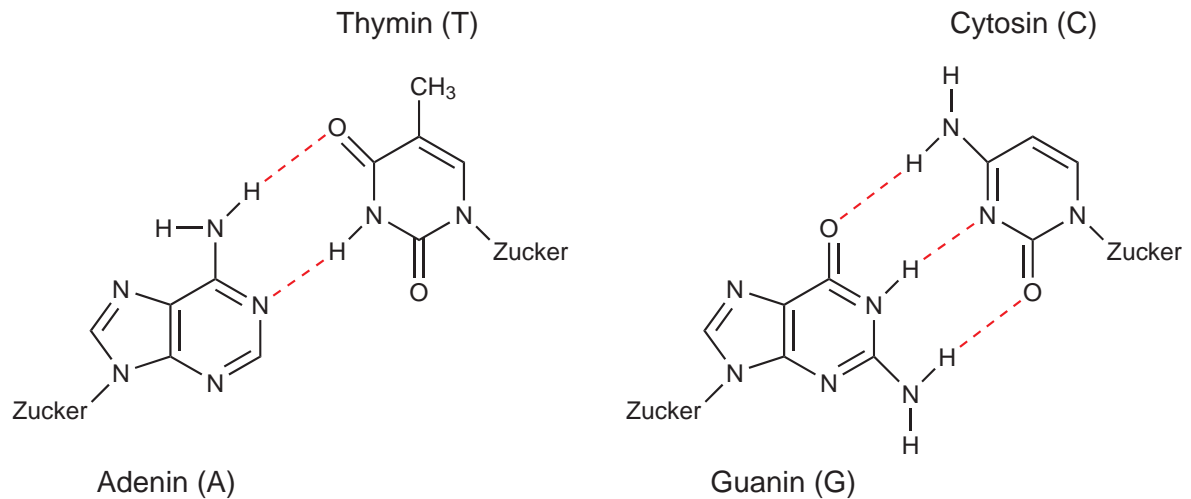


Abbildung 2-8: Molekulare Struktur der Hybridisierungsdimere A-T und G-C (*Watson-Crick*-Basenpaarungen). Die Wasserstoffbrückenbindungen sind rot hervorgehoben.

Das negativ geladene, nach außen verlagerte Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat bedingt, dass die hydrophoben Basen nach innen zeigen und durch gegenseitige Wechselwirkung die Stabilität der Helix gewährleisten. Durch die große Anzahl nach außen gerichteter negativer Ladungen lässt sich die hohe Wasserlöslichkeit der DNA erklären. Je nach Länge, Nukleobasensequenz sowie Umgebungsbedingungen kann eine DNA-Doppelhelix unterschiedliche Konformationen annehmen (s. Abbildung 2-9) [Flemming 1982]. In den meisten Fällen liegt die von *Watson* und *Crick* beschriebene B-Form einer rechtsgängigen Helix mit einem Durchmesser von 2 nm vor. Die Distanz benachbarter Basen entlang der Helixachse beträgt 0,34 nm bei einer Verdrehung der Basen zueinander um 36°. Somit wiederholt sich die Struktur nach zehn Resten auf jedem Strang, d.h. in Intervallen von 3,4 nm. Voraussetzung für die Ausbildung der B-Konformation ist neben einem hohen Maß an Hydratisierung auch das Vorhandensein von Alkalimetallionen zur Neutralisierung der negativ geladenen Phosphatgruppen. Sinkt erstere unter 75 %, neigen sich die Basenpaare zur Helixachse, wodurch elf Basen pro Windung eine kompaktere, sogenannte A-Form erzeugen. Bei hohen Salzkonzentrationen bildet sich eine linksgängige Z-DNA aus, welche eine zickzack-förmige Anordnung der Phosphatgruppen im Rückgrat bei einer Ganghöhe von 4,56 nm aufweist [Stryer 1999].

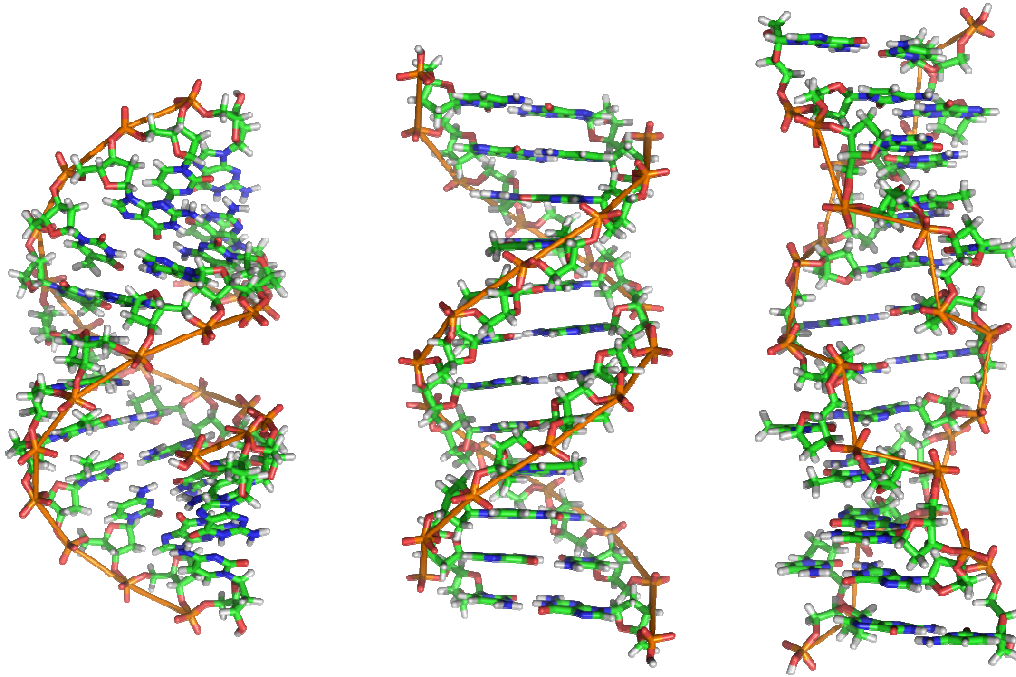


Abbildung 2-9: Verschiedene Konformationen der DNA. **Links:** A-Form, **Mitte:** von *Watson-Crick* beschriebene B-DNA. **Rechts:** linksgängige Z-Konformation [www7].

2.2.2 Denaturierung und Renaturierung der DNA

Unter physiologischen Bedingungen weisen DNA-Helices eine hohe Stabilität auf. Durch Erwärmung bzw. Säure- oder Alkalizugabe kommt es zu einer Schwächung und letztendlich zur Trennung der Wasserstoffbrückenbindungen, d.h. zum Aufwinden des DNA-Doppelstranges. Diesen Prozess nennt man Schmelzen oder Denaturierung. Die Schmelztemperatur T_m bezeichnet jene Temperatur, bei welcher die Hälfte der doppelsträngigen DNA-Moleküle zu Einzelsträngen geworden ist. T_m liegt umso höher, je GC-reicher die Basenabfolge ist, da die drei Wasserstoffbrückenbindungen für eine stärkere Bindung sorgen als die zwei der AT-Basenpaare. Ebenso spielen Art und Konzentration des Lösungsmittels eine entscheidende Rolle. So führen organische Lösungsmittel, wie Acetonitril oder Formamid, zu einer Destabilisierung, während Alkali- bzw. Erdalkalimetallionen das Gegenteil bewirken. Infolge des Zusammenbruchs der Basenpaarung kommt es zu Veränderungen der physikalischen Eigenschaften, wie der Zunahme der Viskosität und Extinktion (Hyperchromie). Die Abruptheit des Übergangs beweist, dass es sich bei der DNA-Doppelhelix um eine höchst kooperative Struktur handelt, d.h., dass die noch

erhaltenen Abschnitte durch bereits geschwächte oder aufgelöste Bereiche starke Destabilisierung erfahren [Stryer 1999]. Den Anteil an doppelsträngiger DNA kann man über die UV-Absorption bei 260 nm ermitteln (s. Abbildung 2-10).

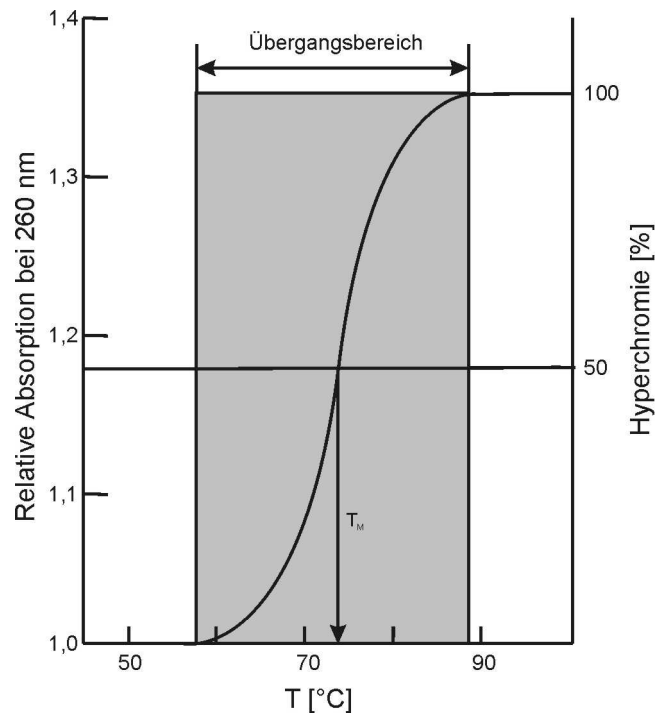


Abbildung 2-10: Beispiel einer DNA-Schmelzkurve.

Sinkt die Temperatur unter den T_M -Wert, lagern sich getrennte, komplementäre DNA-Sequenzen spontan wieder zu einer Doppelhelix zusammen. In diesem Fall spricht man von Renaturierung oder *Annealing*.

Die angesprochenen Prozesse tragen entscheidend zu den biologischen Funktionen der DNA bei.

2.2.3 Eigenschaften und Struktur der PNA

Die von *Nielsen* [Nielsen 1991] erstmals beschriebenen Peptidnukleinsäuren (**P**eptide **N**ucleic **A**cids, PNAs) stellen synthetische Oligomere dar, welche aufgrund ihres Aufbaus sowie der atomaren Abstände hohe strukturelle Verwandtschaft zu

natürlicher DNA aufweisen (s. Abbildung 2-11). Diese sogenannten DNA-Analoga bzw. –Mimetika besitzen ein achirales, aus N-(2-Aminoethyl)glycin-Bausteinen bestehendes, neutrales Rückgrat, von welchem in regelmäßigen Abständen kurze, identische Einheiten, mit den Nucleobasen A, T, G oder C am Ende, abzweigen.

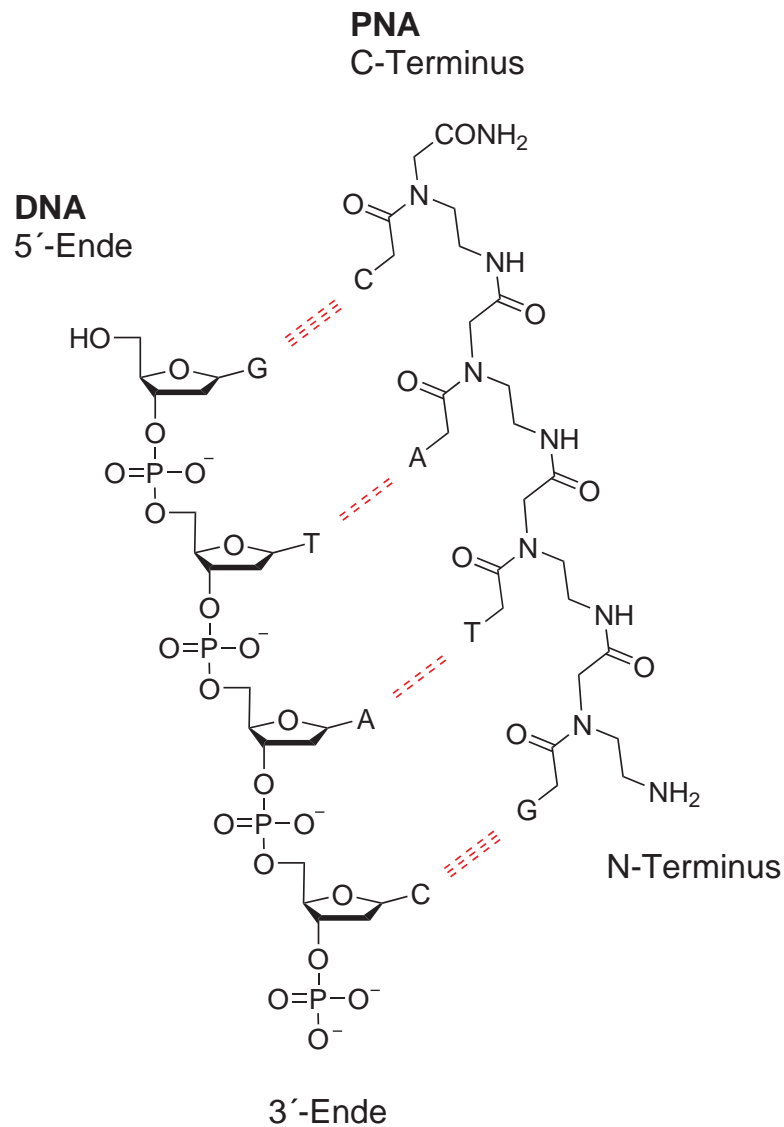


Abbildung 2-11: Struktureller Vergleich einer PNA- (rechts) mit einer komplementären DNA-Sequenz (links) anhand eines DNA/PNA-Hybrids.

Dadurch können PNAs mit komplementären, linearen Basenabfolgen durch *Watson-Crick*-Hybridisierungen (A/T, G/C) in paralleler und antiparalleler Richtung Duplexe bilden. Neben PNA/PNA- entstehen ebenso PNA/RNA- als auch PNA/DNA-Hybride (s. Abbildung 2-11) [Ratilainen 2000]. Letztere zeigen eine höhere Stabilität als die

natürlichen DNA/DNA- oder DNA/RNA-Analoga [Vernille 2004]. Das Hybridisierungsverhalten von PNAs ist jedoch komplexer, so dass man eine Fülle anderer Möglichkeiten kennt, für die hier lediglich Beispiele in der Literatur zitiert seien: [Wittung 1996; Wittung 1997; Armitage 2003; Natsume 2007; Lu 2009]. Ein entscheidender Unterschied zur DNA besteht im Aufbau des Rückgrats, welches bei PNAs keine Ladung trägt. Im Gegensatz dazu verfügt die DNA aufgrund der Phosphatbrücken über ein stark negativ geladenes Grundgerüst. Daraus resultiert eine bessere thermische Stabilität, beispielsweise von PNA/DNA-Duplices gegenüber analogen DNA/DNA-Hybriden.

Ein weiterer Vorteil liegt in der Fähigkeit von PNAs, auch in Lösungen geringer Salzkonzentration mit komplementären DNAs hybridisieren zu können (s. Abbildung 2-12). Die Ursache ist in den nicht vorhandenen, anionischen Partialstrukturen des PNA-Rückgrats zu suchen, welche durch hohe Salz- und damit Kationenkonzentrationen neutralisiert werden müssten, bevor eine effektive Annäherung der beiden Hybridisierungspartner möglich wird.

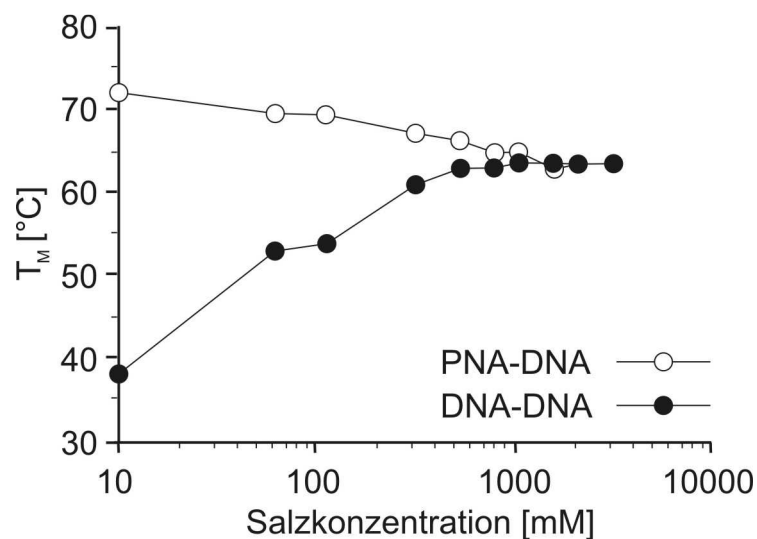


Abbildung 2-12: Exemplarischer Vergleich der salzabhängigen Duplexstabilität (gemessen durch die Schmelztemperatur T_M) eines DNA-DNA- versus eines PNA-DNA-Doppelstrangs mit identischer Basenabfolge [Egholm 1993].

Neben dem beschriebenen Hybridisierungsverhalten besitzen PNAs auch deutliche chemische Unterschiede zu DNAs [Meier 1992; Hyrup 1996; Antsyrovich 2002]:

- i. PNAs sind über einen großen Temperaturbereich stabil.
- ii. Sie zeigen über einen weiten pH-Bereich höhere Stabilität als DNAs, welche z.B. unter sauren Bedingungen depurinieren.
- iii. Die Löslichkeit von PNAs in Wasser oder wässrigen Puffern ist mäßig, die in organischen, lipophilen Medien nicht in der Literatur beschrieben. Am besten lösen sich PNAs in Wasser/Dimethylsulfoxid, Wasser/N,N-Dimethylformamid, Wasser/Pyridin oder Wasser/Acetonitril/Trifluoressigsäure. Die Natur der organischen Komponenten solcher Medien verhindert die problemlose direkte experimentelle Verwendung der Lösungen, wie beispielsweise UV-Messung, Hybridisierung, biologische Versuche etc.

Die Resistenz von PNAs gegenüber Nukleasen und Proteasen ist von besonderem Interesse [Becker 2010]. So können diese synthetischen DNA-Analoga unter anderem als Antisense-Oligonukleotide Einsatz finden, welche darauf abzielen, ein als Ursache für einen bestimmten pathologischen Zustand erkanntes oder vermutetes Protein *in vivo* in seiner Konzentration am Wirkort so zu vermindern, dass der pathologische Zustand verschwindet [Filipovska 2004]. Dies geschieht, indem sie mit DNA eine doppel- bzw. tripelhelikale Struktur ausbilden oder an mRNAs binden, was eine Inhibierung der Transkription bzw. Translation zur Folge hat [Zhilina 2005]. Gelingt es, eine bestimmte mRNA zu zerstören oder wenigstens in ihrer Funktion zu blockieren, so wird auch die Expression des korrespondierenden Proteins verhindert und somit das anvisierte therapeutische Ziel auf molekularer Ebene erreicht.

PNAs sind gegenüber Proteasen, sowie Endo- und Exonukleasen inert. Darüber hinaus fungieren sie nicht als Substrat für Polymerasen. Die Nichtakzeptanz durch Polymerasen verhindert eine Amplifizierung geringer Mengen PNAs, wie dies heutzutage routinemäßig für DNAs mittels *Polymerase Chain Reaction* (PCR) [Mullis 1986; Mullis 1994] oder *Reverse Transcription-PCR* (RT-PCR) [O'Connell 2002] geschieht. Ein hoch sensitives Nachweissystem, analog zur DNA, existiert demzufolge zurzeit nicht und jeder qualitative Nachweis einer speziellen PNA hat bestenfalls die Nachweisgrenze der betreffenden analytischen Methode.

Die erwähnte Resistenz der PNAs gegen Proteasen, Nukleasen und Polymerasen hat einen erheblichen Einfluss auf die Konzeption eines auf PNAs basierenden Detektionssystems, bzw. wie in der Einleitung beschrieben, auf die Konzeption eine

Markierungssystem für Materialien unserer industriellen Gesellschaft. Für solche Markierungssysteme kann z.B. die Nachweisgrenze eines analogen auf DNA basierenden Systems nur schwer erreicht werden.

2.2.4 *Molecular Beacons*

Erstmals von *Tyagi* und *Kramer* synthetisiert [Tyagi 1996], beschreibt der Begriff *Molecular Beacon* (molekulares Leuchtfeuer) einzelsträngige Hybridisierungssonden für DNA. Diese Oligonukleotide weisen eine Stamm-Schleifen-Struktur auf, welche sich aufgrund vorhandener, zueinander komplementärer Enden der Sequenz ergibt [Bonnet 1999] (s. Abbildung 2-13, links).

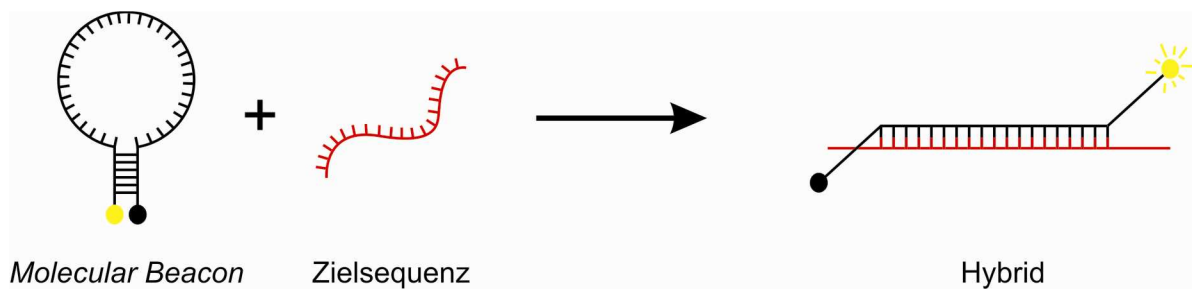


Abbildung 2-13: Schematische Darstellung der Öffnung eines *Molecular Beacon* durch Hybridisierung mit einer komplementären Sequenz. Die Hybridisierung der Zielsequenz führt zu einer räumlichen Trennung von Fluorophor und Löschmolekül durch Aufhebung der Stamm-Schleifen-Struktur, woraus ein Fluoreszenzanstieg resultiert.

Der 5'-Terminus trägt einen kovalent gebundenen Fluorophor, das 3'-Ende ein Löschmolekül. Eine zur Zielsequenz komplementäre Basenabfolge bildet teilweise oder ganz die Schleife des *Beacons* aus. In Abwesenheit eines entsprechenden Moleküls befinden sich Fluorophor und *Quencher* in räumlicher Nähe, so dass die elektronischen Wechselwirkungen zu einer effizienten Unterbindung der Fluoreszenz des Farbstoffs führen. Wird die Zielsequenz zugegeben, entsteht eventuell, im Vergleich zur Stamm-Stamm-Hybridisierung, ein längeres sowie stabileres Sonden-Zielmolekül-Hybrid. Aufgrund dessen öffnet sich die sogenannte Haarnadelstruktur,

Fluorophor und Löschmolekül wechselwirken nicht länger, d.h. ein Fluoreszenzanstieg kann detektiert werden [Tan 2004].

Molecular Beacons zeichnen sich durch eine hohe Spezifität aus, anhand derer die Diskriminierung einer einzigen Abweichung in der Basenabfolge (Punktmutation, engl. *Single Nucleotide Polymorphism* - SNP) der Zielsequenz möglich ist [Wang 2009]. Dafür müssen die Sonden derart modelliert werden, dass sie gerade lang genug sind, um im Hybrid mit der 100 % komplementären Zielsequenz eine höhere Stabilität als in der geschlossenen Konformation zu erreichen. Aufgrund dessen führt die Zugabe jener Sequenz zu einer spontanen Hybridbildung, wohingegen eine Gegensequenz mit SNP in einem weniger stabilen Doppelstrang resultieren würde und deshalb die Öffnung des *Molecular Beacon* unterbleibt. Insofern stellen letztere ideale diagnostische Nachweissysteme für die genomweite Suche nach Punktmutationen und pharmakogenetische Anwendungen dar. Beispielsweise dienen sie der Detektion von durch SNPs verursachten Antibiotikaresistenzen verschiedenster Krankheitserreger [Bialy 1998; Piatek 1998].

Zusammenfassend lassen sich wesentliche Eigenschaften der *Molecular Beacons* festhalten, welche zu einem leistungsstarken Detektionsverfahren führen:

1. Fluoreszenzanstieg durch räumliche Trennung von Farbstoff und Löschmolekül nur durch Hybridisierung mit der Zielsequenz
2. Problemlose Markierung mit spektral unterschiedlichen Fluorophoren
3. Diskriminierung von Punktmutationen aufgrund hoher Spezifität

Da heutzutage eine große Anzahl neuer, vielseitiger, fluoreszenzspektroskopischer *Thermocycler* für klinische Diagnostik sowie Forschungslabore auf dem Markt ist, können Nachweisverfahren, welche bis zu sieben unterschiedlich farbstoffmarkierte *Molecular Beacons* gleichzeitig verwenden, entworfen werden. Dies ermöglicht die Entwicklung kosteneffektiver Mehrfachassays zur Identifizierung einer Gruppe potentiell infektiöser Erreger in klinischen Proben. Bei entsprechender Konzeption ermitteln die Systeme neben den Krankheitserregern auch die Wirksamkeit von Antibiotika gegen den nachgewiesenen Bakterienstamm. Ist eine Gruppe verschiedener genetischer Mutationen für das gleiche Krankheitsbild verantwortlich, kann damit die Identifizierung in nur einem Schritt erfolgen.

2.3 Biochips

Unter einem Biochip bzw. *Microarray* (s. Abbildung 2-14) versteht man die systematische Anordnung von *Spots* biomolekularer Sonden, wie Nukleinsäuren, Peptiden oder Proteinen (inklusive Antikörpern), auf festen Oberflächen, welche beispielsweise aus Glas, Metall oder Kunststoff bestehen können. „Micro“ bezieht sich hierbei auf einen *Spot*-Durchmesser kleiner 200 μm , ab 200 μm spricht man von sogenannten *Macroarrays*. 1975 entwickelte *Southern* eine nach ihm benannte molekularbiologische Untersuchungsmethode für DNA-Sequenzen [Southern 1975], welche als Vorläufer der *Microarray*-Technologie gilt. Der Begriff „Biochip“ fand erstmals im Jahre 1995 Verwendung. Die Entwicklung des Wortes wird darauf zurückgeführt, dass es analog zum Aufbringen kleiner Schaltkreise auf Computerchips möglich wurde, biologisches Material in winzigen Mengen auf eine Oberfläche in exakter Position und minimaler Ausdehnung aufzutragen [Müller 2004].



Abbildung 2-14: Beispiel eines *Microarrays*.

Die beschleunigte Etablierung von Biochips erfolgte, wie auch für andere molekularbiologische Methoden, durch das *Human Genome Project* (HGP) [Venter 2001]. Durch die Sequenzierung des menschlichen Genoms musste eine sehr große Datenmenge bewältigt werden. Dies führte zwangsläufig zur Entwicklung von Methoden, welche es ermöglichten, eine große Anzahl verschiedener Moleküle in einem überschaubaren Zeitrahmen miteinander interagieren zu lassen.

Die vielseitige Anwendung der *Microarrays* nahm ihren Anfang in der DNA-*Microarray*-Technik zur Genexpressionsanalytik. Der Einsatz im diagnostischen

Bereich ist für die Ermittlung von genetischen Risiken, Erkrankungen des Stoffwechsels, der Onkologie, bei Fertilitätsstörungen und im großen Feld der Infektionserkrankungen möglich [Müller 2004]. Ein wesentlicher Vorteil des Einsatzes von Proteinchips besteht darin, simultan in einem Testansatz das Vorhandensein von Antikörpern und Antigenen mehrerer Infektionserreger durchführen zu können. Dies ist vor allem bei der Ursachenfindung einer bestimmten Krankheitssymptomatik, z.B. bei Hepatitis oder Erkrankungen der respiratorischen Organe, vorteilhaft. Beide Symptomkreise können durch eine Vielzahl von Erregern verursacht werden, welche konventionell durch viele Testläufe einzeln ausgeschlossen werden müssten. Ebenso sind Microarrays im Bereich Allergie-, Lebensmittel- und Umweltanalytik sowie der Veterinärmedizin einsetzbar [Müller 2004].

Zu den bedeutendsten Vorteilen der Biochips zählen:

- Hochdurchsatz-*Screening* (*High-Throughput-Screening*, HTS): durch die Anordnung sehr vieler verschiedener Proben, beispielsweise Nukleinsäuresequenzen, auf extrem kleinem Raum kann eine Auswertung der Hybridisierung mit einer spezifischen Sequenz automatisiert werden. Derzeit ist es möglich, über 300.000 verschiedene Oligonukleotide geordnet auf einem Träger von wenigen Quadratzentimetern Größe anzuknüpfen.
- Zeitersparnis durch parallele Versuchsführung
- Kostenersparnis durch Materialeinsparung, bedingt durch Miniaturisierung
- Routinefähigkeit durch Automatisierung und Standardisierung
- Spezifität durch Überprüfung mittels selektiver Hybridisierungen

Fast alle biologischen Chiptypen basieren auf dem gleichen Grundprinzip: um die kovalente Fixierung der Sequenzen auf dem Träger zu gewährleisten, muss dieser zuvor entsprechend aktiviert worden sein. Für die Herstellung der in dieser Arbeit verwandten *Microarrays* kam ein *Spotting*-Roboter zum Einsatz, welcher die präparierten Sonden über Kapillarkräfte direkt auf die Oberfläche platziert, wo sie eine chemische Reaktion eingehen und so stabil gebunden werden (Abbildung 2-15). Weitere Möglichkeiten der Chipherstellung bestehen in der photolithographischen Festphasensynthese [Liu 2007; Shin 2010] sowie dem *Ink Jetting*, das einem Tintenstrahldrucker vergleichbar arbeitet [Beyer 2007; Stadler 2008; Breitling 2009].

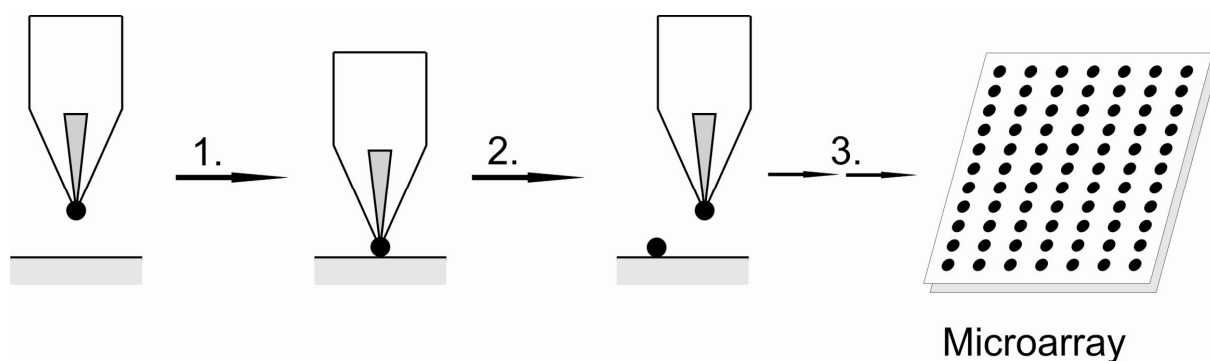


Abbildung 2-15: Schematisches *Microspotting*: 1. Oberflächenkontakt; 2. Positionsänderung des *Pins*; 3. Wiederholung der Schritte 1. und 2.

2.4 *Diels-Alder*-Reaktion

Zur kovalenten Immobilisierung der Oligonukleotide wurden in jüngster Vergangenheit eine Vielzahl neuartiger Verknüpfungsmethoden bzw. -reaktionen entwickelt [Hermanson 2008]. Im Gegensatz zur bisherigen Bindungsbildung über **N**-Hydroxysuccinimid- (NHS-) oder Thiolchemie zeichnen sie sich durch spezifischere Umsetzungen aus. Hierzu zählen die in diesem Kapitel detaillierter behandelten *Diels-Alder*- oder inversen *Diels-Alder*-Reaktionen.

2.4.1 Grundlagen

Pericyclische Reaktionen [Lowry 1980] sind Prozesse, welche auf simultaner Änderung von Bindungen, wie Bindungsbildung und -bruch, beruhen. Diese verlaufen konzertiert, jedoch nicht synchron, d.h. zu einem bestimmten Zeitpunkt können die Umwandlungen an verschiedenen Zentren des Moleküls unterschiedlich weit fortgeschritten sein, ohne dass die Reaktion in Stufen abläufe.

1965 publizierten *Woodward* und *Hoffmann* [Woodward 1965] eine Arbeit, in der die Prinzipien der Orbitaltheorie auf pericyclische Reaktionen angewandt wurden. Hierdurch konnte das mechanistische Verständnis erheblich verbessert und eine Vielzahl gezielter Experimente ermöglicht werden. *Woodward* und *Hoffmann* untergliederten die pericyclischen Reaktionen in fünf Typen: Cycloaddition, electrocyclische, sigmatrope, cheletrope sowie Gruppenübertragungsreaktion [Woodward 1969]. Bei der Cycloaddition vereinen sich zwei oder mehrere Moleküle durch Umwandlung von π - in σ -Bindungen zu einem Ring [Huisgen 1968a; Huisgen 1968b]. Die Bezeichnungsweise richtet sich nach der Anzahl der an der Reaktion teilnehmenden π -Elektronen. Abbildung 2-16 zeigt eine [2+4]-Cycloaddition, bei welcher Ethen mit 1,3-Butadien reagiert.

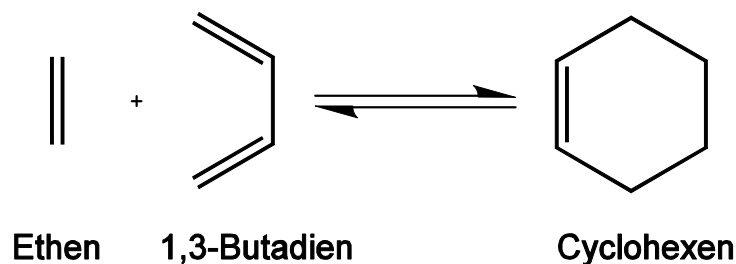


Abbildung 2-16: [2+4]-Cycloaddition am Beispiel von Ethen und 1,3-Butadien.

Das Gleichgewicht der Abbildung 2-16 stellt den Prototyp einer *Diels-Alder*- (Cyclisierung) bzw. der umgekehrt verlaufenden (Zerfall in die beiden Komponenten) *Retro-Diels-Alder*-Reaktion dar.

Allgemein reagiert ein konjugiertes Dien mit einem sogenannten Dienophil (Alken oder Alkin, beide können auch Heteroatome enthalten) sowohl inter- als auch intramolekular unter Ausbildung eines Sechsrings. Aus den bisher genannten Fakten lässt sich erahnen, welche synthetische Vielfalt *Diels-Alder*-Reaktionen eröffnen. Sie gehören zu den Eckpfeilern synthetischer Reaktionen mit dem Ziel der Knüpfung von C-C-Bindungen [Sauer 1980]. Demzufolge ist auch heute das präparative Potential dieses Reaktionstypus noch nicht erschöpft. *Diels* und *Alder* entdeckten die nach ihnen benannte Umsetzung in den 1920er Jahren [Diels 1928], wofür sie 1950 den Nobelpreis für Chemie erhielten.

Eine erhöhte Reaktivität kann durch Aktivierung der Doppel- oder Dreifachbindungen des Dienophils erreicht werden. Diese Bedingung wird durch eine Spannung der C-C-Doppel- bzw. Dreifachbindung sowie durch das Vorliegen mindestens eines elektronenziehenden Substituenten, z.B. CO, CO₂R, CN, NO₂ oder SO₂-Aryl, erfüllt. Im Optimalfall trifft ein elektronenarmes Dienophil auf ein „komplementäres“, d.h. elektronenreiches Dien. Die erwähnten Zusammenhänge erklären, warum Ethen und Acetylen sehr schlechte Dienophile darstellen. Es sind allerdings auch Reaktionen mit inversem Elektronenbedarf bekannt (s. 2.4.2).

Stereochemisch muss das Dien in *s-cis*-Konformation vorliegen [Lowry 1980], um hohe Ausbeuten zu liefern. Die Addition von Dien und Dienophil erfolgt ausschließlich *cis*, so dass die relativen Konfigurationen der beiden Ausgangsmoleküle im Produkt erhalten bleiben, d.h. die Reaktion ist generell stereospezifisch (s. Abbildung 2-17).

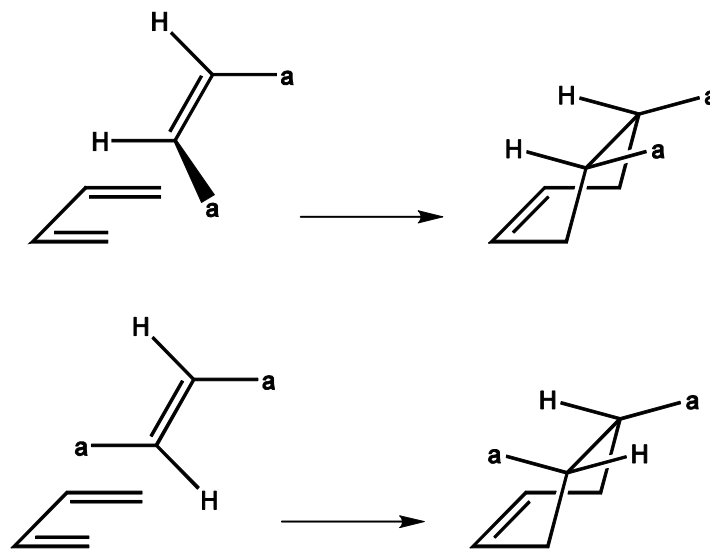


Abbildung 2-17: Stereospezifische Addition von Dien und Dienophil, a bezeichnet einen Substituenten.

Bei den Additionen gilt die *endo*-Regel (auch *Alder*-Regel), nach der aufgrund von sekundären Orbitalwechselwirkungen bevorzugt die Bildung des thermodynamisch instabileren, jedoch kinetisch begünstigten *endo*-konfigurierten Produktes erfolgt (s. Abbildung 2-18).

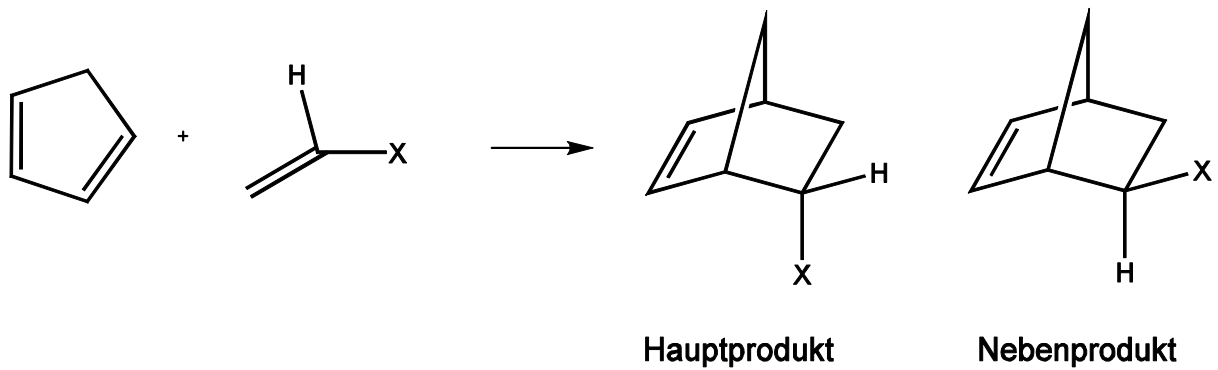


Abbildung 2-18: *endo*-Selektivität einer *Diels-Alder*-Reaktion. Diese ist gekennzeichnet durch einander zugewendete funktionelle Gruppen oder Molekülteile in cyclischen Verbindungen.

Stereospezifische Besonderheiten des Reaktantenpaares Dien/Dienophil treten auf, wenn die neugebildeten Bindungen auf der gleichen Seite entstehen. In diesem Fall spricht man von *suprafacial* (s). Bei einer *antarafacialen* Reaktion (a) erfolgt die Knüpfung der neuen Bindungen auf verschiedenen Seiten des Reaktanten. Aufgrund dessen kann sich das Molekülpaar Dien/Dienophil bei einer Cycloaddition auf vier Weisen präsentieren: (s+s), (s+a), (a+s) und (a+a). Bezieht man die *Woodward-Hoffmann*-Regeln [Woodward 1965] in die Betrachtungen mit ein, so erklärt sich der leichte Ablauf der $\pi 2s + \pi 4s$ -Addition. Die Zahlen 2 und 4 geben die Anzahl der an der Reaktion beteiligten π -Elektronen an. Wie im Korrelationsdiagramm gezeigt (s. Abbildung 2-19), gehen alle bindenden Orbitale der Edukte (Butadien + Ethen) in bindende Orbitale des Produkts (Cyclohexen) über, da die Orbitalsymmetrie erhalten bleibt ($A \rightarrow A$, $S \rightarrow S$). Die Reaktion ist gemäß den *Woodward-Hoffmann*-Regeln erlaubt.

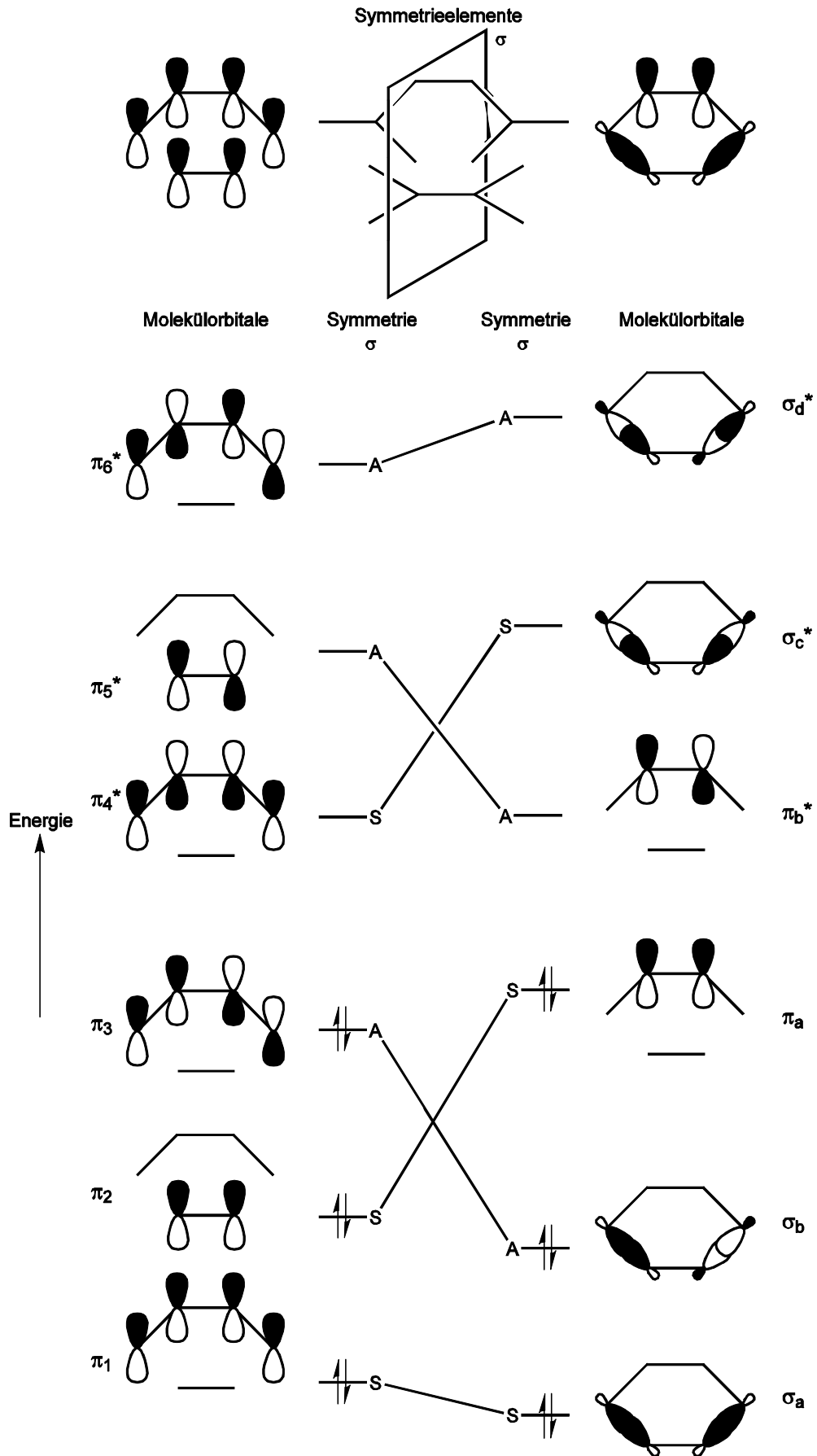


Abbildung 2-19: Korrelationsdiagramm der $\pi_2s + \pi_4s$ -Cycloaddition [Lowry 1980].

Von großer Bedeutung ist neben der *Diels-Alder*- auch die *Retro-Diels-Alder*-Reaktion [Kwart 1968]. Bei letzterer wandeln sich *Diels-Alder*-Addukte, beispielsweise durch Einwirkung höherer Temperaturen, wieder „rückwärts“ in ihre Ausgangskomponenten oder die sich daraus bildenden, „logischen“ Derivate um. Für die Zerlegung eines *Diels-Alder*-Addukts kommen allerdings auch andere Möglichkeiten in Frage [Kwart 1968]: reagieren Anthracen (Dien) und Acetylendicarbonsäure (Dienophil) zum *Diels-Alder*-Addukt, so lassen sich die beiden Carboxylgruppen im Addukt gut mit Phosphorpentachlorid (PCl_5) in das Dichlorid überführen. Letzteres geht auf thermischem Weg keine *Retro-Diels-Alder*-Reaktion ein. Lässt man es jedoch bei $190\text{ }^\circ\text{C}$ mit dem reaktionsfreudigen Dienophil Maleinsäureanhydrid reagieren, so setzt sich letzteres anstelle des Acetylendicarbonsäuredichlorids im ersten *Diels-Alder*-Produkt und bildet ein alternatives *Diels-Alder*-Produkt. Dabei wird das Acetylendicarbonsäuredichlorid frei und ist somit präparativ zugänglich. Auf diese Weise verhält sich die *Diels-Alder*-Reaktion wie eine Schutzgruppe [Klunder 1999]: Es erfolgt eine Derivatisierung der ursprünglichen Verbindung, um eine synthetische Operation an einer Komponente des *Diels-Alder*-Addukts ausführen zu können. Danach wird das vorher schwer zugängliche Derivat der Ursprungsverbindung durch eine passende und unter Umständen milde *Retro-Diels-Alder*-Reaktion freigesetzt.

Neben den beschriebenen „klassischen“ *Diels-Alder*-Reaktionen gibt es außerdem neue Aspekte in der aktuellen Literatur. So ist heute allgemein akzeptiert, dass die *Diels-Alder*-Reaktion auch eine wichtige biosynthetische Reaktion darstellen kann. Bemerkenswert erscheint auch, dass die Existenz eines Enzyms, der *Diels-Alderase*, diskutiert wird [Chen 2000].

2.4.2 Inverse *Diels-Alder*-Reaktion

Die inverse *Diels-Alder*-Reaktion [Sauer 1962] findet zwischen einem elektronenreichen Dienophil und einem elektronenarmen Dien statt, d.h. die elektronischen Verhältnisse sind gegenüber der normalen *Diels-Alder*-Reaktion umgekehrt. Erreicht wird dies durch passende Substitution der Reaktionspartner.

Beide Reaktionen, die klassische als auch die inverse, erfüllen die Voraussetzung für ein modernes synthetisches Konzept zur Verknüpfung von Molekülen, der sogenannten „Click-Chemie“ [Kolb 2001]. Reaktionen, welche in diese Kategorie fallen, zeichnen sich durch hohe Geschwindigkeit, fehlende Nebenreaktionen und billige Ausgangsmaterialien aus. Für die *Diels-Alder*-Reaktion lassen sich viele Click-Chemie-Exempel in der Literatur finden (z.B. [Bodwell 2001]). Als Beispiel für den Click-Chemie-Charakter der inversen *Diels-Alder*-Reaktion sei ein heterocyclisches Dien, ein Tetrazin (I), angeführt, das mit einem Alkendiophil (II) reagiert (s. Abbildung 2-20). Speziell bei diesem Beispiel eliminieren die primären *Diels-Alder*-Addukte Stickstoff, was zur Stabilisierung und Irreversibilität führt. Zudem verläuft die Reaktion schnell sowie quantitativ und ist für Reaktion an Oberflächen geeignet [Wiessler 2010].

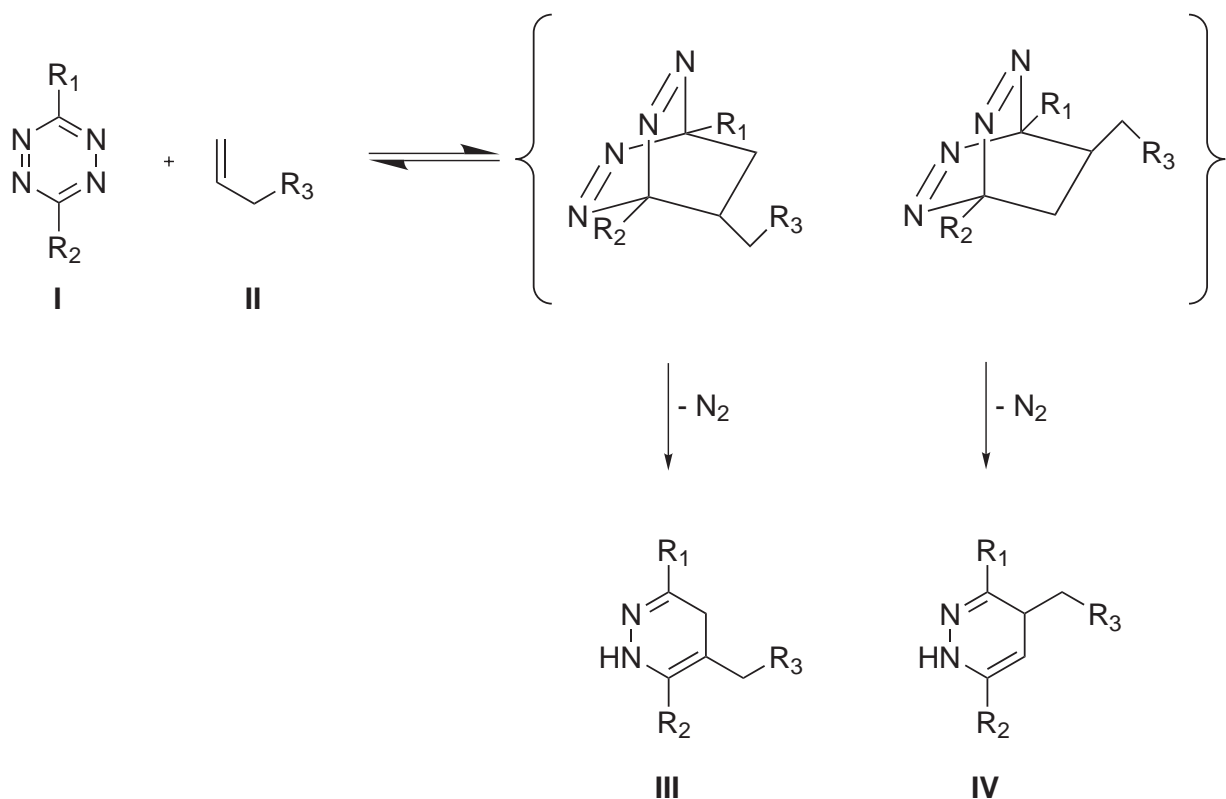


Abbildung 2-20: Beispiel einer inversen *Diels-Alder*-Reaktion.

Theoretisch betrachtet können bei der *Diels-Alder*-Reaktion die höchsten besetzten Molekülorbitale (HOMOs) des Diens mit dem niedrigsten, unbesetzten Molekülorbital (LUMO) des Dienophils wechselwirken (s. Abbildung 2-21), wenn beide energetisch

nicht zu weit auseinander liegen. Je ähnlicher die Orbitale in ihrer Energie sind, desto stärker fällt die Energieabsenkung, bezogen auf das tiefstliegende Molekülorbital, aus.

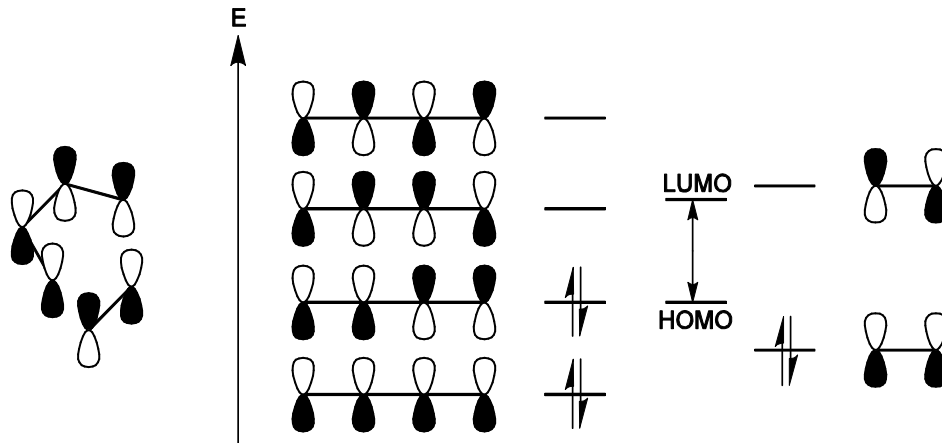


Abbildung 2-21: Molekülorbitale des Diens (Mitte) und Dienophils (rechts) sowie die Überlappung des HOMO des Diens mit dem LUMO des Dienophils (links).

In diesem Fall wird die Reaktion durch thermische Einwirkung möglich. Der aktivierende Effekt von elektronenziehenden Gruppen im Dienophil geht auf die energetische Absenkung des LUMO im Dienophil zurück.

Bei der inversen *Diels-Alder*-Reaktion sind die Verhältnisse umgekehrt: das LUMO des Diens überlappt mit dem HOMO des Dienophils (s. Abbildung 2-22).

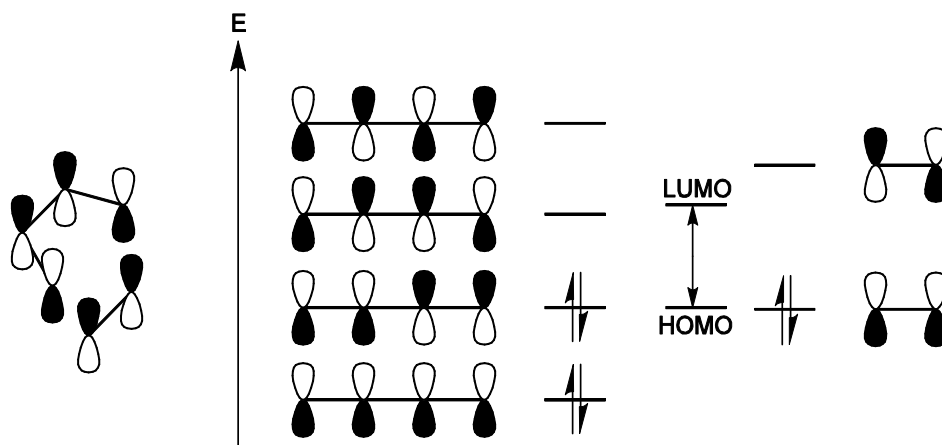


Abbildung 2-22: Molekülorbitale des Diens (Mitte) und Dienophils (rechts) sowie die Überlappung des HOMO des Diens mit dem LUMO des Dienophils (links).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass generell drei verschiedene Typen von *Diels-Alder*-Reaktionen unterschieden werden können, welche man als „normal“, „invers“ bzw. „neutral“ bezeichnet (s. Abbildung 2-23). Bei einer Reaktion mit normalem Elektronenbedarf ist die dominierende Orbitalwechselwirkung die des HOMO-Diens mit dem LUMO-Dienophil. Die Reaktion mit einem inversen Elektronenbedarf wird von der LUMO-Dien – HOMO-Dienophil-Wechselwirkung dominiert. Bei einer Reaktion mit inversem Elektronenbedarf dominiert keine Grenzorbitalwechselwirkung [Fringuelli 1990].

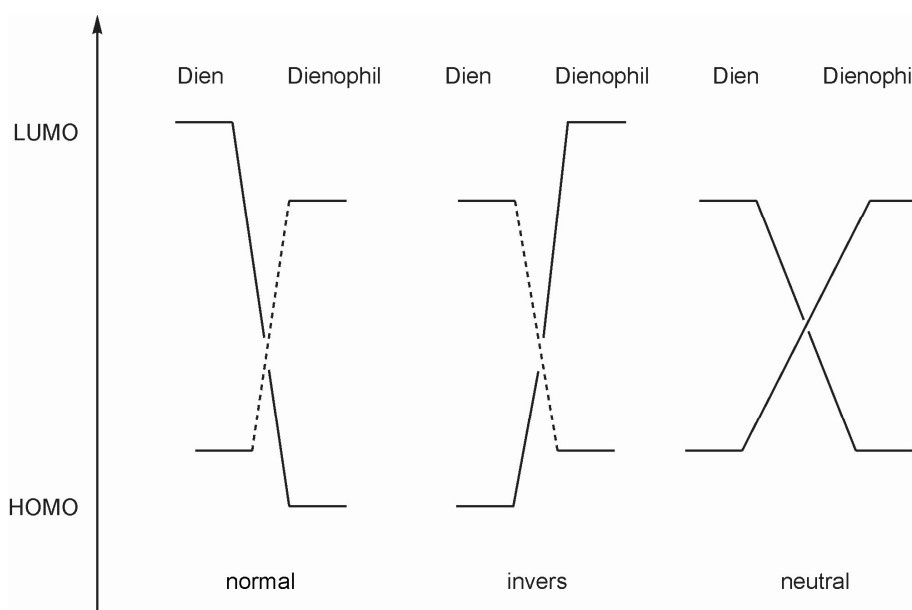


Abbildung 2-23: HOMO-LUMO-Orbitalwechselwirkungen der verschiedenen *Diels-Alder*-Reaktionstypen. Die gestrichelte Linie zeigt jeweils die dominierende Orbitalwechselwirkung.

3 MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden von den aufgelisteten Anbietern in *p.a.*-Qualität bezogen:

Acetonitril	Serva, Heidelberg, Deutschland
Aminoethanol	Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland
3-Aminopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES)	Fluka, Seelze, Deutschland
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bernsteinsäureanhydrid	Fluka, Seelze, Deutschland
Betain Monohydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Chloroform	Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland
Cysteamin	Fluka, Seelze, Deutschland
DEAE Sepharose Fast Flow	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
1,2-Dichlorethan	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dichlormethan	Fluka, Seelze, Deutschland
Diethylether	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dihexadecyldimethylammonium- bromid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
N,N-Diisopropylethylamin	Fluka, Seelze, Deutschland
N,N-Dimethylformamid	SDS, Peypin, Frankreich
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Di-(N,N'-succinimidyl)-carbonat (DSC)	Fluka, Seelze, Deutschland
Dioxan	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DNA, niedermolekular, aus Lachs- sperma	Fluka, Seelze, Deutschland
Eisessig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäureanhydrid	Fluka, Seelze, Deutschland
Ethanol (absolut)	Fluka, Seelze, Deutschland
Ethylendiamin	Fluka, Seelze, Deutschland
n-Hexan	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinylethan-	
sulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hydrazin Hydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
N-Lauroylsarcosin (Na-Salz), 30 %	Serva, Heidelberg, Deutschland
Leinöl	Schmincke, Erkrath, Deutschland
Magnesiumdichlorid-Hexahydrat	Fluka, Seelze, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
N-Methyl-2-pyrrolidon	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
3-Mercaptopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
3-Mercaptopropionsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Fluka, Seelze, Deutschland
Natriumhydroxid	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Gerbu Biotechnik, Gaiberg, Deutschland
Nujol	Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland
PBS-Tabletten	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
1-Propanthiol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure	Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland
Tetrahydrofuran (THF)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Triethylamin	Fluka, Seelze, Deutschland
Trifluoressigsäure (TFA)	Fluka, Seelze, Deutschland
Triisopropylsilan	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trinatriumcitrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trinatriumphosphat-Dodecahydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
TrisHCl	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Triton X-100	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

3.1.1 Puffer

Bindungspuffer A (AB):	20 mM TrisHCl 50 mM KCl 5 mM MgCl ₂ *6H ₂ O
Bindungspuffer B (BB):	10 mM Essigsäure 0,005 % Triton X-100
Carbonatpuffer:	16,8 g NaHCO ₃ mit deionisiertem Wasser auf einen Liter auffüllen (0,2 M, pH=8,6)
Eluierungspuffer:	1,5 M NaCl 50 mM TrisHCl (pH=8) 0,005 % Triton X-100
HEPES-Puffer:	2,38 g HEPES mit deionisiertem Wasser auf 100 ml auffüllen und mit 10 % NaOH auf pH=8,0 einstellen (0,1 M)
PBS-Puffer:	1 Tablette mit deionisiertem Wasser auf 200 ml auffüllen (0,01 M, pH=7,4)
20x SSC-Puffer:	153,6 g NaCl 77,3 g Trinatriumcitrat mit deionisiertem Wasser auf einen Liter auffüllen (0,3 M)
1x SSarc-Puffer:	200 ml 20x SSC 240 ml Natriumlauroylsarcosinat (30 %) 560 ml deionisiertes Wasser (0,06 M)

3.2 Materialien

Chromabond-Leersäule, 1 ml, inkl. zwei PE-Filter	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Chromabond-Adapter PP-Säulen	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Deckgläser (22x22 mm ²)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Einmalskalpell	Feather, Osaka, Japan
Eppendorfgefäße (0,5 ml/1,5 ml/2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Falcongefäße (15 ml/50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FAST <i>Slides</i>	Whatman Inc., Clifton, USA
<i>Gene frames</i> (65 µl) mit <i>Coverslips</i>	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Glaswolle	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hybridisierungskammern	TeleChem Inc., Sunnyvale, USA
<i>Kimwipes lite</i> Präzisionstücher	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Klebefolien für 384- <i>well</i> Platten	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland
Objektträger	Menzel, Braunschweig, Deutschland
PEPperSlide	PEPperPRINT, Heidelberg, Deutschland
<i>Polyfiltronics</i> , 384- <i>well</i> Platten	Whatman Inc., Clifton, USA
<i>Sensoplate</i> , 384- <i>well</i>	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
<i>Spotting-Pins</i> (SMP3B)	TeleChem Inc., Sunnyvale, USA
Spritze (2 ml/5 ml/10 ml) mit Luer-Ansatz	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
UV-Küvette (Quarz)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
UVette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

3.3 Oligonukleotide

3.3.1 Eingesetzte DNA-Oligomere

Die verwendeten DNA-Sequenzen mit den gegebenenfalls eingeführten Modifikationen wurden von biomers.net GmbH (Ulm, Deutschland) bezogen. Tabelle 3-1 listet diese auf.

Tabelle 3-1: In der Arbeit verwendete, kommerziell erhältliche, modifizierte und unmodifizierte DNA-Oligonukleotide.

Name	Sequenz	Länge	Modifikation
L1	GCT CCA GCA	9	-
MB_ATTO655	CCC TCT GGT CCA ACG TGA ATT GAG GG	26	5': Atto 655
MB_DABCYL	CCC TCT GGT CCA ACG TGA ATT GAG GG	26	5': Atto 655 3': DABCYL
T1_DNA	TTC ACG TTG GAC	12	-
T2_DNA	TGG ACC AGA GGG	12	-
T3_DNA	CCC TCA ATT CAC	12	-
Anti_T1	GTC CAA CGT GAA	12	-
ZS3_Cy5	TTT TTT TTT TTT TTT CCC CGC CCC	24	5': Cy5
A15_Cy5	AAA AAA AAA AAA AAA	15	5': Cy5

3.3.2 PNA-Synthese

Im Gegensatz zu DNA-Molekülen depurinieren PNA-Oligomere unter sauren Bedingungen nicht. Dies sowie die Tatsache, dass die PNA-Monomere über Peptidbindungen verknüpft sind, ermöglicht die PNA-Synthese anhand ursprünglich für Peptide entwickelter Festphasenmethoden. Zu den gängigen Verfahren zählt die klassische *Merrifield*-Strategie, bei welcher die säurelabile *tert*-Butyloxycarbonyl-Gruppe (Boc) [Merrifield 1963] als Schutzgruppe des N-Terminus der PNA-Monomere fungiert. Als zweite Methode hat sich eine an die Fmoc/*t*Bu-Strategie der Peptidchemie angelehnte Vorgehensweise etabliert [Fields 1990]. Während der Synthese wird der N-Terminus mit der basenlabilen 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Gruppe (Fmoc) geschützt [Thomson 1995]. Diese milde Methode der PNA-Synthese stellt im Vergleich zur Boc-Strategie geringere Anforderungen an die Materialien. Darüber hinaus eignet sich die Fmoc-Chemie zur direkten Bestimmung der Kopplungsausbeuten während der Synthese durch Messung der Absorption des Abspaltungsproduktes Dibenzofulven-Piperidin bei 301 nm [Fields 1990]. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten PNA-Oligomere wurden abteilungsintern nach dem Fmoc-Verfahren synthetisiert. Detaillierte Vorschriften diesbezüglich finden sich in [Brandt 2004; Dauber 2006].

Zur besseren Unterscheidung dienen Großbuchstaben zur Bezeichnung von DNA-Sequenzen, wohingegen Kleinbuchstaben die PNA-Basenabfolgen angeben.

3.3.3 Verwendete PNA-Oligomere

Tabelle 3-2 zeigt die in der Arbeit verwendeten PNAs.

Tabelle 3-2: Name, Sequenzen, Länge sowie Modifikationen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten PNA-Sequenzen.

Name	Sequenz N → C	Länge	Modifikationen
T1_PNA	ttc acg ttg gac	12	-
T2_PNA	tgg acc aga ggg	12	-
T3_PNA	ccc tca att cac	12	-
T4_PNA	ccc tca att cac gtt	15	-
T5_PNA	ccc tca att cac gtt gga cc	20	-
F-T3-F	ccc tca att cac	12	N: 1x Phenylalanin C: 1x Phenylalanin
F3-T3-F3	ccc tca att cac	12	N: 3x Phenylalanin C: 3x Phenylalanin
ZS4_PNA_Cy5	cgc cgc cgc	9	N: Cy5
PEGMA_PNA1	cgt agg acg tat gcg	15	-
PEGMA_PNA2	ggg atg aac agt tac	15	-
PEGMA_PNA3	gct tgc cag ttt caa	15	-
Anti_PEGMA_PNA1	ttt ttt ttt tcg cat acg tcc tac g	25	-
Anti_PEGMA_PNA2	ttt ttt ttt tgt aac tgt tca tcc c	25	-
Anti_PEGMA_PNA3	ttt ttt ttt ttt gaa act ggc aag c	25	-

3.4 Geräte

3.4.1 *Thermocycler*

Für Hybridisierungen unter Durchfahren eines Temperaturgradienten kommt der *Thermocycler* PTC-200 (MJ Research, Waltham, USA) mit einem speziellen Aufsatz für Objektträger zum Einsatz. Nach einer Stunde bei 45 °C, sinkt die Temperatur im Anschluss mit einem Gradienten von 1 °C/30 min bis auf 4 °C ab.

3.4.2 UV/Vis-Spektrophotometer

Das UV/Vis-Spektrophotometer Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Cambridge, England) misst Standardabsorptionen, Konzentrationen sowie Transmissionen und besitzt Algorithmen für die automatische DNA-, RNA- und Oligonukleotid-quantifizierung. Neben der Bestimmung des Reinheitsgrades können auch Proteinkontaminationen in Nukleinsäurelösungen ermittelt werden. Die Funktionsweise basiert auf Licht, welches, erzeugt von einer Deuterium- bzw. Wolframlampe (je nach Wellenlänge), mithilfe eines motorisierten Spiegels durch die Monochromator-einlassblende geleitet wird. Es trifft im Anschluss, abhängig von der ausgewählten Wellenlänge, auf einen entsprechenden Filter. Das Licht durchquert anschließend ein holographisches Beugungsgitter, welches die gewünschte Wellenlänge isoliert. Die Strahlung verlässt nun den Monochromator über eine Auslassblende, worauf es durch Spiegel fokussiert und in die Probenkammer geleitet wird. Nach Passage der Messküvette gelangt es über eine defokussierende Linse auf die Detektoreinheit. Das resultierende Signal wird verstärkt und angezeigt. Für die vorliegende Arbeit fanden Absorptionsmessungen zur Konzentrationsbestimmung von DNA und PNA bei 260 nm statt.

3.4.3 NanoDrop

Der *NanoDrop* ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, USA) ermittelt Absorptionen von DNA, RNA, Proteinen sowie Farbstoffen in einem Volumen von 1 μl im Bereich von 220 – 750 nm und zeichnet sich durch hohe Präzision aus. Die patentierte Probenretentionstechnologie nutzt die Oberflächenspannung, um die Probe an Ort und Stelle zu halten. Der Probentropfen wird dabei zwischen Sockel und Probenarm aufgespannt, was einen definierten Weg von 1 mm generiert (s. Abbildung 3-1).

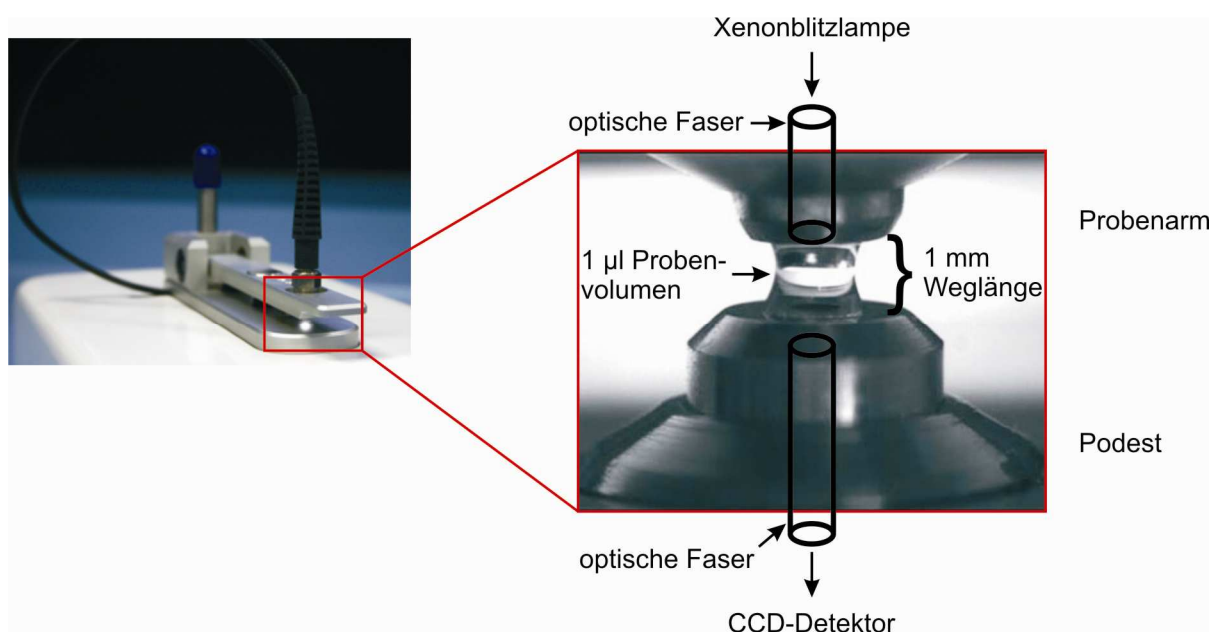


Abbildung 3-1: Darstellung eines *NanoDrop* ND-1000. **Links:** Ansicht des Gerätes von vorne [www5].

Rechts: Gerät im Detail mit aufgespanntem Tropfen zwischen Probenarm und Podest [www6].

Die Aufnahme des Spektrums gewährleisten zwei optischen Fasern im Sockel (CCD-Detektor) und im Probenarm (Xenonblitzlampe). Aufgrund dessen besteht keine Notwendigkeit des Einsatzes von Küvetten bzw. anderen probenenthaltenden Behältnissen, wie z.B. Kapillaren. Die anschließende Reinigung erfolgt im Sekundenbereich. Darüber hinaus besitzt der *NanoDrop* ND-1000 die Fähigkeit zur Messung hoher Probenkonzentrationen ohne Verdünnungen. Diese können um einen Faktor 50 höher konzentriert sein als herkömmliche, mit einem Standardküvettenspektrophotometer aufgenommene Proben.

Die Messzeit pro Probe beträgt ungefähr zehn Sekunden, wobei ein großer Konzentrationsbereich abgedeckt wird. Letzterer beträgt beispielsweise für doppelsträngige DNA 2 - 3700 ng/μl, für einsträngige DNA ≤ 2400 ng/μl oder 0,10 - 100 mg/ml für Proteine. Die Messungen laufen parallel bei verschiedenen Wellenlängen ab, so werden beispielsweise für DNA- oder RNA-Proben die Absorptionen bei 230, 260 und 280 nm aufgenommen. Konzentrationen Absorptionswerte und -verhältnisse von 230/260 sowie 260/280 zur Beurteilung des Reinheitsgrades berechnet die NanoDrop ND-1000 Software und listet sie anschließend in einer Tabelle auf.

3.4.4 Aufreinigung lipophilisierter DNA

Zum Aufreinigen kleiner DNA-Mengen fanden sogenannte Chromabond-Säulchen Verwendung. Die von Macherey-Nagel bezogenen Leersäulchen beinhalten zunächst nur eine Fritte. Das Packen geschieht mit 1 ml DEAD-Sepharose-suspension, welche später als Trennmedium fungiert. Danach drückt man eine lose Fritte vorsichtig auf die Flüssigkeit, sodass die Füllhöhe inklusive beider Fritten ca. 1,4 cm beträgt. Über einen Chromabond-Adapter erfolgt das Waschen mittels einer 2 ml-Spritze zunächst mit 20 ml Wasser und im Anschluss mit 12 ml Bindungspuffer (BB). Nach Umstellung auf das zu applizierende Solvens kann die zu reinigende DNA-Lösung aufgetragen werden.

3.4.5 *Typhoon*

Der *Typhoon* 9400 Variable Mode Imager (GE Healthcare, München) eignet sich zur Aufnahme fluoreszierender, chemilumineszierender oder phosphoreszierender Proben. Bei der vorliegenden Arbeit kam das Gerät zum Vermessen fluoreszierender Probenlösungen in 384-well Platten (*Sensoplate*, 384-well, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) zum Einsatz. Für jede Messung konnten Emissionsfilter, PMT-Spannung, Laser, Sensitivität sowie Scanbereich individuell eingestellt werden.

3.4.6 MALDI-Massenspektrometrie

Die matrixunterstützte Laserdesorptionsionisierung (***Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation***, Reflex II, Bruker, Darmstadt) dient u.a. der massenspektroskopischen Analyse von Proben hohen Molekulargewichts wie Proteinen, Nukleinsäuren oder anderen Polymeren. Die erhaltenen Spektren bieten eine Möglichkeit zur Kontrolle von *Diels-Alder*-Umsetzungen sowie zur Qualitätsanalyse der synthetisierten PNA-Oligomere.

3.5 Derivatisierung von Oberflächen

3.5.1 Silanisierung von Glasoberflächen

Als *Microarray*-Oberflächen kommen modifizierte Glasoberflächen zum Einsatz. Zunächst erfolgt die Anätzung der unbehandelten Objektträger mit 10 %iger Natronlauge für eine Stunde bei Raumtemperatur. Diesen Vorgang setzt man weitere 15 min im Ultraschallbad fort. Danach wird bis zur Neutralität mit Wasser, anschließend einmal mit Ethanol gewaschen und schließlich im Stickstoffstrom getrocknet. Im darauffolgenden Schritt inkubiert man die Objektträger für eine Stunde bei Raumtemperatur mit der Silanisierungslösung, bestehend aus 25 ml 3-**Aminopropyltriethoxysilan** (APTES) und 500 ml 95 %igem Ethanol (Abbildung 3-2). Die gleiche Lösung erfährt nun eine 15-minütige Ultraschallbehandlung. Nach je zwei Waschschritten in Wasser und Ethanol trocknet man die Oberflächen im Stickstoffstrom und sintert sie im Anschluss 20 min bei 110 °C. Bis zur weiteren Verwendung erfolgt die Aufbewahrung der silanisierten Glasobjektträger bei 4 °C.

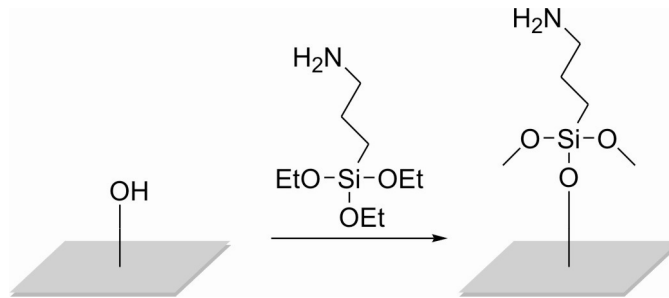


Abbildung 3-2: Silanisierung von Glasoberflächen (grau) mit 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES).

3.5.2 Aktivierung von Oberflächen mittels Di-(N,N'-succinimidyl)-carbonat (DSC)

Direkt vor dem Auftragen (*Spotting*) aktiviert man die silanisierten Oberflächen, indem sie für zwei Stunden bei Raumtemperatur in einer Lösung aus 3,4 g Di-(N,N'-succinimidyl)-carbonat und 6,7 ml N,N-Diisopropylethylamin in 200 ml getrocknetem DMF inkubiert werden (s. Abbildung 3-3). Das vorliegende DSC löst sich erst bei fünfminütiger Ultraschallbehandlung. Nach der Aktivierung folgen mehrere Waschschritte der Oberflächen: dreimal mit DMF sowie zweimal mit wasserfreiem Aceton. Die Objektträger sind nach dem Trocknen im Stickstoffstrom für das Auftragen von DNA- oder PNA-Molekülen vorbereitet.

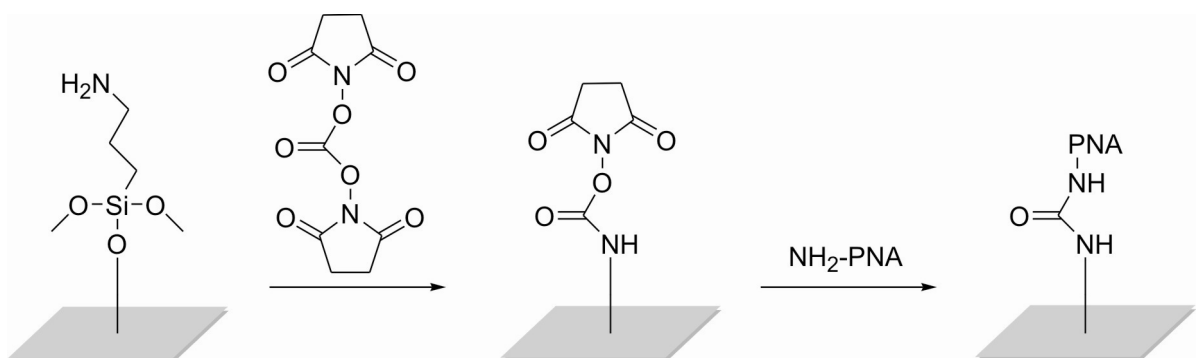


Abbildung 3-3: Aktivierung der silanisierten Oberflächen mit DSC und anschließende Umsetzung mit der freien Aminogruppen von PNA-Molekülen.

3.6 Auftragen der DNA- oder PNA-Oligomere (*Spotting*) auf silanisierte Objektträger

Zum Aufbringen der DNA- bzw. PNA-Moleküle auf aktivierte Glasoberflächen wird ein Roboter, der SDDC-2 *Micro-Arrayer* (ESI, Eurogentec, Brüssel, Belgien), verwendet (Abbildung 3-4, links).

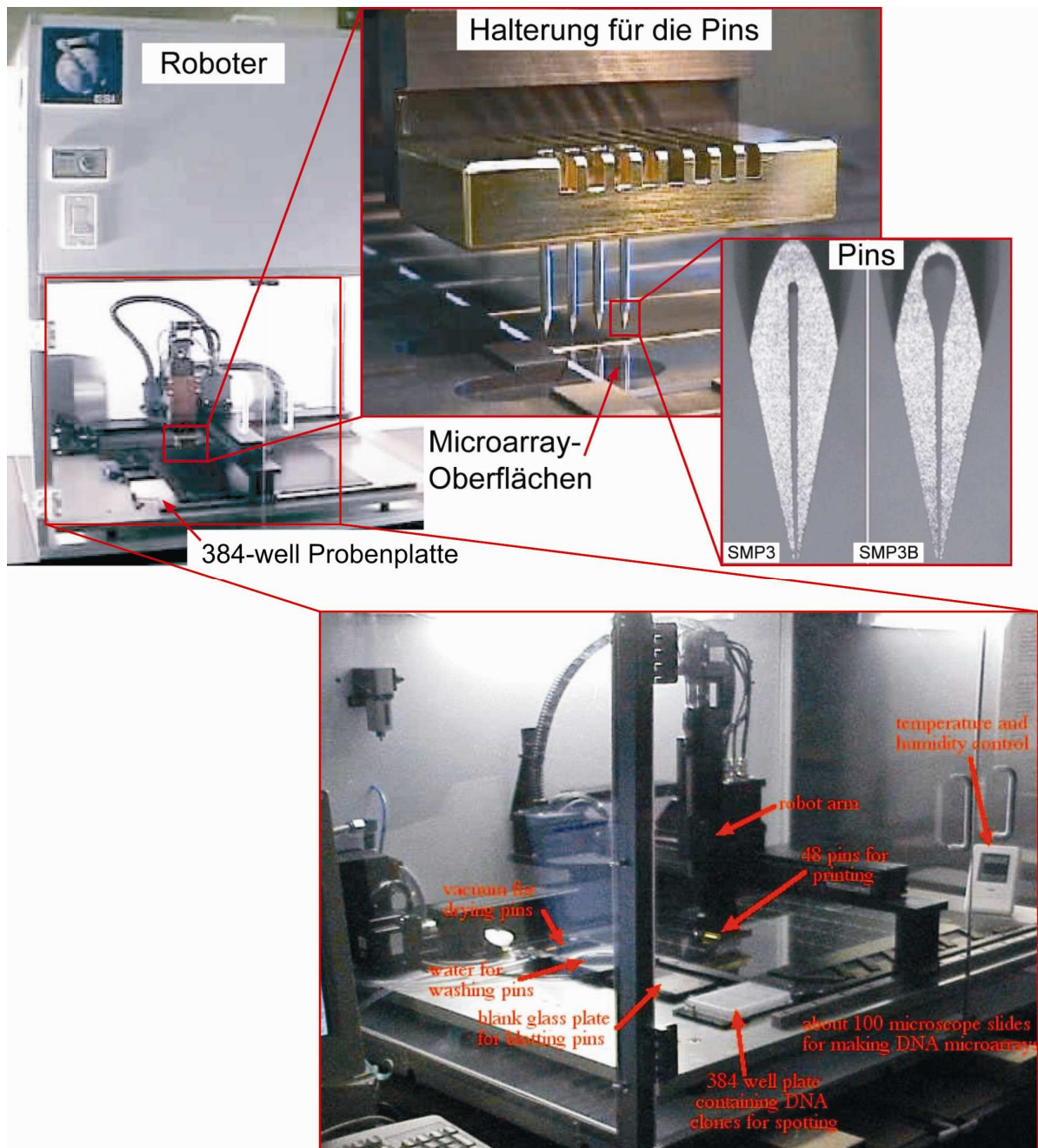


Abbildung 3-4: ESI-Roboter zum Aufbringen von DNA- bzw. PNA-Molekülen auf aktivierte Oberflächen. **Rechts oben:** Vergrößerter Ausschnitt, Darstellung zweier unterschiedlicher *Pin*-Typen (SMP3 und SMP3B) [Brandt 2004].

Nach Verdünnung der DNA-/PNA-Oligomere auf eine Endkonzentration von 50 bzw. 200 μM , überführt man ein Volumen von 20 μl in eine 384-well Mikrotiterplatte. Aus dieser erfolgt die Aufnahme der Oligomerlösung mittels einer robotergesteuerten, speziell geschlitzten Nadel, einem sogenannten SMP3B-Pin. Letzterer besitzt aufgrund einer Ausbuchtung ein größeres Reservoir (Abbildung 3-4, Mitte und rechts) und kann somit ein größeres Volumen (0,60 μl) als beispielsweise ein SMP3-Pin (0,25 μl) aufnehmen. Das auf den Objektträger in Form eines kleinen Tropfens abgegebene Volumen beträgt bei einem SMP3B-Pin 0,9 nl (SMP3-Pin 0,7 nl). Der Abstand der Tröpfchen umfasst von einem Mittelpunkt zum nächsten 240 μm . Die Luftfeuchtigkeit im *Spotter* wird bei ca. 50 % und die Temperatur zwischen 21 – 25 °C gehalten.

Für das *Spotting* auf DSC-aktivierten Glasoberflächen verwendet man nicht aufgereinigte PNAs. Die selektive Anbindung auf dem Objektträger erfolgt über die Aminogruppe des Vollängenproduktes [Brandt 2003]. Die käuflich erworbene DNA besitzt eine Konzentration von 100 μM . Die DNA- und die PNA-Lösungen werden im Verhältnis 1:1 mit 2 M Betain (pH-Wert 7,5) verdünnt. Dieser Zusatz gewährleistet eine verlangsamte Evaporation des Wassers sowohl aus den 384-well Mikrotiterplatten, als auch aus den auf die Oberfläche gespotteten Tröpfchen [Diehl 2002]. Das verzögerte Verdampfen des Wassers wirkt sich neben der gleichbleibenden Konzentration der Lösungen in der Platte auch positiv auf die Anbindung der DNA- bzw. PNA-Moleküle auf dem Objektträger aus. Nach dem Spotten inkubiert man die Oberflächen über Nacht im Brutraum (37 °C). Die Deaktivierung erfolgt am nächsten Tag zwei Stunden bei Raumtemperatur in einer Lösung, bestehend aus 2,0 g Bernsteinsäureanhydrid und 5,0 ml N-Methylimidazol in 400 ml Dichlorethan (s. Abbildung 3-5). Anschließend reinigt man die Objektträger dreimal mit Dichlorethan und trocknet im Stickstoffstrom. Darauf folgen mehrere Waschschriffe der Oberflächen: Zuerst zweimal mit einer Lösung aus 50 mM Trinatriumphosphat und 0,1 % SDS bei 90 °C, danach zehn Minuten mit 90 °C heißem Wasser, nachfolgend zweimal mit Wasser, einmal mit 1 M NaCl-Lösung in 0,1 % wässriger Trifluoressigsäure (für PNA) bzw. 1 M NH_4Cl -Lösung in 0,1 % wässriger Trifluoressigsäure (für DNA) und abschließend noch zweimal mit Wasser. Nach dem Trocknen im Stickstoffstrom werden die Objektträger bis zum Hybridisieren bei 4 °C aufbewahrt.

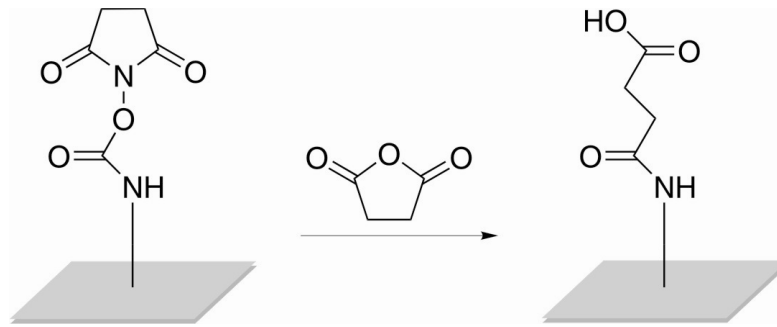


Abbildung 3-5: Deaktivierung mit Bernsteinsäureanhydrid derjenigen Bereiche, auf welche keine Proben aufgetragen wurden.

Das verwendete *Spotting*-Schema, d.h. die Abfolge der auf der Oberfläche aufbrachten Sequenzen, ist bei allen in einer Charge hergestellten Biochips identisch. Es setzt sich beispielsweise aus 15 verschiedenen *Spots* zusammen, wobei jede Sequenz zehnmal hintereinander gespottet wird. Zur Kontrolle wird am Anfang und Ende ein Cy3-gelabeltes DNA-Oligomer in einer bzw. zwei Reihen gespottet. So erkennt man die Orientierung des Objektträgers und kann aufgrund dessen nach der Hybridisierung beim Scannen eine Positionsbestimmung vornehmen (s. Abbildung 3-6).

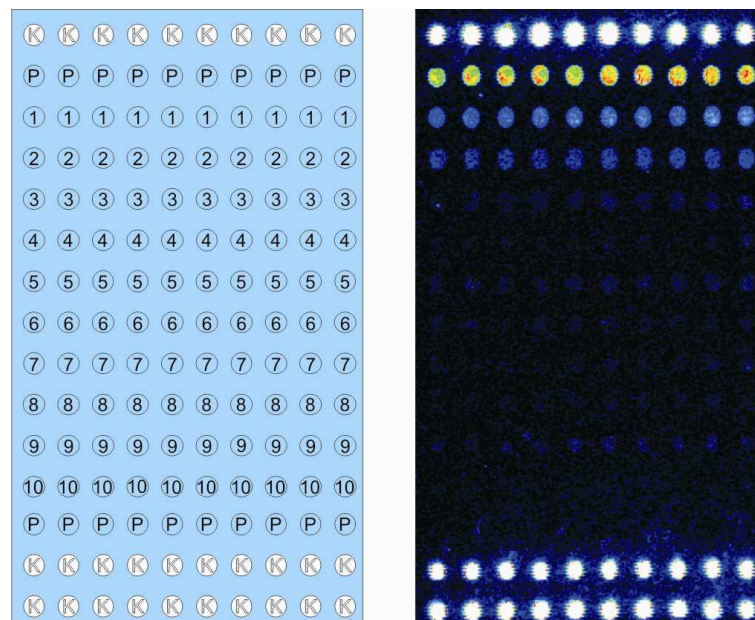


Abbildung 3-6: **Links:** Beispiel eines *Spot*-Schemas auf einem Objektträger. K: Positionskontrolle; P: Puffer; 1-10: unterschiedliche Sequenzen. **Rechts:** Gescannte Oberfläche mit Cy3-markierten Positionskontrollen.

3.7 Auftragen (*Spotting*) der PNA-Oligomere auf PEGMA-Oberflächen

Stadler entwickelte am Deutschen Krebsforschungszentrum sogenannte PEGMA (**P**olyethylenglykol**M**ethacrylat)-funktionalisierte Glasoberflächen, welche freie Aminogruppen tragen (s. Abbildung 3-7) [Beyer 2006]. Die PEGMA-Schicht weist eine Dicke zwischen 100 und 150 nm auf und verhindert effektiv die unspezifische Adsorption aller Arten von Biomolekülen auch ohne Zusatz weiterer Passivierungsmittel, wie beispielsweise BSA (**b**ovine **s**erum **a**lbumin – Rinderserumalbumin) oder Milchpulver. Derartige Oberflächeneigenschaften sind insbesondere bei Arbeiten mit PNA essentiell, da sie unspezifische Anlagerungen der stark adsorbierenden Moleküle unterbinden und somit die Empfindlichkeit des Nachweissystems aufgrund eines signifikant reduzierten Hintergrundsignals erheblich steigern.

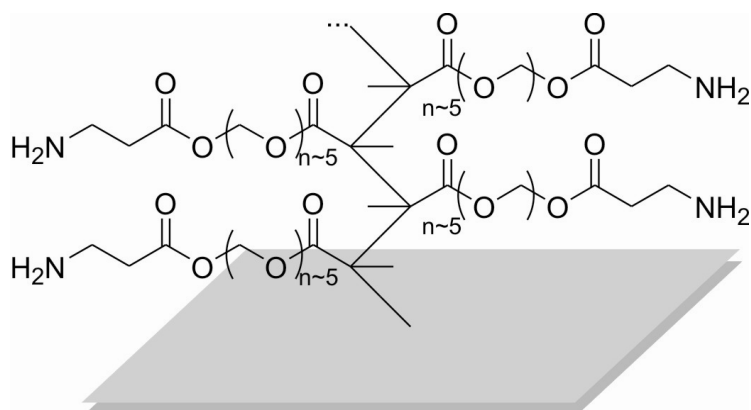


Abbildung 3-7: Strukturelle Darstellung einer PEGMA-Oberfläche.

Der *Nano-Plotter 2* (GeSiM – **G**esellschaft für **S**ilizium-**M**ikrosysteme mbH, Großerkmannsdorf, Deutschland) erlaubt das Aufbringen von Lösungen durch kontaktfreie Abgabe der Proben über piezogesteuerte Mikronadeln (s. Abbildung 3-8). Im Vergleich zu herkömmlichen Kontakt-*Spottern* bietet diese Art der *Microarray*-Generierung eine höhere *Spot*-Reproduzierbarkeit aufgrund der aktiven Abgabe der Lösung sowie uneingeschränkte Freiheit hinsichtlich der Layoutgestaltung des Chips. Die eingebauten Nadeln (*Nano-Tips*) geben pro Tropfen ein Volumen von ca. 350 pl ab. Durch Variation der Tropfenanzahl ist somit neben dem *Spot*-Durchmesser auch die abgegebene Menge der Oligomere exakt einzustellen.

Für die PEGMA-Oberflächen wurden aus Kostengründen pro Chip drei identische Felder, sogenannte Grids, im Abstand von 16 mm aufgebracht. Die zu spottenden Lösungen bestanden jeweils aus einer PNA-Sequenz in Carbonatpuffer (0,2 M) : Betain (2 M, pH=7,5) im Verhältnis 1:1. Im Anschluss an eine halbstündige Inkubationszeit erfolgte eine Deaktivierung über 15 min in Carbonatpuffer (0,2 M) mit 5 % Aminoethanol. Nach abschließendem, zweimaligem Waschen mit Wasser lagerten die Glasobjektträger bis zur weiteren Verwendung unter Stickstoff bei 4 °C.

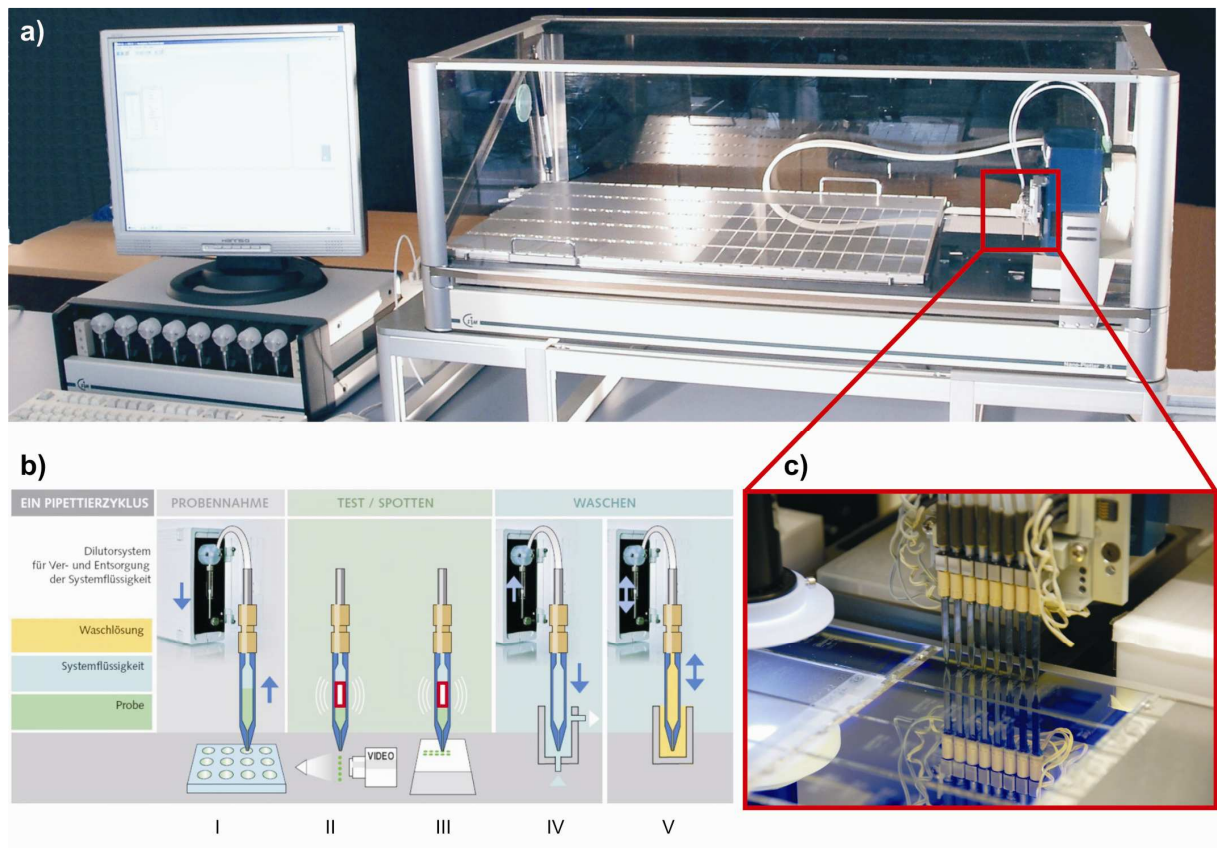


Abbildung 3-8: a) Foto des *Nano-Plotter 2* [www8]; b) schematischer Ablauf eines *Spotting*- bzw. Pipettierzyklus [www9]. Hierbei zeigt I die Probenaufnahme, II die Prüfung der Dosierparameter und den Funktionstest, III das eigentliche *Spotting*, IV das Entleeren/ Waschen und V das optionale Waschen mit zusätzlicher Waschlösung, c) Nahaufnahme der acht Nadeln (*Nano-Tips*).

3.8 Hybridisierung der *Microarrays* mit komplementären Sequenzen

Die Anbindung der komplementären Gegensequenzen an die auf die Oberflächen gespotteten DNA-/PNA-Polymere geht unter definierter Temperatur und Luftfeuchte vonstatten. Temperaturabhängig stehen zwei verschiedene Hybridisierungskammer-typen zur Verfügung. Bei 4 °C, Raumtemperatur bzw. 37 °C verwendet man verschließbare Plastikboxen, wohingegen Hybridisierungen bei davon abweichenden Temperaturen in speziellen Kassetten erfolgen (s. Abbildung 3-9). Können Inkubationen nicht in temperierten Räumen (Kältelabor, Brutraum) durchgeführt werden, ist ein Wasserbad mit der gewünschten Temperatur einzusetzen. Voraussetzung für eine erfolgreiche Hybridisierung ist ein wasserundurchlässiger Verschluss der Kassetten. Um trotzdem eine konstante Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten, pipettiert man in die beiden kleinen Vertiefungen der Kammer (s. Abb. 3-9, oben und unten) je 50 µl des verwendeten Hybridisierungspuffers. Bei der verschließbaren Kunststoffbox wird der mit *Whatman*-Papier (Whatman International Ltd., Maidstone, England) ausgelegte Boden mit bidestilliertem Wasser befeuchtet. Die eigentliche Hybridisierung erfolgt auf den gespotteten Objektträgern. Auf den entsprechenden Bereich werden zwischen 50 und 100 µl Lösung der komplementären Gegensequenz aufgebracht, mit einem Deckgläschen fixiert und im Dunkeln unter den entsprechenden Bedingungen zur Reaktion gebracht. Nach der Inkubationszeit wäscht man die Oberflächen und trocknet sie anschließend im Stickstoffstrom.

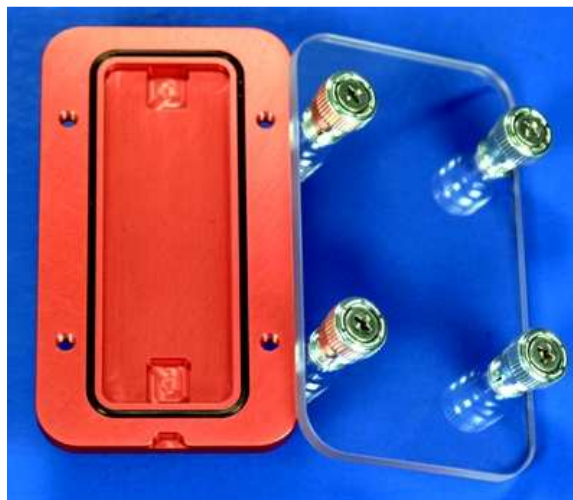


Abbildung 3-9: Hybridisierungskammer.

3.9 *Microarray-Scanner*

Die Aufnahme fluoreszenzmarkierter Biochips erfolgt mittels Fluoreszenzscannern, einem *ScanArray* 4000xl bzw. einem *ScanArray* 5000 (Packard, Billerica, USA). Deren Grundlage bilden konfokale Lasermikroskope mit einem x-y-z-Rastertisch für *Microarrays*. Neben höchster Bild- und Datenqualität liegt der entscheidende Vorteil im Bereich der Chiptechnologie darin, dass Faktoren reduziert werden, welche die Ergebnisse maßgeblich negativ beeinflussen. Die geringe *Spot*-Größe (Durchmesser $< 10 \mu\text{m}$) ermöglicht den Einsatz konfokaler Scanner zur Begrenzung des Fokus. Daraus ergibt sich die Eliminierung von Staubpartikeln (z.B. Textilfasern/ Hautpartikel) bzw. Verunreinigungen der Chipoberfläche, die Unterdrückung der Substrat- oder Glasfluoreszenz sowie der Fluoreszenz weiterer optischer Komponenten des Scanners. In der Summe führt dies zur Verringerung des unerwünschten Hintergrundsignals.

In einem konfokalen Scanner wird das Anregungslicht auf das Substrat und das Emissionslicht auf die Lochblende (*pinhole*) fokussiert. Letztere befindet sich vor dem Detektor, begrenzt die Fokustiefe des Gerätes und blockt das Licht außerhalb der Fokusebene. Auf diese Weise entsteht Konfokalität, d.h. Messung nur in einer Ebene. Abbildung 3-10 zeigt den Verlauf des Laserstrahls vom Eintritt in das System bis hin zur Reflektion des Lichts am Strahlteiler. Unter einem Strahlteiler versteht man eine optische Komponente, die kurzwelliges Licht reflektiert, für längerwelliges jedoch durchlässig ist. Der Anregungsstrahl passiert das nachfolgende Objektiv und gelangt fokussiert auf das zu untersuchende Objekt. Gleichzeitig bündelt das Objektiv aber auch das resultierende Emissionslicht und leitet es in entgegengesetzter Richtung zum Detektor. Vom Chip reflektiertes Laserlicht wird hierbei mittels Strahlteiler vom Fluoreszenzlicht getrennt. Dieses gelangt via Emissionsfilter zu einer Detektorlinse, welche den parallelen Strahl auf die Lochblende bündelt. Der im Analysesystem aus einem Sekundärelektronenvervielfacher (**Photomultiplier**, PMT) bestehende Detektor registriert das durch die Lochblende tretende Licht und wandelt es in ein elektrisches Signal um.

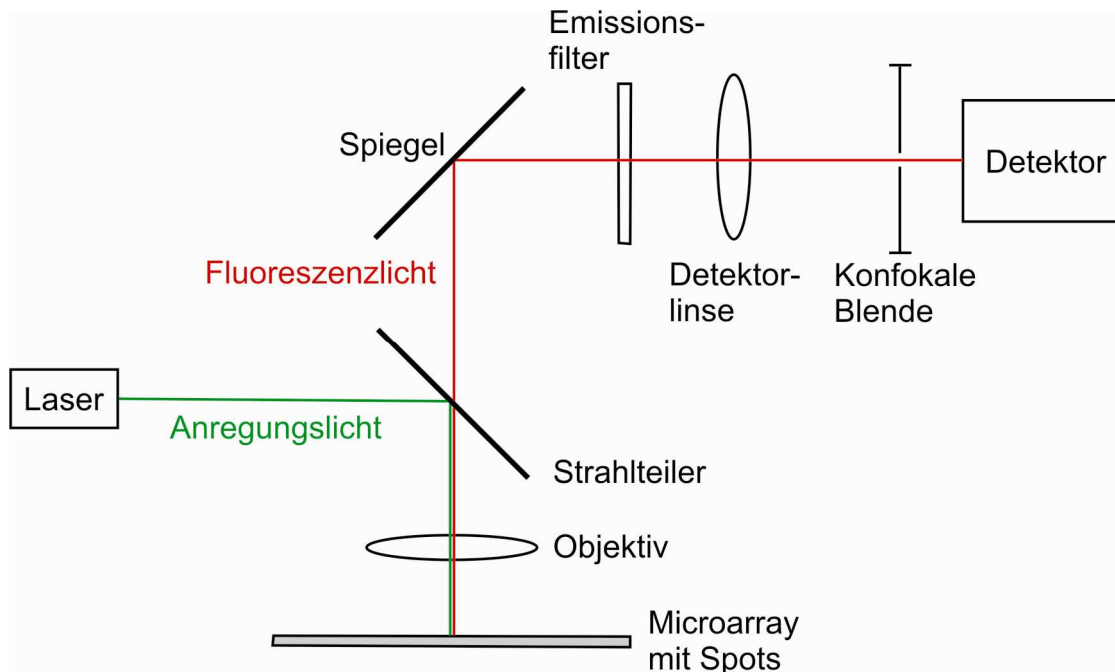


Abbildung 3-10: Aufbau eines konfokalen Lasermikroskops in Fluoreszenzscannern.

Zur Vermessung der *Microarrays* wird zunächst der rote Kanal (Cy5-Signal) bei einer Anregungswellenlänge von 633 nm und einem Emissionssignal von 670 nm detektiert. Anschließend regt man den grünen Kanal (Cy3-Signal) bei 543 nm an und registriert bei einem Emissionsmaximum von 570 nm die Fluoreszenz auf der *Microarray*-Fläche. Hierbei ist die Anpassung der Laserintensität und Signalverstärkung des Photomultipliers auf den jeweiligen Biochip erforderlich. Vergleicht man die Messdaten des roten Kanals mit den Positionskontrollsignalen des grünen, lässt sich eindeutig ermitteln, an welchen Stellen eine Hybridisierung stattgefunden hat und diese den entsprechenden *Spots* zuordnen. Die Laserleistung wird prozentual angegeben und beschreibt den Anteil der gesamten Anregungsstrahlung, die den Abschwächfilter passiert. Der Anstieg der Leistung führt zu einer Steigerung der Emission des Fluoreszenzsignals und damit zu einer Verbesserung der Sensitivität, aber auch zu einer Erhöhung des Hintergrundes. Ferner kann bei hohen oder gesättigten Signalintensitäten (angezeigt durch die Farbe Weiß bei Verwendung der Falschfarbendarstellung) eine Herabsetzung der Laserleistung dazu führen, dass gesättigte Werte in einen genau quantifizierbaren Bereich gelangen. Der Prozentsatz der PMT entspricht dem Bruchteil der maximalen PMT-Spannung. Ähnlich der Steigerung der Laserleistung, führt die Erhöhung der PMT-% zu einer Sensitivitätsverbesserung schwacher Fluoreszenzsignale. Allerdings nimmt mit wachsender

PMT-Spannung auch das Hintergrundsignal zu. Weist eine Probe einen hohen Grad an Rauschen auf, muss die PMT-Spannung erniedrigt werden.

Um die Stärke von Fluoreszenzsignalen sichtbar zu machen, wird die Falschfarbendarstellung (*Rainbow palette*) verwendet. Mit Hilfe dieser Farbskala lassen sich gesättigte Signale identifizieren und entweder Laserleistung oder PMT-Spannung dahingehend verändern, dass auswertbare Bilder resultieren. Dies ist möglich, da das menschliche Auge besser zwischen Farb- als zwischen Graustufen differenzieren kann. In den Darstellungen steht die Farbe Schwarz für kein Signal, Blau für eine niedrige (Abbildung 3-11, oben), Rot für eine hohe Intensität (Abbildung 3-11, unten links) und Weiß für (Über-)Sättigung (Abbildung 3-11, unten rechts).

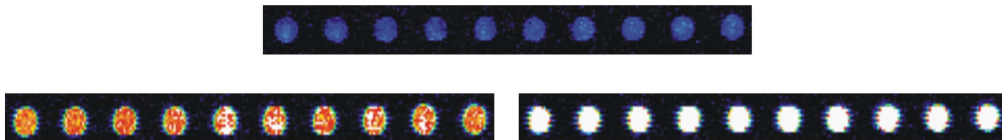


Abbildung 3-11: Beispiele der mittels Farbskala unterscheidbaren Signalintensitäten; **oben:** niedrige Intensität (Blau); **unten links:** hohe Intensität (Rot); **unten rechts:** Sättigung (Weiß). Der signalfreie Hintergrund ist schwarz.

3.10 Software

3.10.1 *mFold*

Das von Zuker am *Institute for Biomedical Computing* an der *Washington University School of Medicine* entwickelte Programm *mFold* dient den theoretischen Berechnungen diverser Parameter beliebiger RNA- und DNA-Sequenzen [Zuker 2003; Dimitrov 2004]. *mFold* kalkuliert für gegebene DNA-Stränge und (komplementäre) Basenabfolgen die spezifischen Schmelztemperaturen sowie bei Einzelsträngen die freien Energien bzw. Schmelzpunkte der möglichen, sinnvollen Sekundärstrukturen. Für alle Berechnungen bezieht das Programm neben den

Oligonukleotidkonzentrationen auch die der Natrium- und Magnesiumionen ein [Peyret 2000]. Die Ergebnisse sind graphisch darstellbar. Zur Konzeption der passenden Basenabfolgen und Abstimmung der zwischen diesen auftretenden Schmelztemperaturen fand in der vorliegenden Arbeit die Version 3.2 der Software Verwendung.

3.10.2 MALDI-Software

mMass (Version 2.4), ein quelloffenes Softwareprogramm (www.mmass.org), dient der Analyse aufgenommener MALDI-Spektren [Strohalm 2008; Strohalm 2010]. Es erlaubt das Importieren vieler Dateiformate, wie auch der Rohdaten aller Geräte der Firma Bruker. Das Programm bietet sämtliche gängigen Analysefunktionen, z.B. Signalauswahl, Untergrundkorrektur oder Isotopenzuordnung. Zur weiteren Verwendung der Messdaten sowie -spektren sind mehrere Formate zum Datenexport verfügbar.

3.10.3 *GenePix*

Mit Hilfe der Software *GenePix* Pro 6.0 (Molecular Devices, Union City, USA) können Signalintensitäten aus den im Scanprozess erzeugten Bilddaten bestimmt werden. Zur Quantifizierung legt man ein Raster über den in das Programm geladenen *Microarray* und gleicht die Gitterpunkte automatisch bzw. manuell an die jeweiligen *Spots* an. Neben den Signalintensitäten gibt die Software auch die Werte für den Hintergrund in einer Ergebnistabelle an.

4 EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

Molekulare Marker zur Diagnose und Früherkennung von Krankheiten sind aus der modernen Medizin nicht mehr wegzudenken [Duffy 2010]. Doch auch in anderen als medizinischen Fragestellungen werden Systeme, welche sich Effekten auf molekularer Ebene bedienen, zurzeit intensiv untersucht. Diese Forschung gilt als besonders vielversprechend, da sie höchst innovativ ist, daher gänzlich neue Wege beschreitet und sich ungeahnte Möglichkeiten der praktischen Anwendung erkennen lassen [Balzani 2007; Balzani 2008]. So existiert u.a. die Idee eines DNA-Computers [Braich 2002], welcher mit Hilfe von DNA-Permutationen komplexe mathematische Aufgaben bewältigen kann oder die Anwendung von aus DNA-Strängen aufgebauten, molekularen Käfigen für den Einschluss anderer Moleküle oder den räumlich isolierten Ablauf definierter Reaktionen [Fleck 2008; Heckel 2008].

Ein weiteres Anwendungsfeld für Oligonukleotide stellt ihre Verwendung als molekularer Barcode bzw. molekulares Echtheitszertifikat dar. Auch hierfür lassen sich mittlerweile viele Anwendungsbeispiele nennen. So basieren *High Throughput*-Methoden auf DNA-*Barcodes* als Erkennungssequenzen für bestimmte Moleküle [Smith 2010]. Geldscheine werden mit DNA-Lösung präpariert, um sie nach einem Raub zurückverfolgen zu können [Bockslaff 2004]. Spezielle DNA-Proben dienen, eingearbeitet in Markenembleme, als Identifizierungsmöglichkeit für Originalwaren [www10].

Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung einer neuartigen Methode zur Produktsicherung gegen Fälschungen („Markenpiraterie“) unter Verwendung von PNA-Oligomeren. Besonders sollen dabei lipophile Materialien zur Markierung Berücksichtigung finden. Bei dieser Problemstellung ergeben sich die folgenden Teilbereiche, die experimentell erarbeitet werden müssen: a. Etablierung geeigneter Verfahren der Oligomerlipophilisierung, b. Einbringung in lipophile Medien sowie c. Rückgewinnung der Basensequenzen aus diesen und d. deren anschließender Nachweis.

Zum Abschluss sei eine erfolgversprechende, industrielle Anwendungsmöglichkeit des entwickelten Systems vorgestellt.

4.1 Gewinnung reiner Oligomere durch Anwendung inverser *Diels-Alder*-Reaktionen

Für die Entwicklung eines Markierungssystems, das wesentlich auf der Verwendung von Oligonukleotiden/PNAs basiert, ist von entscheidender Bedeutung, dass diese in sehr reiner Form eingesetzt werden. Beispielsweise erleichtert dies ganz erheblich die Interpretation der Experimente während der Entwicklungsphase, weil es zweifelsfreie Rückschlüsse erlaubt. Oligonukleotide und PNAs werden üblicherweise durch HPLC-Verfahren molekular einheitlich gewonnen [Demidov 1994; Hoffmann 1998; Wei 1999]. Dies war auch in der vorliegenden Arbeit der Fall. Gleichzeitig wurden aber auch einleitende Experimente zu einer alternativen Reinigungsmethode für PNAs durchgeführt. Diese arbeitet mit Derivatisierungen und polymeren Festphasen. Da reine PNAs kostenintensiv sind, wurde zur Methodenentwicklung auf günstigere und in größerer Menge vorhandene Peptide zurückgegriffen. Dies ist statthaft, weil PNAs und Peptide höhere lineare Polymere darstellen und beide Stoffklassen primäre Aminogruppen an einem Ende besitzen, die für den Derivatisierungszyklus eingesetzt werden, und daher analoge Syntheseschritte adaptiert auszuführen sind.

4.1.1 Schematischer Ablauf

In Abbildung 4-1 ist die Methode zur Reinigung von Peptiden (und PNAs) aus Synthesegemischen schematisch dargestellt. Zunächst wird einerseits die Tetrazinkomponente an einen festen Träger (z.B. Glaswolle) gekoppelt und andererseits das Dimedonderivat mit der Aminogruppe eines Peptids oder einer PNA umgesetzt, so dass letztere eine kovalente Anbindung eingehen. Unter Stickstoffabspaltung reagieren die beiden Edukte miteinander. Durch diese Immobilisierung des aufzureinigenden Oligomers können störende Nebenprodukte, wie beispielsweise Abbruchsequenzen, welche die Reaktion aufgrund vollständiger Acetylierung nicht eingehen, problemlos entfernt werden. Ist dieser Schritt vollzogen, kann das Peptid bzw. die PNA vom Dimedon und somit von dem festen Träger durch 5 %ige Hydrazinlösung in sauberer und einfacher Reaktion abgespalten und auf

diese Weise in sehr reiner Form isoliert werden [Kellam 1997]. Aus Kostengründen wurde dieses Aufreinigungsverfahren mit Peptidsequenzen entwickelt. Die Reaktionssequenz dürfte sich zur Reinigung von PNA-Synthesegemischen adaptieren lassen.

4.1.2 Tetrazinfunktionalisierte Festphasen

Zur Immobilisierung der Tetrazinkomponente werden Versuche mit unterschiedlichen Festphasen, wie Glaswolle, Glaskügelchen, Tentagelharz sowie Aminomethylpolystyrol, durchgeführt, um das am besten geeignete Trägermaterial zu finden. Im Anschluss sei nur die Anbindung an Glaswolle detailliert dargelegt, da diese in der Folge die besten Ergebnisse erzielte.

Nach dem Aufschlännen von 506 mg gemörserter Glaswolle wird diese in einer Frittenplatte mit 5 x 500 µl Wasser und anschließend in der gleichen Weise mit Ethanol gewaschen, um kleinste Teile, welche später zum Verstopfen der zweiten Fritte während der eigentlichen Reaktion beitragen könnten, zu entfernen. Das Lösungsmittel wird scharf abgesaugt, die Glaswolle in ein Reaktionsgefäß überführt und darin für eine Stunde auf dem Schüttler in 10 %iger Natronlauge angeätzt. Nach anschließender 15-minütiger Ultraschallbehandlung wird die Glaswolle aufgeschlämmt und auf eine unbenutzte Fritte aufgebracht. Das Waschen mit Wasser erfolgt so lange, bis der pH-Wert den neutralen Bereich erreicht hat. Es wird mit 4 x 1 ml Ethanol nachgespült und zuletzt das Lösungsmittel vollständig abgesaugt. Zur Silanisierung setzt man jeweils eine 7 mM Lösung der beiden Tetrazinderivate (s. Abbildung 4-1, links oben) in 500 µl Dimethylsulfoxid an und gibt jeweils 60 mg der angeätzten Glaswolle hinzu. Die Reaktionszeit beträgt 12 Stunden unter Schütteln bei Raumtemperatur. Die Aufarbeitung erfolgt in beiden Fällen durch Absaugen (Frittenplatte) und nachfolgendem Waschen mit 3 x 1 ml Dimethylsulfoxid, 2 x 1 ml Ethanol sowie 2 x 1 ml Dichlormethan. Nach dem Trocknen der jeweiligen Glaswolle erfolgt deren Sinterung jeweils bei 110 °C für 20 Minuten. Bis zur weiteren Verwendung werden die beiden an die Glaswolle gebundenen Derivate bei 4 °C aufbewahrt.

4.1.3 Herstellung der Dimedonkomponente

Zur Entwicklung des Verfahrens werden jeweils 0,4 μmol harzgebundenes Peptid der Sequenz AAGSPEDLERLLPHGVFEG (arbeitsgruppenintern hergestelltes 20mer) unter verschiedenen Bedingungen mit der Dimedonkomponente umgesetzt:

- 0,75 M Dimedonkomponente ($n=1$) in 20 μl Chloroform/Methanol (1:1) mit 10 % N,N-Diisopropylethylamin (DIEA)
- 0,75 M Dimedonkomponente ($n=1$) in 20 μl Chloroform/Methanol (1:1)
- 0,25 M Dimedonkomponente ($n=1$) in 20 μl Dichlorethan mit 10 % N,N-Diisopropylethylamin (DIEA)
- 0,25 M Dimedonkomponente ($n=1$) in 20 μl Dichlorethan

Die Reaktionszeit beträgt 12 Stunden unter Schütteln. Zur Aufarbeitung werden die vier Reaktionsansätze jeweils durch eine Fritte gesaugt. Das in der Fritte zurückgehaltene Material wird direkt mit 40 μl 95 %iger Trifluoressigsäure/ 5 % Triisopropylsilan für zwei Stunden versetzt (Abspaltung vom Harz). Die Reaktion wird beendet, indem man Druckluft durch die Fritte drückt und das Filtrat in einem 500 μl Eppendorfgefäß auffängt. Nach dem Einengen mittels Vakuumzentrifuge bis zur Trockene löst man in 100 μl Acetonitril/Wasser (15:85). Die Bewertung der Versuche geschieht jeweils durch die Aufnahme eines MALDI-Spektrums (s. Abbildung 4-2).

Aus den Spektren wird ersichtlich, dass trotz eines 37,5-fachen Überschusses an Dimedonderivat, bei keiner Versuchsvariante eine quantitative Umsetzung mit dem Peptid stattgefunden hat. Der Produktpeak bei $m/z = 2442,37$ ist zudem beträchtlich geringer als derjenige des eingesetzten Peptids bei $m/z = 2501,22$.

Durch Variation der Reaktionsbedingungen kann eine deutliche Steigerung der Ausbeute des Kopplungsprodukts erreicht werden. Die besten Ergebnisse ergeben sich mit einer 0,3 M Lösung der Dimedonkomponente ($n=1$) in N-Methyl-2-pyrrolidon mit 10 % N,N-Diisopropylethylamin und einer Reaktionszeit von 48 Stunden. Der Faktor, um welchen das Peptid im Vergleich zu der Peptid-Dimedon-Komponente überwiegt, sinkt von anfänglich 5,3 auf 2,5 nach 48 Stunden.

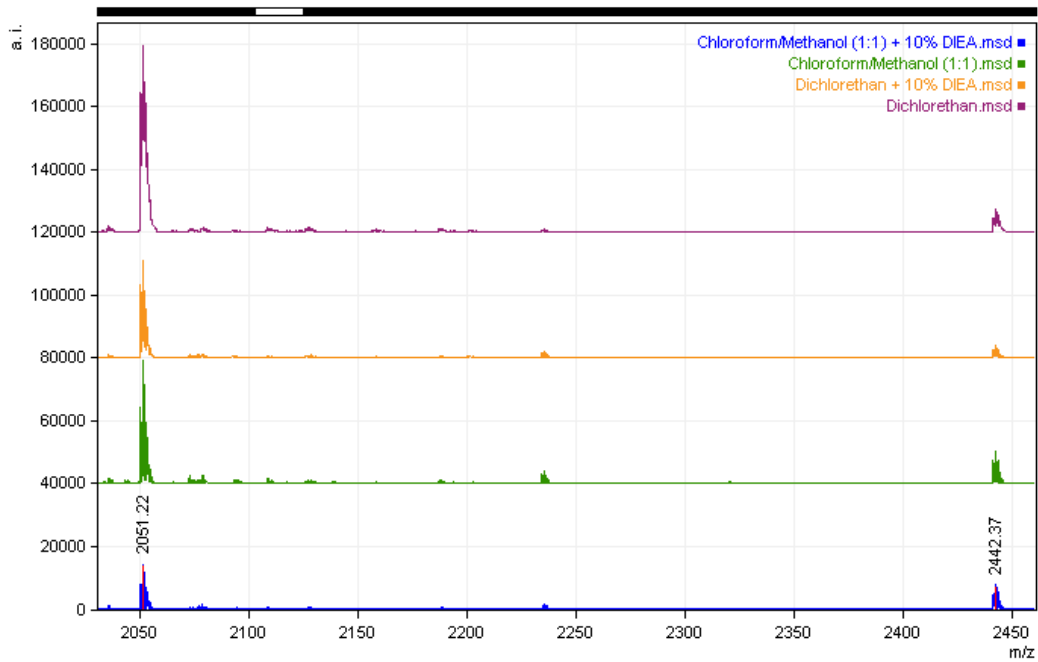


Abbildung 4-2: MALDI-Spektren zur Kontrolle der Peptid-Dimedon-Kopplung nach vier Reaktionsbedingungen. Blau: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1) mit 10 % N,N-Diisopropylethylamin (DIEA); grün: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1); orange: Dichlorethan mit 10 % DIEA sowie violett: Dichlorethan. Ausgangspeptid $m/z = 2051,22$; erwartetes Produkt $m/z = 2442,37$.

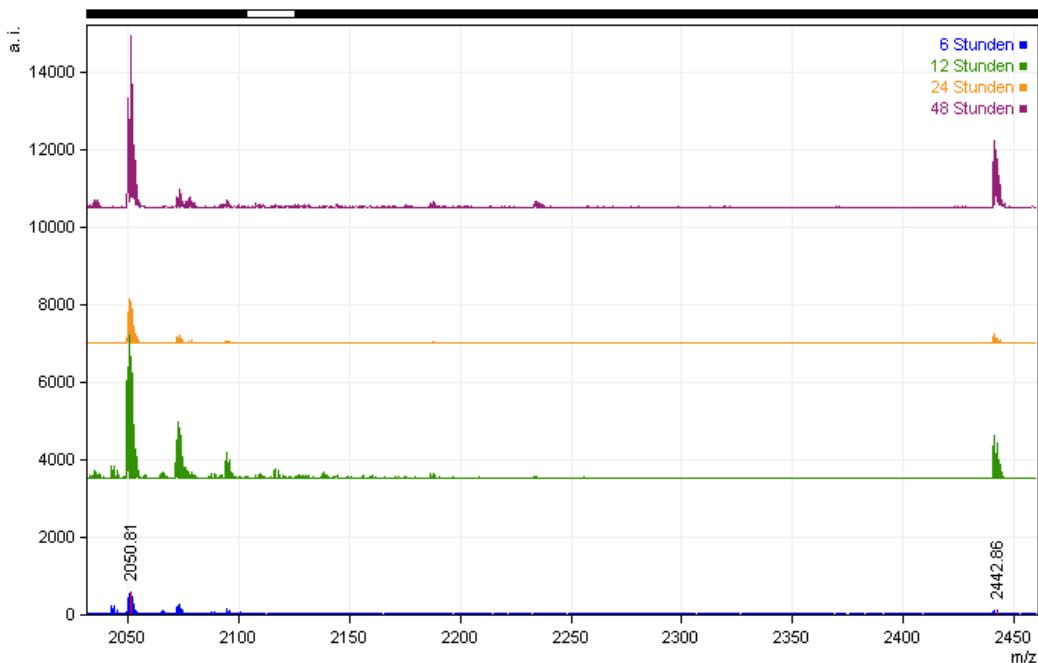


Abbildung 4-3: MALDI-Spektren nach verschiedenen Reaktionszeiten der Peptid-Dimedon-Umsetzung in N-Methyl-2-pyrrolidon mit 10 % N,N-Diisopropylethylamin. Die Probenentnahmen finden nach 6 (blau), 12 (grün), 24 (orange) sowie 48 (violett) Stunden statt. Ausgangspeptid $m/z = 2050,81$; erwartetes Produkt $m/z = 2442,86$.

In Abbildung 4-3 sind die Umsetzungen nach den einzelnen Reaktionszeiten in Form von MALDI-Spektren, welche vom Produkt nach Abspaltung vom Harz aufgenommen wurden, dargestellt.

Eine ähnlich hohe Ausbeute ist in kürzerer Zeit möglich, indem innerhalb von 24 Stunden die 0,3 M Reagenzlösung in kurzen Abständen ausgetauscht, d.h. die alte durch die Fritte abzogen und 20 μ l frische zugegeben wird. Dies geschieht nach 4, 16, 18, 19 und 24 Stunden. Das entsprechende Spektrum ist in Abbildung 4-4 für den 24-Stundenwert dargestellt. Hier beträgt der Faktor, um welchen das Peptid, verglichen mit dem Peptid-Dimedon-Produkt im Überschuss vorliegt, lediglich 1,6.

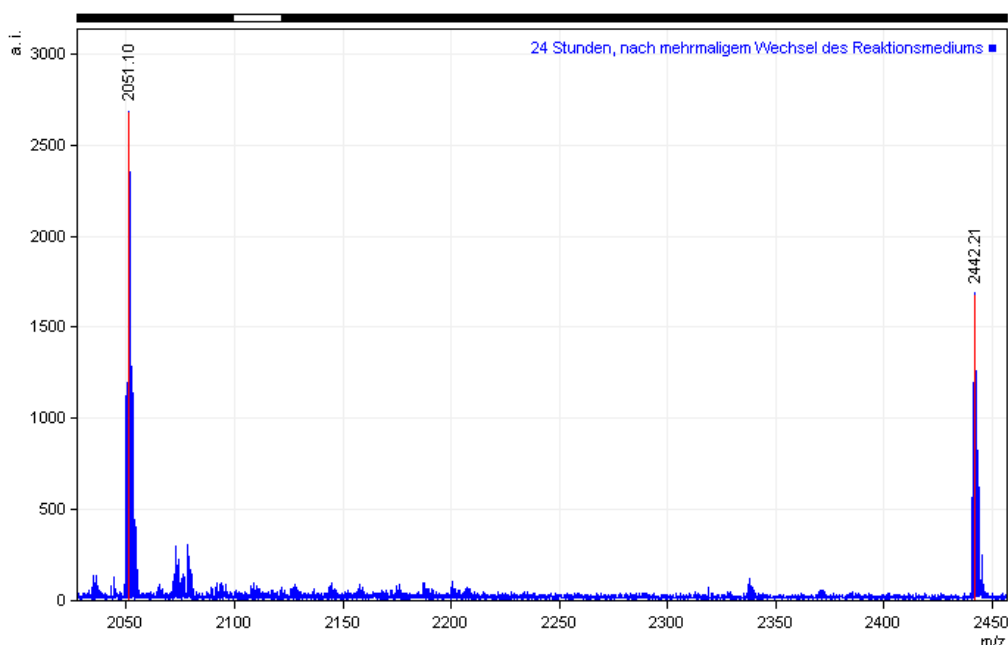


Abbildung 4-4: MALDI-Spektrum des durch regelmäßigen Austausch des Reaktionsmediums über 24 Stunden erhaltenen Produktes nach Abspaltung vom Harz. Ausgangspeptid $m/z = 2051,10$; erwartetes Produkt $m/z = 2442,21$.

Die bisher gewonnenen Erkenntnisse werden auf die Reaktionen zweier homologer Dimedonderivate ($n = 2, 3$) mit einem anderen, arbeitsgruppenintern synthetisierten Peptid (20mer, AAGKSPEDLERLLPHKVFEG) übertragen. 20 μ l einer 0,5 M Lösung des jeweiligen Dimedonderivates werden zu je 0,5 μ mol des Peptids gegeben. Nach 6, 20, 26 und 48 Stunden erfolgt der Wechsel der Reagenzlösung. Nach Abspaltung vom Harz mittels 40 μ l 95 %iger Trifluoressigsäure/5 % Triisopropylsilan pro Fritte für

zwei Stunden bei Raumtemperatur erhält man die in Abbildung 4-5 dargestellten Spektren.

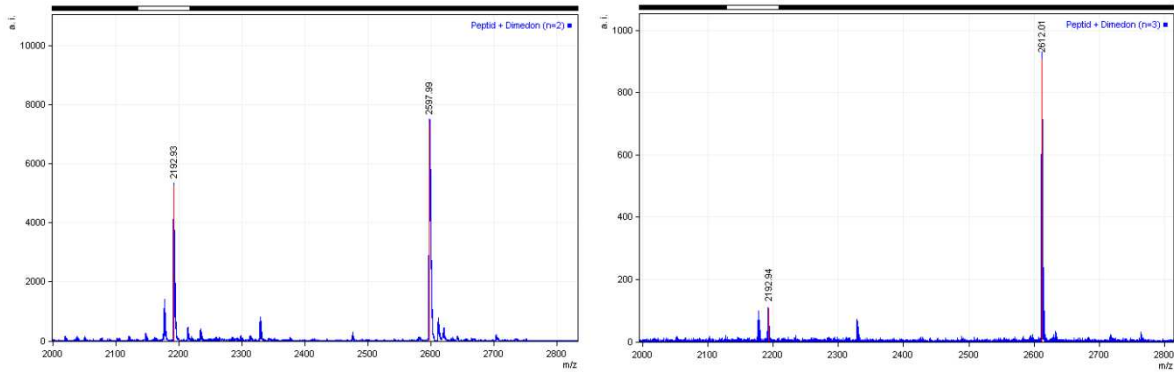


Abbildung 4-5: MALDI-Spektren der Peptid-Dimedon-Umsetzung mit den längeren Dimedonderivaten ($n = 2, 3$), nach Abspaltung vom Harz. Ausgangspeptid $m/z = 2192,93$; erwartetes Produkt $m/z = 2597,99$ bzw. $2612,01$.

Aus den Spektren geht hervor, dass die Umsetzungseffizienz für die höheren Homologen des Dimedonderivats mit dem Peptid steigt: bei dem Derivat mit $n = 2$ ist der Produktpeak ($m/z = 2598$) 1,4x so hoch wie der des Eduktes ($m/z = 2193$), bei $n = 3$ beträgt der Faktor 8,3 ($m/z = 2612$). Möglicherweise geht dies auf bessere räumliche Zugänglichkeit des reagierenden Kohlenstoffatoms in den höheren Homologen für das eintretende Peptid zurück.

4.1.4 Umsetzung der beiden Tetrazinkomponenten mit dem Dimedonderivat

Für diese *Diels-Alder*-Reaktion werden jeweils 20 mg der beiden tetrazinfunktionalisierten Glaswollen (s. Abbildung 4-1) mit einem Fünftel des in Abbildung 4-4 durch MALDI charakterisierten Produktgemischs aus Peptid (Sequenz s. S. 65) und Dimedonderivat umgesetzt. Dazu wird letzteres in 20 μl Acetonitril/0,1 %ige Trifluoressigsäure (2:3) gelöst und direkt auf die feste Tetrazin-Glaswolle pipettiert. Nach 12 Stunden ist die *Diels-Alder*-Umsetzung quantitativ abgeschlossen, da mittels MALDI keine Peptid-Dimedon-Komponente mehr detektiert werden kann.

Man wäscht mit 2 x 2 ml Acetonitril/0,1 %iger Trifluoressigsäure (2:3), gefolgt von 2 x 2 ml Wasser. Getrocknet wird durch scharfes Absaugen auf der Fritte. Die Abspaltung des Peptids erfolgt durch 10 µl 5 %iges Hydrazin in Wasser für 30 Minuten. Zur Beendigung der Reaktion wird die Lösung isoliert und das Filtrat mittels MALDI analysiert (s. Abbildung 4-6). Durch Vergleich der Spektren des Ausgangspeptids mit demjenigen, welches die Reinigungsprozedur durchlaufen hat, erkennt man, dass das Verfahren erfolgreich war.

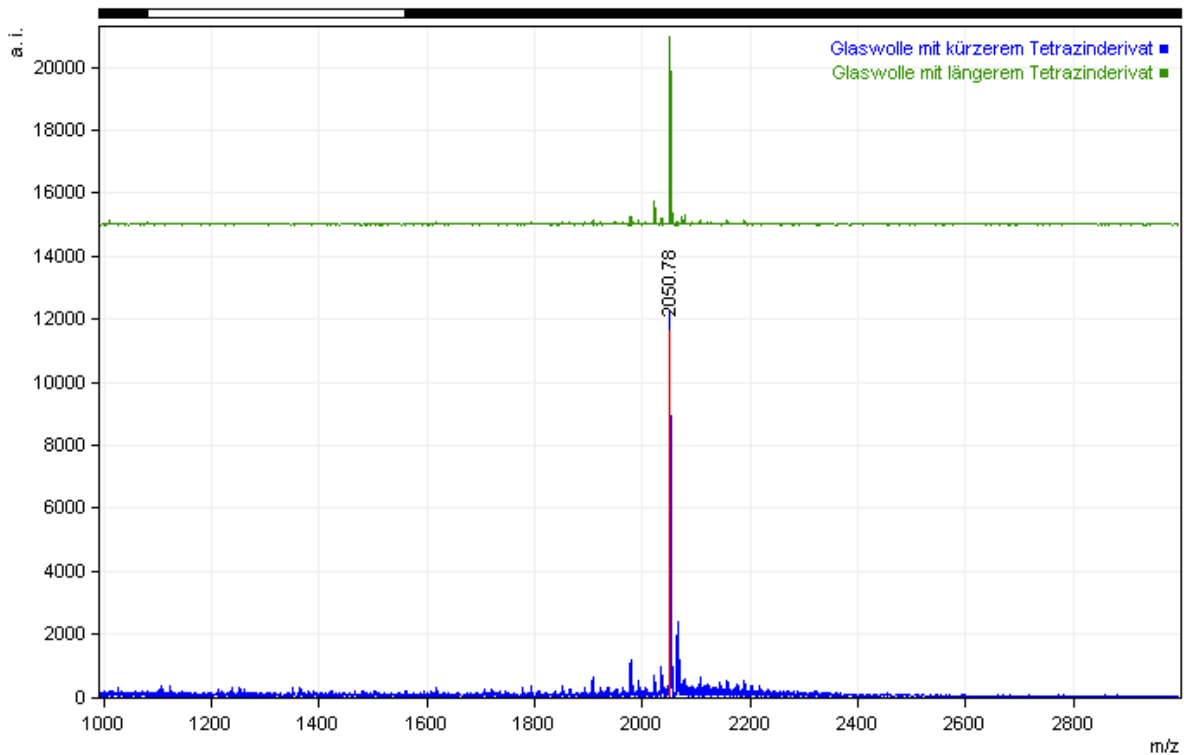


Abbildung 4-6: MALDI-Spektren einer *Diels-Alder*-Reaktion der beiden tetrazinderivatisierten Glaswollen (Struktur s. Abbildung 4-1) mit dem unreinen Dimedonderivat, charakterisiert durch das MALDI-Spektrum (Abbildung 4-4) nach Abspaltung vom Harz. $m/z = 2050,78$: erwartetes Peptid.

4.2 Lipophilisierung von DNA und PNA zum Zweck der Einbringung in lipophile Flüssigkeiten sowie Rückgewinnung durch Extraktion

Als Voraussetzung des Lösens hydrophiler Stoffe in lipophilen Medien müssen erstere derart „verpackt“ werden, dass sie sich in dem gewünschten Lösungsmittel homogen verteilen lassen. DNA stellt ein besonders hydrophiles Molekül dar, welches sich aufgrund seines negativ geladenen Phosphatrückgrates normalerweise nur in wässrigen Systemen löst. Auch bei der an sich hydrophoberen PNA sollte durch entsprechende Modifikationen eine erhöhte Lipophilisierung möglich sein.

4.2.1 Lipophilisierung von Lachs-dsDNA-Bruchstücken sowie ss- bzw. dsDNA-Oligomeren

Lipophilisierungsversuche für DNA sind in der Literatur nur rar vorhanden, da diese Publikationen hauptsächlich nicht-physiologische Fragestellungen zum Gegenstand haben. Es gibt kovalente DNA-Modifikationen, z.B. die Herstellung von Fettsäurederivaten [Liu 2010]. In der Mehrzahl beschreibt die Literatur jedoch DNA-Komplexierungen mittels kationischer bzw. anionischer oberflächenaktiver Substanzen [Imre 1982; Ijiro 1992; Sergejev 1999; Cortesi 2008] oder den Aufbau reverser Mizellen durch einen nicht-ionischen, oberflächenaktiven Stoff [Budker 2002].

Bei den wenigen Beispielen handelt es sich um sehr spezielle Exempel für äußerst ausgefallene Fragestellungen. Entsprechend ungewöhnlich sind experimentelle Methodik und Art der eingesetzten Chemikalien. Die skizzierten Lipophilisierungsverfahren können deshalb nicht ohne Weiteres für die Markierung lipophiler Flüssigkeiten mit DNA adaptiert werden. Als Methoden kommen solche in Frage, welche sich durch relativ einfache Handhabung, Robustheit sowie einen niedrigen Preis auszeichnen. Ein kationisches Komplezierungsreagenz, das diese Anforderungen erfüllt, zeigt Abbildung 4-7. Dihexadecyldimethylammoniumbromid ($(C_{16}H_{33})_2N^+Me_2Br^-$, ein quartäres Ammoniumsalz, ist permanent kationisch, chemisch stabil, nicht UV-absorbierend und zwitterig (lipophil/kationisch) im Charakter. Mit der detaillierten Beschreibung der Komplexierung von dsDNA mit dieser amphiphilen Verbindung befassen sich die folgenden Abschnitte.

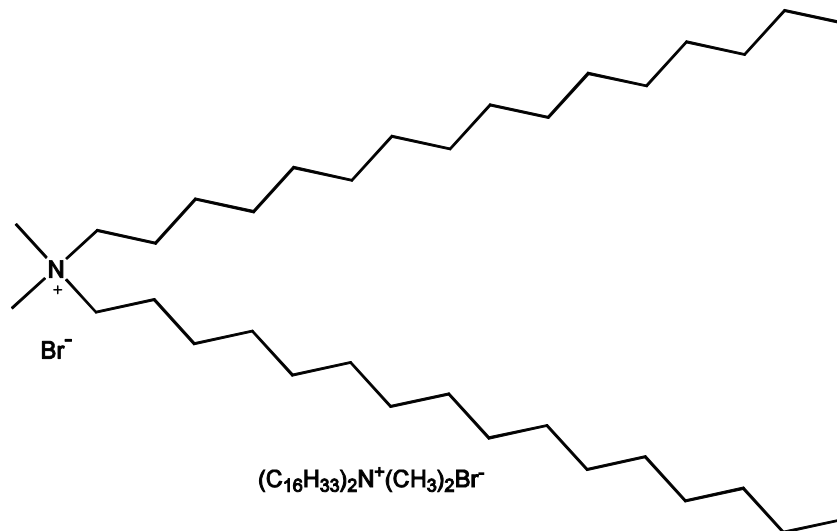


Abbildung 4-7: Struktur- und Summenformel des quartären Ammoniumsalzes Dihexadecyldimethylammoniumbromid zur Komplexierung von DNA.

Nimmt man 25 mg native Lachs-DNA in der Konzentration von 1 mg/ml in HEPES, welche nach Angaben des Herstellers Bruchstücke der Molmasse von ungefähr 300.000 g/mol enthält, so entspricht das ca. $5 \cdot 10^{-5}$ mol Nukleobasen, d.h. es liegen ungefähr 500 Basenpaare und damit etwa 500 Phosphatbrücken pro DNA-Molekül vor. Dies bestimmt die Menge des zuzusetzenden Ammoniumsalzes, wovon ebenfalls 25 mg als 10^{-3} M Lösung langsam zur DNA-Lösung zugegeben werden. Die Umsetzung zwischen dem Ammoniumsalz und der DNA findet in HEPES (pH 8,0) statt. Die Bildung lipophilisierter DNA zeigt sich daran, dass es beim Vermischen der beiden Lösungen zu einer faserigen Trübung kommt, welche sich zentrifugieren lässt (15 min bei 1000 G). Das gebildete Pellet stellt die lipophilisierte DNA dar. Im Anschluss an die Überführung des Präzipitats in ein Eppendorfgefäß wird im Vakuumexsikkator über Calciumchlorid getrocknet, wobei nach 24 Stunden Gewichtskonstanz erreicht ist. Der auf diese Weise erhaltene Feststoff wiegt 26 mg und löst sich nur noch in organischen, lipophilen Medien, wie beispielsweise Chloroform oder Ether, nicht aber in Wasser.

In einem nächsten Schritt erfolgt die Übertragung des entwickelten Systems auf synthetische DNA-Oligomere. Nach Herstellung eines kurzen Doppelstrangs aus zueinander komplementären 12meren T1_DNA und Anti_T1 (jeweils 30 µl 200 µM Stammlösung) in 30 µl HEPES wird das Ammoniumsalz langsam zugegeben. Bei zur

Lachs-DNA identischer Versuchsführung verläuft das Experiment ähnlich. Der lipophilisierte Doppelstrang lässt sich wieder in Chloroform lösen.

Um das für (natürliche) dsDNA geschilderte Verfahren auch auf synthetische ssDNA-Oligomere anzuwenden, die bei Markierungsversuchen von lipophilen Medien eine Rolle spielen könnten, wird die Umsetzung mit dem quartären Ammoniumsalz analog für ssDNA-Oligomere durchgeführt.

10 μl einer $2 \cdot 10^{-4}$ M Lösung des 9mers L1 versetzt man mit 50 μl HEPES/Ammoniumsalz. Nach Zentrifugation kann ein kleines Pellet isoliert und im Vakkumexsikkator getrocknet werden. Durch Zusatz von 100 μl Dichlorethan und alternativ 100 μl Methanol lassen sich die getrockneten Pellets nicht vollständig auflösen. Die Überstände zeigen nur eine Extinktion von 0,063 (Dichlorethan) und 0,037 (Methanol).

Demnach erhält man, trotz zur Lachs-DNA analoger Vorgehensweise, in diesen Versuchen für synthetische ssDNA kein positives Ergebnis. Dies ist damit zu begründen, dass bei einzelsträngiger DNA im Vergleich zu doppelsträngiger die mizellenartige Umhüllung mit dem quartären Ammoniumsalz nicht in ausreichendem Maße bewerkstelligt wird.

4.2.2 Lipophilisierung von PNA

Durch das veränderte Rückgrat weist PNA eine erheblich geringere Polarität auf als entsprechende DNA. Um eine nochmals gesteigerte, höhere Hydrophobizität zu erzielen, wurden arbeitsgruppenintern mit lipophilen Aminosäuren modifizierte PNAs synthetisiert, welche ein bzw. drei Phenylalaninreste (F) pro Terminus tragen (F-T3-F, F3-T3-F3). In entsprechenden Lösungsversuchen weisen diese modifizierten Sequenzen keinen Vorteil im Vergleich zu den nicht-lipophilisierten PNAs auf (s. Kapitel 4.3.2.5). Diese Tatsache, sowie der hohe Preis für lipophil-modifizierte PNAs, sprechen dafür, PNA-Oligomere direkt einzusetzen, um lipophile Umgebungen zu dotieren. Die PNA-Oligomere sollen dabei als Lösungen eingesetzt werden, um homogene Verteilung im dotierten lipophilen Medium zu erreichen. Als ungeeignet werden z.B. N,N-Dimethylformamid/Wasser bzw. Pyridin/Wasser-Mischungen

betrachtet, da diese weitere Operationen (z.B. Trennungsgänge, Detektion, Hybridisierung) erheblich behindern. Nach mehreren Versuchen kann Ethanol/Wasser (9:1) als geeignetes Solvensgemisch für die vorliegende 12mer PNA ermittelt werden. Im Gegensatz zu anderen Solventien bildet sich hier kein Niederschlag, die Lösung ist klar. Die Gemischkomponenten Ethanol/Wasser sollten nur wenig mit weiteren Operationen interferieren.

4.2.3 Einbringung in lipophile Medien

Die einfachste Methode zur Einbringung von DNA- oder PNA-Oligomeren in entsprechende Lösungsmittel bestünde darin, die Sequenzen den lipophilen Umgebungen direkt zuzufügen. Dies geschieht vorzugsweise nicht in Form von Feststoffen, sondern als Lösung, d.h. im Falle von PNAs z.B. in Ethanol/Wasser-Gemischen, im Falle von DNA in Wasser oder wässrigen Puffern. Zur Dotierung eines lipophilen Mediums müsste die Markierung nicht unbedingt molekular-dispers, jedoch in ihrem physikalischen Zustand stabil, z.B. als Emulsion, homogen über das gesamte Volumen verteilt, vorliegen. Ein solcher Zustand lässt sich allerdings experimentell nicht auf einfache Weise verifizieren, erst recht, wenn die Dotierung nur, aus naheliegenden Gründen, mit sehr geringen Mengen DNA bzw. PNA erfolgt.

Als lipophile Medien, an denen die Dotierung mit DNAs/PNAs demonstriert werden soll, wurden Nujol, Sonnenblumen- sowie Dieselöl und später auch Leinöl ausgewählt. Nujol ist ein farbloses, dickes, nur aus Paraffinen bestehendes Öl. Aufgrund seiner Kohlenwasserstoffnatur zeichnet es sich durch maximale Lipophilie aus. Für die angestrebte Verwendung ist es gut geeignet, da es molekular definiert ist und chemisch (z.B. gegen Säuren/Basen, Luft, andere Reagenzien) sowie physikalisch (z.B. Licht, Wärme) als völlig inert betrachtet werden kann, was für die Methodenentwicklung von großem Vorteil ist. Ebenso ist es auch wichtig, dass Nujol keine UV-Absorption besitzt. Eine Dotierung kann deshalb bis zu einem gewissen Grad der Methodenentwicklung auch UV-photometrisch verfolgt werden. Gleichzeitig erleichtert der artifizielle Charakter von Nujol die Methodenentwicklung. Sonnenblumenöl wurde ausgewählt, weil es ein typisches Speiseöl ist. Chemisch enthält es vielerlei Stoffklassen und ist empfindlich gegen physikalische Einflüsse. Dieselöl ist

ein technisches Produkt, vermutlich die chemisch komplizierteste Matrix und damit die schwierigste der drei ausgesuchten lipophilen Umgebungen. Nach Abschluss der Versuche mit diesen drei verschiedenen Medien findet Leinöl als potentiell Anwendungsbereich im Bereich Künstlerfarben Einsatz.

Im Gegensatz zur PNA kann die DNA nur in lipophilisierter Form in nicht-wässrige Medien eingebracht werden, da sonst meist ein Niederschlag die homogene Verteilung vereitelt. Lipophilisierte Lachs-DNA kann am besten in entsprechenden Flüssigkeiten verteilt werden, indem man sie zuvor in einem kleinen Volumen Dichlorethan löst, beispielsweise 1 mg komplexierte DNA in 50 µl des halogenierten Lösungsmittels. Die erhaltene Lösung eignet sich zum Dotieren lipophiler Medien, wie beispielsweise 1 ml Nujol/Hexan (1:1). Ohne Lipophilisierung bzw. Vorlösen in Dichlorethan ist keine homogene Verteilung gewährleistet.

Die, wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben hergestellte, lipophilisierte, synthetische dsDNA wird in 300 µl Chloroform gelöst und zu jeweils gleichen Teilen in 1 ml Nujol/Hexan (1:1), Sonnenblumenöl/Hexan (1:1) bzw. Diesel/Hexan (1:1) verteilt.

Aufgrund der fehlgeschlagenen Lipophilisierung können entsprechende Versuche mit dem synthetischen Einzelstrang nicht durchgeführt werden. Somit scheidet einzelsträngige DNA als Markierungsverfahren aus.

Für analoge Versuche mit PNA findet der nicht-lipophilisierte Einzelstrang Verwendung. 2 µl 300 µM T3_PNA-Stammlösung werden mit 98 µl Ethanol/Wasser (9:1) versetzt. Nach kurzem Schütteln erfolgt die UV-Absorptionsmessung der Lösung, welche einen Wert von 0,740 liefert. Im Anschluss an eine fünfminütige Zentrifugation bei 1000 G entnimmt man 90 µl und bestimmt erneut deren UV-Absorption. Die Extinktion beträgt 0,775, was einer vollständigen Lösung der PNA entspricht.

Ein, wie eben beschrieben hergestellter, 100 µl-Ansatz der T3_PNA wird jeweils in 1 ml Nujol/Hexan (Hexanzusatz zur Viskositätserniedrigung), Sonnenblumenöl/Hexan und Dieselöl/Hexan (alle 1:1) injiziert. Nach kurzer Behandlung der erhaltenen Gemische mit Ultraschall erscheinen diese bei Betrachtung klar und

homogen. Eine Tropfenbildung des Chloroform/PNA-Anteils am Boden des Eppendorfgefäßes kann weder vor noch nach der Zentrifugation (1000 G, 5 min) erkannt werden. Die Extinktion beträgt bei der Nujol/Hexan-Mischung 0,065, womit die PNA in dem Lösungsmittel restlos homogen verteilt vorliegt. Für Sonnenblumenöl sowie Dieselöl können analoge UV-Messungen aufgrund der Eigenabsorptionen nicht durchgeführt werden.

4.2.4 Extraktion und Anreicherung aus lipophilen Flüssigkeiten

Zum Nachweis von PNA- bzw. DNA-Oligomeren in dotierten lipophilen Medien wurde generell ein Anreicherungsschritt implementiert. Die relative Konzentration des zu detektierenden Analyten steigt an und mit dem Nachweis interferierende Komponenten werden entfernt. Dies vermindert die nachfolgenden analytischen Probleme erheblich. Wählt man beispielsweise eine Hybridisierung zum Nachweis, so findet diese für gewöhnlich in wässrigem Hybridisierungspuffer statt. D.h. die originale lipophile Umgebung der Probe muss weitgehend entfernt werden und die Proben können nicht direkt zur Hybridisierung eingesetzt werden.

Zur Probenanreicherung sind sogenannte Kartuschen kommerziell erhältlich, die, je nach Erfordernis, mit den verschiedensten stationären Phasen gepackt sind. Auf diese Weise lassen sich kleine Probenvolumina effektiv und schnell anreichern, sobald die Methode etabliert ist. Im Prinzip handelt es sich bei der Methodik um eine (relativ) selektive Extraktion eines Analyten an einer festen Phase. Im Falle der lipophilisierten DNA könnte dies bedeuten, dass der Komplex, welcher in Dichlorethan auf die Säule aufgebracht wird, zunächst auf dieser haftet aufgrund seiner die Polarität betreffenden Verwandtschaft zur lipophilen stationären Phase. Der anschließende Stufengradient zu höheren Wassergehalten hin könnte den in geringer Konzentration vorliegenden, adsorbierten Komplex zerstören, da beide Komponenten, DNA und quartäres Ammoniumsalz (s. Abbildung 4-7), leicht wasserlöslich sind. Bei der Herstellung des Komplexes ist die Situation verschieden, da beide Komponenten zwar in wässrigem Medium, aber hoher Konzentration vorliegen.

DNA

Zur Etablierung eines Extraktions- und Anreicherungsverfahrens über Kartuschen findet doppelsträngige, lipophilisierte Lachs-DNA Verwendung. Diese wird vorgelöst und im Anschluss in die zu dotierende Flüssigkeit eingebracht. Das Festphasenmaterial konditioniert man mit Dichlorethan, um das Nujol/Dichlorethan-Gemisch von der DNA trennen zu können. Letzteres wird in einem Volumen von 1 ml auf das Säulenmaterial gegeben. Mit 2 x 1 ml Dichlorethan, 2 x 1 ml Methanol/Dichlorethan sowie 2 x 1 ml Methanol erfolgt das Entfernen der lipophilen Komponenten sowie überschüssiger, nicht adsorptiv gebundener, lipophilisierter DNA. Ein deutlicher Anstieg in der UV-Absorption kann in den ersten beiden Fraktionen, vermutlich aufgrund einer Überladung der Säule, gemessen werden. Jedoch eluiert auch mit den folgenden Fraktionen meist etwas DNA (s. Abbildung 4-8). Die Umstellung des Eluats auf hydrophile Solventien geschieht über 2 x 1 ml Methanol, 2 x 1 ml Methanol:Wasser 1:1 und schließlich 3 x 1 ml Elutionspuffer, in welchem die überwiegenden Anteile der adsorptiv auf der Säule gebundenen DNA-Menge enthalten ist.

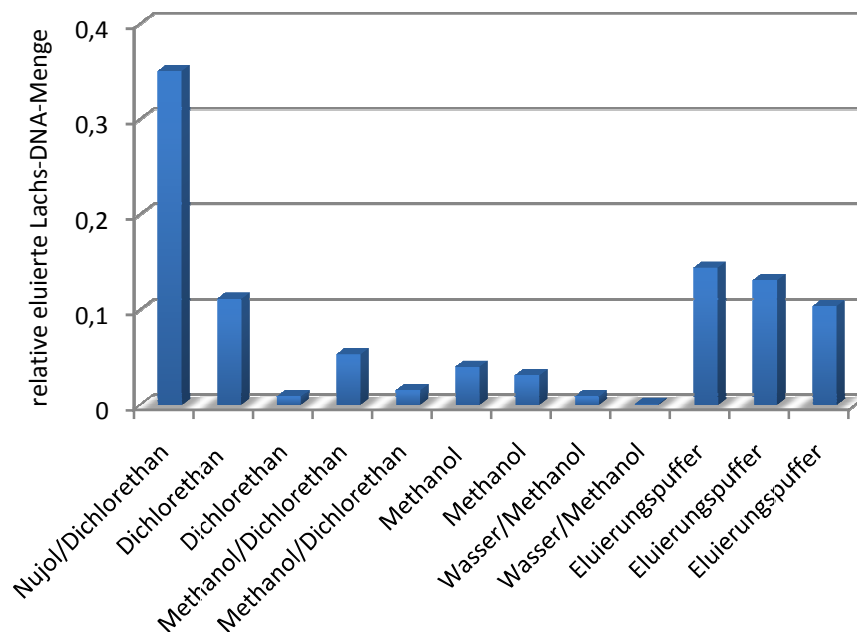


Abbildung 4-8: Relative Verteilung der eluierten Lachs-DNA in den verschiedenen Fraktionen.

Wie aus dem Diagramm hervorgeht, führt die festphasenbasierte Extraktion mittels Chromabond-Säulen zu einem erheblichen DNA-Verlust aufgrund des „verschmierten“ Elutionsverhaltens der DNA. Auch ein Wechsel der verwendeten Lösungsmittel kann dies nicht verhindern. Daher wird die Flüssig-Flüssig-Extraktion als alternative, effektivere und wenig aufwendigere Trennungs- sowie Anreicherungs-möglichkeit mit dem Ziel einer verbesserten DNA-Wiederfindung eruiert. Das Verfahren wird zunächst an Nujolgemischen getestet, da Sonnenblumenöl bzw. Diesel Eigenabsorption aufweisen und sich beim Ausschütteln mit wässrigen Medien in Spuren darin lösen, was zu einer erhöhten Extinktion und damit zu einem falsch-positiven Signal führt.

Zur Flüssig-Flüssig-Extraktion erfolgt nach Zugabe von Wasser als polare Komponente zum lipophilen, die Lachs-DNA enthaltenden Medium ein fünfminütiges Schütteln zur effektiven Durchmischung beider Phasen. Dabei tritt die DNA in die Wasserphase über und kann somit durch Separation der wässrigen Lösung vom lipophilen Medium getrennt werden. Beispielsweise gelang unter Verwendung von 100 µl Wasser die Abtrennung der DNA aus einem Nujol/Hexan-Gemisch (1:1, 1 ml) mit einer Ausbeute von 85 %. In Verbindung mit einer geringeren Empfindlichkeit gegenüber Begleitstoffen ist die Flüssig-Flüssig-Extraktion damit der Festphasenextraktion überlegen.

Bei analoger Versuchsführung für den synthetischen Doppelstrang aus T1_DNA und Anti_T1 kann dieser mit einer Ausbeute von 86 % wiedergewonnen werden. Aus bereits erwähnten Gründen findet der Nachweis nur mit dem Nujol/Hexan-Gemisch statt.

PNA

Zur Etablierung eines Festphasenextraktionsverfahrens werden 5 µl des Oligomeren T3_PNA in 100 µl Wasser gelöst. Eine RP18-Kartusche wird durch Passage von 2 ml Wasser/Acetonitril (1:1), 2 ml Wasser/Acetonitril (10:1) und zuletzt 2 ml Wasser auf Wasser äquilibriert. Anschließend wird die PNA-Lösung durch die Kartusche gepresst. Das Filtrat zeigt keine UV-Absorption, so dass die Festphase das PNA-Oligomere adsorptiv zurückgehalten hat. Nachfolgend werden 2 x 500 µl Wasser/Acetonitril (1:1) und 2 x 500 µl Wasser/Acetonitril (10:1) durchgepresst. Die

entstandenen Fraktionen zeigen messbare UV-Extinktionen, d.h. aus wässriger Lösung lässt sich das Oligonukleotid T3_PNA auf RP18-Material adsorptiv herausfiltern. Mit Acetonitril/Wasser kann das adsorbierte Oligomere desorbiert und somit eluiert werden.

In PNA-markierter, lipophiler Umgebung ist das Oligomer jedoch im lipophilen Medium gelöst, nicht wie eben beschrieben, in Wasser. Lösungen von T3_PNA in Nujol/Dichlormethan (oder Hexan), letzteres zur Viskositätserniedrigung, wurden deshalb direkt durch eine RP18-Kartusche filtriert.

Aus Nujol/Dichlormethan

Zu 120 µl Nujol/Dichlormethan (3:1) werden 2 µl T3_PNA (in Wasser) zugegeben. Nach 5 min Ultraschall transferiert man die Lösung auf eine RP18- Kartusche. Deren Festphase ist zuvor mit 1 ml Methanol, 2 ml Methanol/Dichlormethan (1:1) und 2 ml Dichlormethan auf letzteres äquilibriert worden. Nach Aufgabe der Nujol/Dichlormethan-Lösung wird mit 2 x 500 µl Dichlormethan, 2 x 500 µl Dichlormethan/Acetonitril (1:1) gewaschen. Die entstehenden Fraktionen zeigen eine UV-Absorption von 0,132, 0,067, 0,047 und 0,003. Die Summe entspricht 80,8 % der eingesetzten PNA-Menge.

Aus Nujol/Hexan

Ein zu dem eben beschriebenen analoger Versuch wird in Nujol/Hexan, dotiert mit T3_PNA durchgeführt. Es werden keine verwertbaren Ergebnisse erzielt.

Beide Versuche führen nicht zum gewünschten Ziel, da, wie bei den vorhergehenden Versuchen der Festphasenextraktion der DNA, auch hier ein stark schleppendes Elutionsverhalten der PNA zu beobachten ist und diese somit nicht in einer Fraktion isoliert werden können.

Daneben reagieren adsorptive Verfahren empfindlich auf zu hohe Fremdanteile. Ein einfaches Verfahren, dieses Problem zu überwinden, bietet, wie bereits im vorherigen Abschnitt dargelegt, die Flüssig-Flüssig-Extraktion. Es wird je eine Lösung von T3_PNA in Nujol/Hexan und Sonnenblumenöl/Hexan direkt mit 0,5 M HCl extrahiert. Dies soll die Tatsache ausnutzen, dass sich Stickstoffbasen, wie in PNAs vorhanden, mit Säuren protonieren und sich so auf einfache Weise aus

organischen, lipophilen Medien in die wässrige Säure extrahieren lassen. Aufgrund der potentiellen Hydrolyse unter sauren Bedingungen wurde diese Methode für die DNA nicht untersucht.

Extraktion aus Nujol/Hexan (1:1)

2 µl T3_PNA in 5 µl Dioxan werden zu 1 ml Nujol/Hexan (1:1) gegeben. Nach fünf Minuten Ultraschallbehandlung wird die Lösung mit 120 µl 0,5 M Salzsäure versetzt, wiederum fünf Minuten beschallt, danach die gleiche Zeit bei 1000 G zentrifugiert. In der im Anschluss abgenommenen Wasserphase finden sich 68,8 % der ursprünglich eingesetzten PNA-Menge wieder.

Ein analoger Versuch mit Ölen, extrahiert mit 0,1 M Trifluoressigsäure, wird nicht durchgeführt, da sowohl Sonnenblumen- als auch Dieselöl bereits ohne PNA-Zusatz einen hohen Blindwert liefern, aufgrund dessen selbst eine grobe Abschätzung der wiedergefundenen PNA-Menge nicht möglich ist. In Anbetracht der vielkomponentigen Zusammensetzung der Öle ist dies nicht überraschend. Hier zeigt sich wiederum der Vorteil, für Methodenentwicklungen das nicht UV-absorbierende Nujol zu benutzen.

Die Probleme hoher UV-Blindwerte lassen sich umgehen, wenn man nicht die UV-Photometrie als Detektionsmethode wählt. Sie leistet aber bei der Methodenentwicklung wegen ihrer Einfachheit sehr gute Dienste.

4.3 Detektion extrahierter Oligomere mit *Molecular Beacons*

4.3.1 Aufbau des Nachweissystems

Das Prinzip der DNA-Hybridisierungsmethoden basiert auf Wechselwirkung der nachzuweisenden Basenabfolge (Zielsequenz) mit einem mindestens zu einem Teilabschnitt komplementären Oligomer (Sonde) in geeigneter Umgebung, was zur Ausbildung eines doppelsträngigen Hybrids führt. Letzteres Ereignis zeigt sich in der

Routineanwendung durch die z.B. radioaktive oder fluoreszente Markierung wenigstens einer der beiden Komponenten. Die praktische Ausführung bedient sich seit einigen Jahren sogenannter Biochips (*Microarrays*). Das können beispielsweise gläserne Objektträger sein, die adsorptiv oder auch kovalent aufgebrachte *Spots* der Hybridisierungspartner bzw. der Sonde im Mikrometerbereich tragen. Diese neuere Methode der Hybridisierungstechnik erlaubt den (automatisierten) Durchsatz großer Probenzahlen bei kleinen Probenmengen.

Für PNAs existieren ebenfalls die für DNA beschriebenen Detektionsmethoden, d.h. spezifische PNAs lassen sich damit durch Hybridisierung (auch in der Chipversion) nachweisen.

Wählt man zur Detektion spezifischer PNA- oder DNA-Oligomere methodisch die Hybridisierung, so kann ein *Molecular Beacon* (MB) als Sonde dienen [Tan 2004].

Für die praktische Anwendung gibt es folgende Empfehlungen:

- Das nachzuweisende Target muss in den Stamm des MB hineinreichen.
- Die Stammlänge soll kurz, jedoch nicht zu kurz sein, z.B. fünf Basen.
- Die zu detektierende Sequenz ist längstmöglich zu wählen.
- Die Schleifenlänge soll ca. 12 Basen betragen.

Aufgrund der genannten Kriterien wurde der in Abbildung 4-9 gezeigte *Molecular Beacon* gestaltet. Die Löschung des Farbstoffs Atto 655 erfolgt bei dem MB_ATTO655 via Guanin, für den MB_DABCYL über den *Quencher* DABCYL.

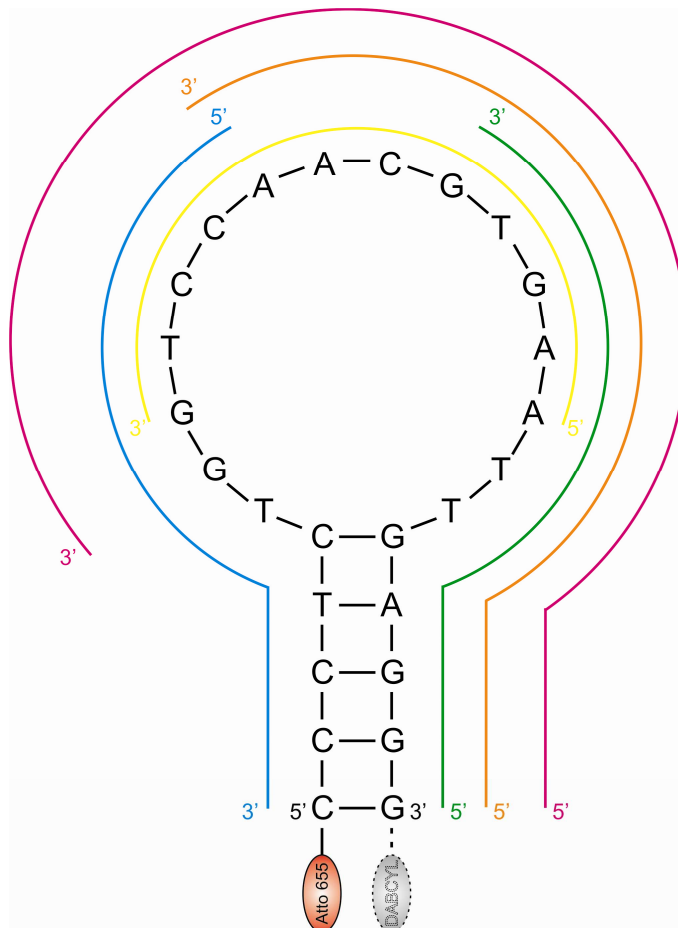


Abbildung 4-9: *Molecular Beacon* aus DNA, mit Atto 655 am 5'-Ende (MB_ATTO655, Guaninlöschung) bzw. mit Atto 655 am 5'-Ende sowie DABCYL am 3'-Terminus (MB_DABCYL). Die komplementären Zielsequenzen sind durch farbige Ringe dargestellt, wobei gelb für T1, blau für T2 sowie grün für T3 (12mere aus DNA bzw. PNA) steht. Orange symbolisiert das PNA-15mer T4_PNA und violett das PNA-20mer T5_PNA.

Die Oligomerlängen von 12 bis 20 Nukleotiden gewährleisten sowohl eine ausreichende Spezifität als auch eine hohe Vielfalt alternativer Sequenzen. Gleichzeitig sind die Einzelstränge kurz genug, um einen eventuellen SNP nicht zu tolerieren und damit die Sicherheit des Tests zu erhöhen. Die gezielte statistische Verteilung von Cytosin, Guanin, Adenin sowie Thymin vermeidet problematische Basenabfolgen.

4.3.2 Detektion mittels *Microarray*-Scanner

Das Auslesen des Fluoreszenzsignals der *Molecular Beacons* erfolgt mittels *Microarray*-Scanner. Dies gewährleistet die höhere Empfindlichkeit, da durch Aufbringung der Probenlösung und anschließender Trocknung die lokale Konzentration der Fluorophore auf der Glasoberfläche stark erhöht ist.

4.3.2.1 Charakterisierung des *Molecular Beacon*

Die folgenden Vorversuche dienen zur Abschätzung der Reaktivität sowie Spezifität der eingesetzten *Molecular Beacon*. Da die beiden verwendeten Sonden aus derselben Basenabfolge bestehen, weisen sie ein identisches Verhalten auf, weshalb in diesem Abschnitt lediglich auf die Resultate des MB_DABCYL eingegangen wird. Abbildung 4-10 zeigt die Schmelzkurve des 2 μ M MB_DABCYL ohne (blau) und mit 8 μ M komplementärer Gegensequenz T3_DNA (rot) in Bindungspuffer A.

Aus der Darstellung geht hervor, dass die theoretische Schmelztemperatur von 66 °C mit der experimentell erhaltenen übereinstimmt. Ebenso bestätigt sich die via *mFold* ermittelte Schmelztemperatur mit dieser Gegensequenz von 47 °C. Des Weiteren erzeugt die Anwesenheit der komplementären T3_DNA einen fünffachen Fluoreszenzanstieg.

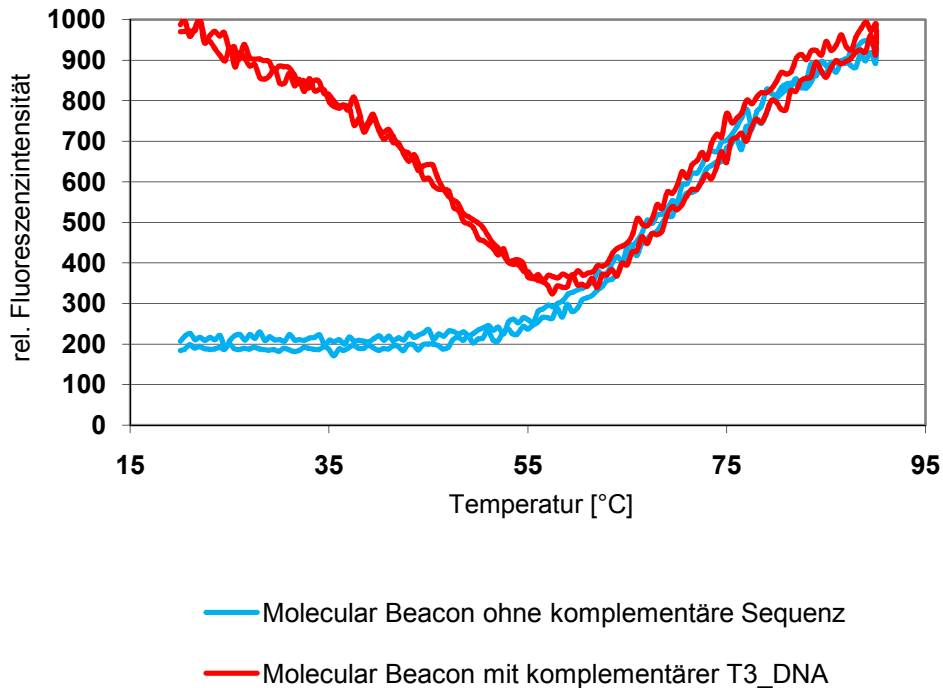


Abbildung 4-10: Schmelzkurven des *Molecular Beacon* ohne und mit komplementärer T3_DNA-Gegensequenz. Der Temperaturgradient beträgt 1 °C pro Minute und reicht von 20 bis 90 °C und zurück.

Zur Verifizierung der selektiven Hybridisierung der verwendeten Sondensequenz wird diese mit verschiedenen komplementären als auch nicht-komplementären DNA-Oligomeren versetzt und zusammen mit einem Blindwert ohne Gegensequenz zur Detektion auf einen Objektträger aufgebracht. Die Gegensequenzen liegen hierbei in 20-fachem Überschuss relativ zur Sonde vor. Die erhaltenen Signale sowie die daraus errechneten relativen Intensitäten sind Inhalt von Abbildung 4-11.

Daraus geht eindeutig hervor, dass sich die Sonde nur an komplementäre Gegensequenzen anlagert und damit das entsprechende fluoreszente Hybrid bildet. Zwar generieren die Proben mit nicht-komplementären Basenabfolgen leicht erhöhte Werte (Faktor 2), welche jedoch deutlich geringer als die der Positivproben mit Faktoren von 6 und 9 ausfallen und somit eindeutig von diesen unterscheidbar sind.

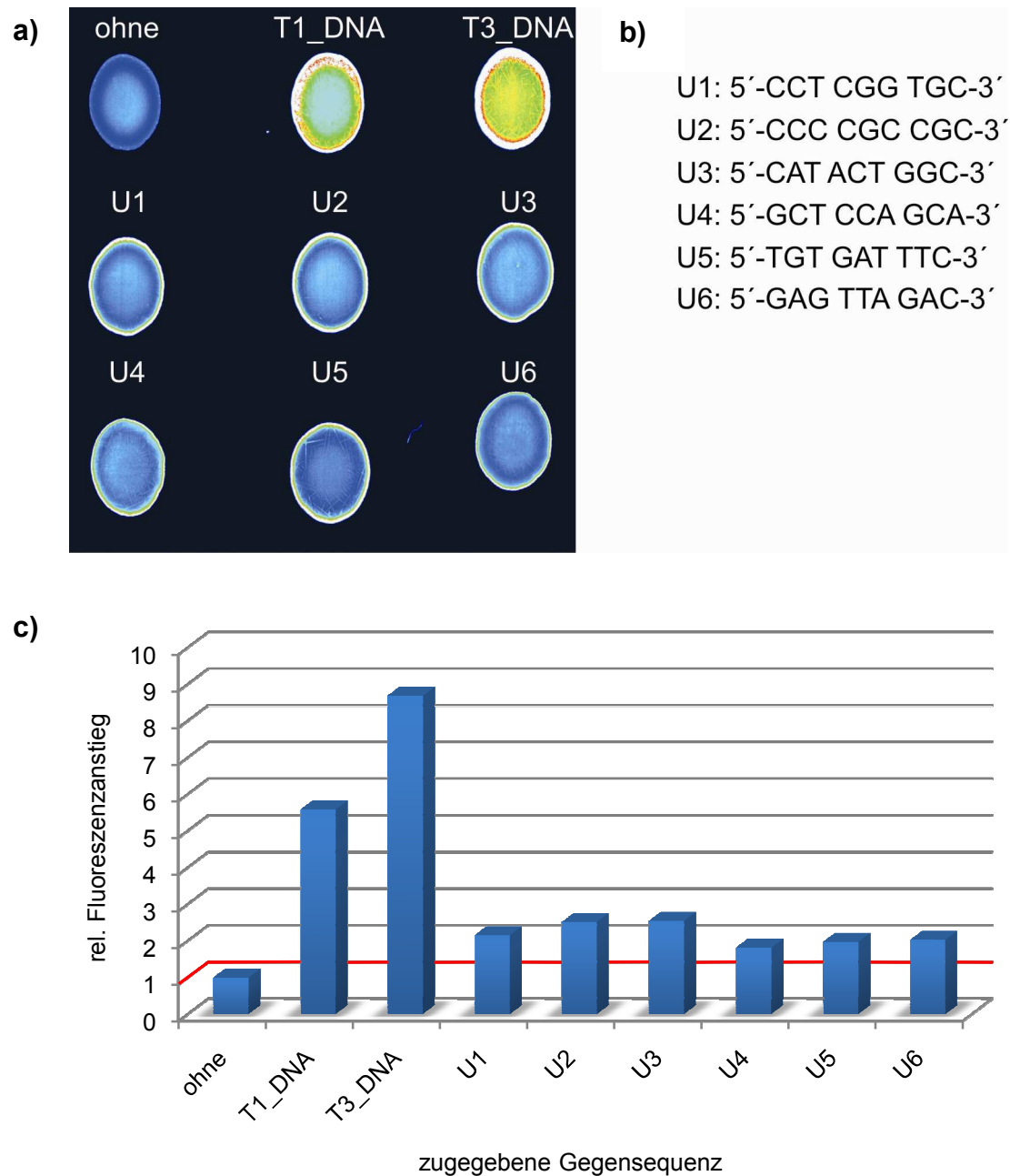


Abbildung 4-11: Spezifität der Öffnung des *Molecular Beacon* ohne bzw. mit verschiedenen komplementären (T1_DNA, T3_DNA) und nicht-komplementären Gegensequenzen U1 - U6 (s. **b**). **a)** Mittels Fluoreszenzscanner detektierte Signale auf dem Glasobjektträger, **c)** auf die Blindprobe normierte, relative Fluoreszenzanstiege der Signalintensitäten aus **a)**, errechnet unter Verwendung der Analysesoftware *GenePix*.

4.3.2.2 Etablierung der Hybridisierungsbedingungen

Zunächst wird ermittelt, auf welche Weise sich *Molecular Beacon* und komplementäre Gegensequenz begegnen müssen, um maximale Fluoreszenzantwort zu erreichen. Als Alternative betrachtet man:

- Nitrozellulose- (FAST *Slides*) versus Glasobjektträger
- sequenzielles Auftragen gegen Vormischen der Probenlösungen
- MB_ATTO655 oder MB_DABCYL zur Hybridisierung mit komplementären DNA- bzw. PNA-Sequenzen.

Im Vergleich zur nitrozellulosebeschichteten Oberfläche, welche nur einen Intensitätsanstieg von 1,1 erbringt, ist bei einem Glasobjektträger ein Zuwachs um den Faktor 2,6 zu registrieren. Nach den in Abbildung 4-12 dargestellten Resultaten finden alle weiteren Versuche auf Glasoberflächen statt.

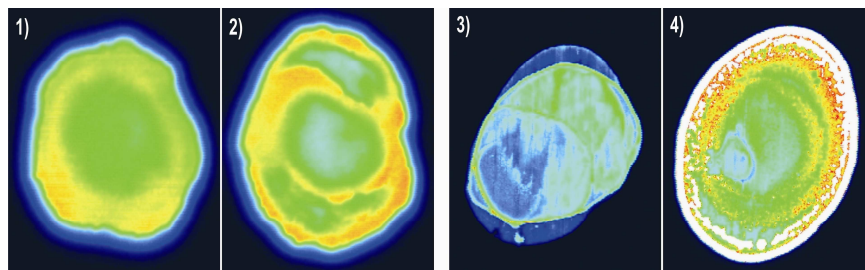


Abbildung 4-12: Aufnahmen der Nitrozellulose- und Glasoberfläche mittels *Microarray*-Scanner.
1) MB_ATTO655 auf Nitrozellulose; 2) MB_ATTO655 + T1_DNA auf Nitrozellulose;
3) MB_ATTO655 auf Glas; 4) MB_ATTO655 + T1_DNA auf Glas.

Im nächsten Schritt erfolgt die Untersuchung der Art und Weise der Auftragung des Probenmaterials auf die Oberfläche. Es stellte sich heraus, dass das Vormischen von Oligomer und Sonde im Reaktionsgefäß und anschließendes Aufbringen auf die Oberfläche höhere Signalintensitäten generiert als das direkte sequenzielle Auftragen der beiden Reaktionspartner auf den Objektträger. Dies ist insofern verständlich, als dass der Hybridisierung, im Gegensatz zu der schnell eintrocknenden Flüssigkeit auf dem Glas, in Lösung mehr Reaktionszeit verbleibt. Aufgrund dessen mischt man in den Folgeexperimenten stets beide Komponenten vor.

Abbildung 4-13 beinhaltet die vergleichende Darstellung der relativen Fluoreszenzanstiege beider *Molecular Beacons* in Anwesenheit verschiedener DNA- sowie PNA-Oligomeren in Wasser und Bindungspuffer A. Anhand der höheren Intensitätszunahmen des MB_DABCYL wird dieser für alle weiteren Experimente verwendet. Er weist gegensequenzunabhängig in Bindungspuffer A etwa doppelt so hohe Anstiege auf wie der nur via Guanin gelöschte MB_ATTO655.

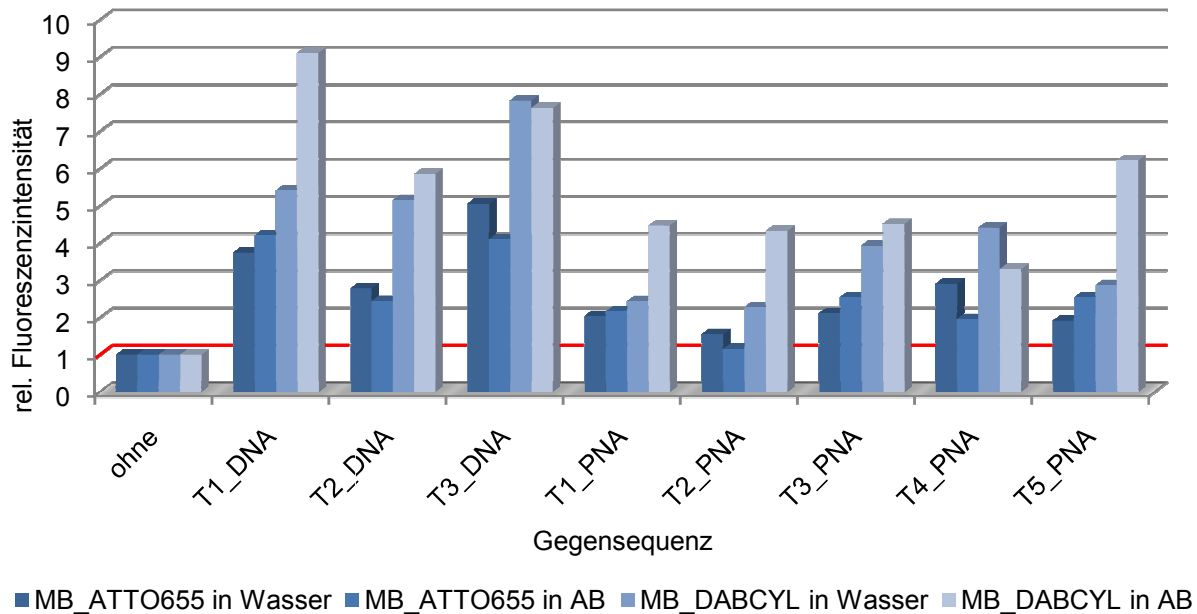


Abbildung 4-13: Vergleich der relativen Fluoreszenzanstiege aufgrund von Hybridisierungen der beiden *Molecular Beacons* (5 μ M) in Wasser und Bindungspuffer A mit verschiedenen DNA- sowie PNA-Zielsequenzen (100 μ M).

4.3.2.3 Zeitabhängige Entwicklung des Fluoreszenzsignals

Um die Öffnungskinetik des *Molecular Beacon* zu beurteilen, erfolgt die Registrierung des Fluoreszenzsignals als Funktion der Zeit. Es werden 9 μ l einer 10 μ M Lösung aus MB_DABCYL mit jeweils T1_DNA, T2_DNA oder T3_DNA hergestellt (molares Verhältnis Sonde:Gegensequenz 1:1). Von diesen entnimmt man je 0,5 μ l im Abstand von einer Minute (1. bis 4. Minute), von zwei Minuten (6. bis 20. Minute) und von 10 Minuten (20. bis 60. Minute), trägt sie auf Glasobjektträger auf und misst mittels Fluoreszenzscanner. Nach Auswertung der durch das Programm *GenePix*

erhaltenen Werte ist ersichtlich, dass die Reaktion in kürzester Zeit komplett abläuft, da die detektierten Fluoreszenzintensitäten bereits nach einer Minute ihr endgültiges Niveau erreicht haben.

4.3.2.4 Konzentrationsabhängigkeit des Fluoreszenzsignals

Im Weiteren thematisieren die Versuche den Einfluss verschiedener Konzentrationen der Oligomere T3_DNA sowie T3_PNA auf die Öffnung des MB_DABCYL bzw. den damit verbundenen Fluoreszenzanstieg. In Abbildung 4-14 ist die Intensität des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit sinkender Konzentrationen dargestellt. Wie zu erkennen, erfordert T3_DNA die jeweils geringste Konzentration. Bei ca. $1 \cdot 10^{-6}$ M ist mit der Fluoreszenzscanmethode das erhaltene Signal bei beiden Oligomerarten nicht mehr vom Hintergrund unterscheidbar.

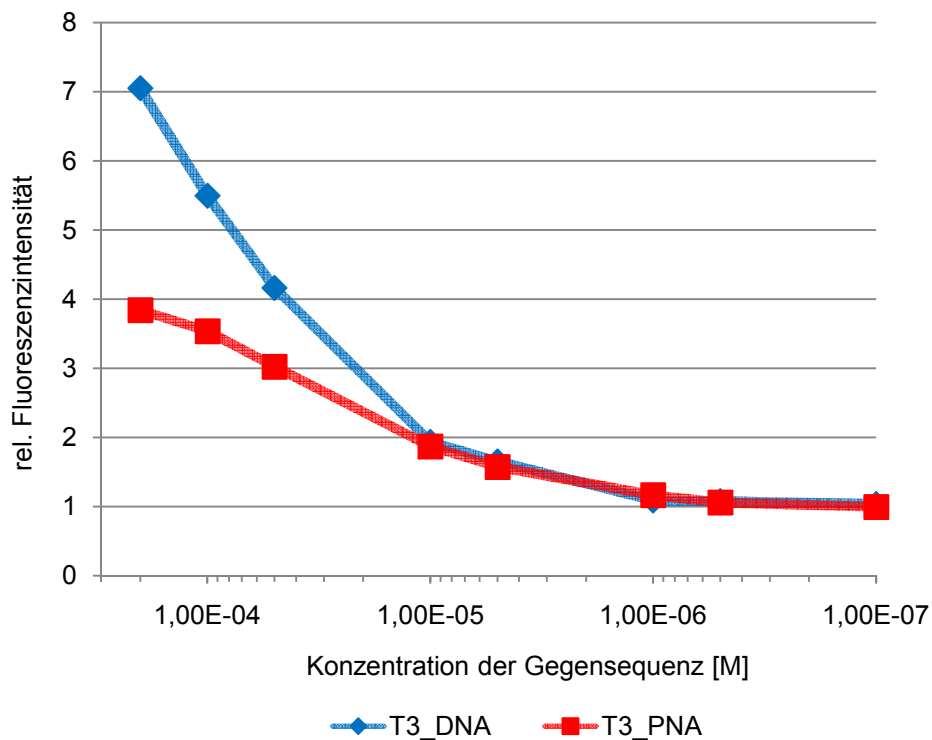


Abbildung 4-14: Fluoreszenzintensität bei Zugabe verschiedener Konzentrationen (logarithmische Auftragung) T3_DNA (blau) bzw. T3_PNA (rot) zu $5 \mu\text{M}$ MB_DABCYL. Die Werte sind auf die Fluoreszenzintensität der geschlossenen Sonde ohne Gegensequenz normiert.

4.3.2.5 Nachweis der extrahierten Oligonukleotide

Nach Extraktion der lipophilisierten dsDNA aus lipophilen Medien, wie in Kapitel 4.2.4 beschrieben, wird die Lösung bis zur Trockene eingengt, in Bindungspuffer A aufgenommen, für fünf Minuten auf 97 °C erhitzt, auf Eis abgekühlt und unverzüglich zu dem MB_DABCYL gegeben. Im Anschluss erfolgt die Detektion auf einem Glasobjektträger mittels Fluoreszenzscanner sowie die Auswertung durch die Software *GenePix*, deren Ergebnisse in Abbildung 4-15 zu sehen sind.

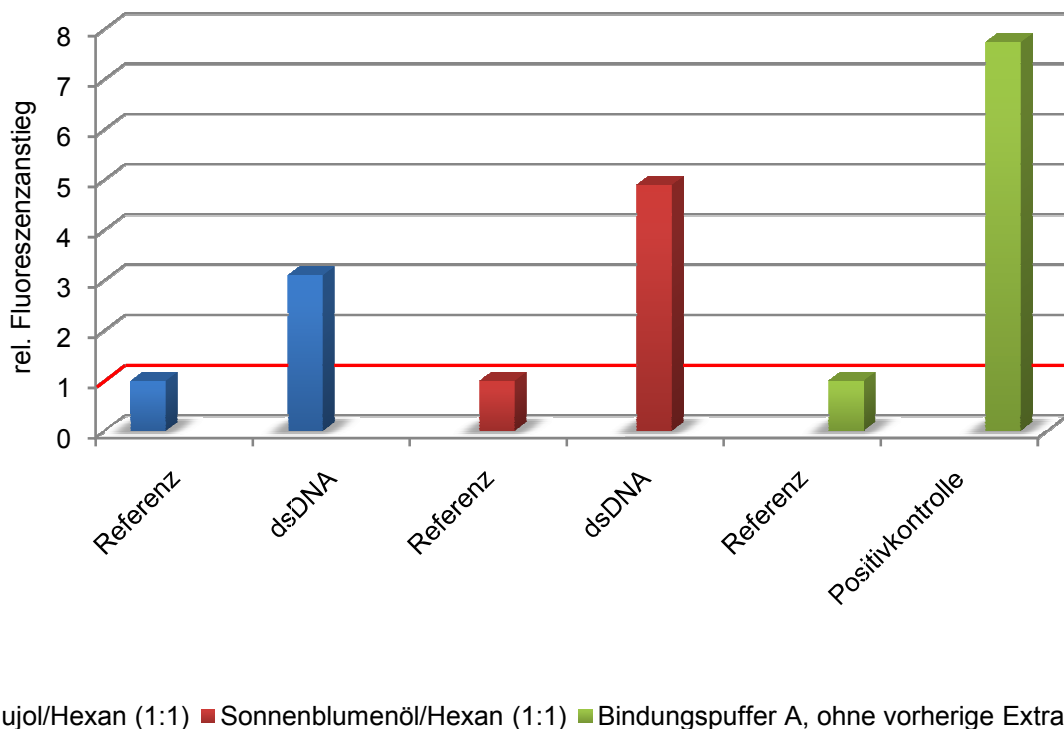


Abbildung 4-15: Öffnung des 5 μM MB_DABCYL mittels aus lipophilen Medien extrahierter, synthetischer dsDNA (T1_DNA + Anti_T1) in Bindungspuffer A. Die DNA-Konzentration der Positivkontrolle, wie die der extrahierten dsDNA, beträgt 200 μM . Die Detektion erfolgt nach Auftragen der Proben auf Glasobjektträger durch den *Microarray*-Scanner. Dargestellt sind relativen via *GenePix* ermittelten Fluoreszenzanstiege in Relation zu den jeweils DNA-freien Extrakten.

Trotz gleicher Konzentration der Positivkontrolle und der aus den lipophilen Medien extrahierten sowie aufkonzentrierten dsDNA kommt es bei letzteren zu einem geringeren Fluoreszenzanstieg als dem erwarteten. Im Gegensatz zu einer Zunahme

der Intensität um den Faktor 7,7 bei der Positivkontrolle, erreicht die aus Nujol/Hexan (1:1) gewonnene dsDNA nur eine 3,1-fache und die aus Sonnenblumenöl/Hexan (1:1) eine 4,9-fache Steigerung. Dies können unerwünschte Begleitkomponenten hervorrufen, welche aus den Flüssigkeiten isoliert werden und so die Öffnung des *Molecular Beacon* oder den Nachweis durch Hybridisierung negativ beeinflussen.

Da bei vergleichbaren Versuchen mit Diesel/Hexan (1:1) die gemessene Fluoreszenzzunahme bereits ohne dsDNA die Positivkontrolle um das Doppelte übersteigt, kann auch hier davon ausgegangen werden, dass mittels Extraktion nicht nur die gewünschte dsDNA sondern ebenfalls Stoffe ausgeschüttelt werden, welche zu einem falsch-positiven Resultat führen. Dementsprechend können aus Experimenten mit Diesel/Hexan (1:1) keine verwertbaren Daten gewonnen werden.

Dasselbe ist ebenfalls für mit PNA-markierten Dieselproben zu beobachten. Auch bei saurer Extraktion ist es nicht möglich, die störenden Begleitsubstanzen zu eliminieren.

Beim Versuch der PNA-Detektion durch Öffnung des MB_DABCYL, nach Extraktion aus einem 1:1-Nujol/Hexan-Gemisch, wird die Salzsäurephase durch Vakuumzentrifugation entfernt. Nach anschließender Aufnahme in 1 µl AB erfolgt die Zugabe von 2 µl MB_DABCYL-Lösung (Endkonzentration der Sonde 5 µM). 0,5 µl dieser Lösung pipettiert man auf einen Glasobjektträger, welcher nach dem Trocknen gescannt wird. Es kann lediglich eine um das 1,8-fache verstärkte Fluoreszenz gegenüber dem Referenzwert detektiert werden (s. Abbildung 4-16, blaue Balken).

Die Fluoreszenzanstiege nach Isolierung der PNA aus Sonnenblumenöl/Hexan (1:1) repräsentieren die roten Balken. Auch hier ist der erwartete maximale 3,7-fache Anstieg der Vergleichsprobe, welche zuvor nicht in lipophilisierten Medien gelöste PNA enthält (grüne Balken), nicht erreicht worden. Er beträgt lediglich das 2,7-fache. Die aus Sonnenblumenöl/Hexan (1:1) vergleichend extrahierten, zur erhöhten Lipophilie mit Phenylalaninresten modifizierten PNAs erbrachten mit relativen Anstiegen von 2,1 (F-T3-F) bzw. 2,4 (F3-T3-F3) nochmals leicht geringere Signalzuwächse (rote Balken). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die angebundenen Phenylalanine keinen positiven Einfluss auf die Löslichkeit bzw. den Nachweis im Allgemeinen haben. Aufgrund dessen sowie wegen des zusätzlichen

Arbeits- und Kostenaufwands wird auf derartige Modifikationen im Folgenden verzichtet.

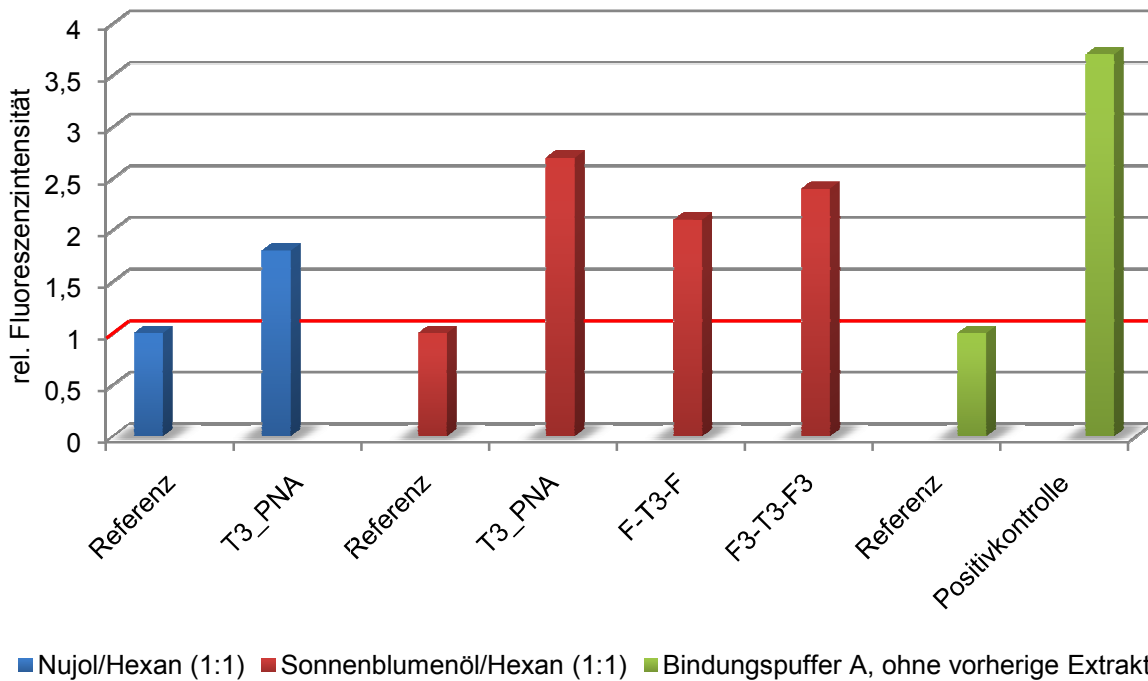


Abbildung 4-16: Öffnung des 5 μM MB_DABCYL mittels aus lipophilen Medien sauer extrahierter PNA in Bindungspuffer A. Die PNA-Konzentration der Positivkontrolle, wie die der extrahierten PNA, beträgt 200 μM . Neben der nicht-modifizierten T3_PNA wird auch eine solche mit je einem bzw. drei Phenylalaninresten am N- sowie C-Terminus zur Erhöhung der Lipophilie (F-T3-F, F3-T3-F3) aus den entsprechenden Flüssigkeiten isoliert. Die Detektion erfolgt nach Auftragen der Proben auf Glasobjektträger durch den *Microarray*-Scanner. Dargestellt sind relativen via *GenePix* ermittelten Fluoreszenzanstiege in Relation zu den jeweils PNA-freien Extrakten.

Wie bereits bei den Ergebnissen der dsDNA können auch mit (modifizierten) PNAs nicht die Werte erreicht werden, welche die Positivkontrolle vorgibt. Aus diesem Grund, sowie wegen der hohen benötigten Konzentration für einen erfolgreichen Test, soll im Anschluss untersucht werden, ob Nachweise in Lösung bessere Resultate liefern als solche auf Objektträgern. Eventuell sind dabei die den oberflächenbasierten Nachweis störenden extrahierten Begleitkomponenten weniger hinderlich.

4.3.3 Detektion des Fluoreszenzsignals in Lösung

Die Detektion in Lösung erfolgt in 384-*well*-Platten (*Sensoplate*), um die Verwendung von Hochdurchsatzverfahren auch hier zu ermöglichen. Das Auslesen der Werte geschieht daher mittels *Typhoon*, einem Fluoreszenzflachbettscanner, welcher aufgrund der verstellbaren Fokustiefe in der Lage ist, in auf der Oberfläche befindlichen, geeigneten Gefäßen die Fluoreszenzsignale von Lösungen empfindlich zu erfassen. Die eingesetzten MB_DABCYL-Konzentrationen betragen bei diesem Detektionsverfahren zwischen $2 \cdot 10^{-9}$ M und $2 \cdot 10^{-11}$ M. Wie aus Abbildung 4-17 hervorgeht, sind jedoch nur bei $2 \cdot 10^{-9}$ M Sondenkonzentration in Verbindung mit mindestens $5 \cdot 10^{-8}$ M zugegebener Zielsequenz (T3_DNA) signifikante Fluoreszenzanstiege zu erkennen.

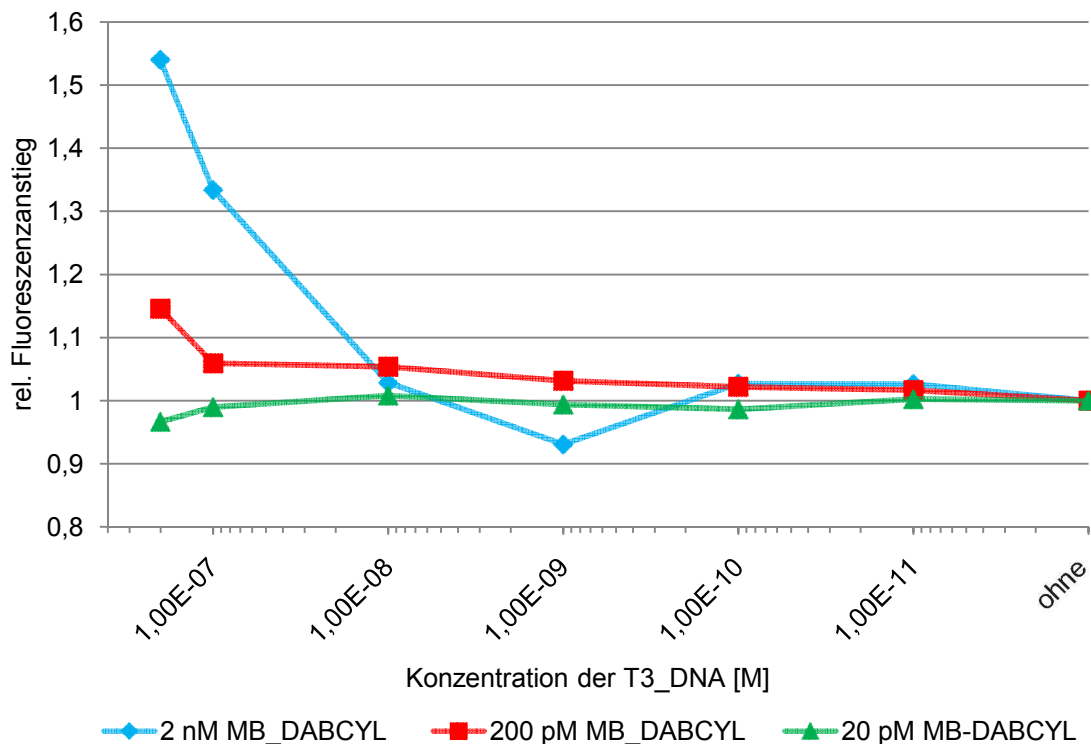


Abbildung 4-17: Fluoreszenzintensität bei Zugabe verschiedener Konzentrationen (logarithmische Auftragung) T3_DNA zu unterschiedlichen MB_DABCYL-Konzentrationen (blau: 2 nM; rot: 200 pM; grün: 20 pM). Die Werte sind auf die Fluoreszenzintensität der geschlossenen Sonde ohne Gegensequenz normiert.

Da das bei diesem Verfahren benötigte minimale Probenvolumen von 50 μ l jedoch um den Faktor hundert über dem des oberflächenbasierten Systems liegt, kompen-

siert sich damit die hundertfach niedrigere Nachweisgrenze von $5 \cdot 10^{-8}$ M gegenüber der oberflächenbasierten von $5 \cdot 10^{-6}$ M. Somit beträgt das Limit beider Detektionssysteme 2,5 pmol DNA. Aufgrund dessen ist der Einsatz des *Typhoon*-Scanners zur Detektion in Lösung ebenfalls nicht geeignet, um die benötigte DNA-Menge zu senken. Daher wird nach einem empfindlicheren Nachweissystem gesucht.

4.4 Nachweis mittels oberflächengebundener DNA- und PNA-Oligomeren

Als System mit höherer Empfindlichkeit sollen Glasobjektträger mit kovalent oberflächengebundenen DNA- bzw. PNA-Sequenzen Verwendung finden. Der Nachweis des zur Markierung eingesetzten Oligomers erfolgt über Hybridisierung mit dem komplementären Oligonukleotid auf der Oberfläche. Durch Waschschriffe des Objektträgers können eventuell extrahierte, unerwünschte Substanzen entfernt und dadurch falsch-positive Signale verringert werden.

Zur Etablierung des Verfahrens kommt ein Zweistrangsystem zum Einsatz, bei welchem die zur Markierung eingesetzte Sequenz einen Fluoreszenzfarbstoff trägt. Diese Vorgehensweise dient zunächst zum Herausfinden der Bedingungen, da sie weniger experimentelle Parameter aufweist, als das eigentlich anvisierte Dreistrangsystem.

4.4.1 Zweistrangsystem

Abbildung 4-18 zeigt die schematische Funktionsweise des Nachweissystems mittels zweier Oligonukleotidstränge: oberflächengebundene Sonden sowie fluoreszenzmarkierte Oligomere, welche zur Markierung dienen (Proben).

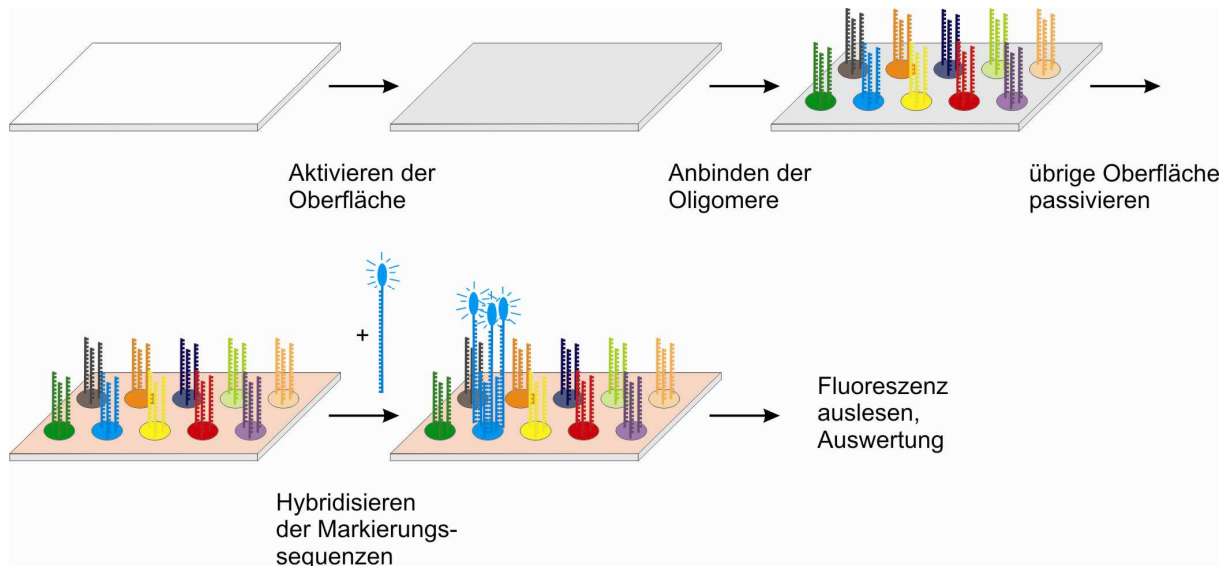


Abbildung 4-18: Nachweisverfahren des Zweistrangsystems: Die obere Reihe zeigt die Herstellung der oligomerfunktionalisierten Chips (Aktivierung, *Spotting*, Passivierung), während die untere die eigentliche Detektion darstellt (Hybridisierung der komplementären Gegensequenz, Auslesen mittels Fluoreszenzscanner, *GenePix*-Auswertung).

Zunächst wird die Glasoberfläche mittels Di-(N,N'-succinimidyl)-carbonat aktiviert. Die kovalente Anbindung verschiedener DNA- bzw. PNA-Sequenzen (*Spotting*) erfolgt anschließend. Noch freie Oberflächen werden dann durch Bernsteinsäureanhydrid deaktiviert. Dies verhindert unspezifische Oligomeradsorptionen. Schließlich hybridisieren Sonden- und Probenoligomer auf dem Chip. Dieses Ereignis wird durch einen Fluoreszenzscanner detektiert.

Auf den Oberflächen befinden sich jeweils die gleichen zehn Sondensequenzen (DNA oder PNA), welche kovalent angebunden sind. Pro Sonde finden sich in einer Reihe zehn Replikate. Hybridisierungen von Cy5-markierten DNA-Oligomeren (60 μ l 200 nM in 0,1x SSarc) an oberflächengebundene DNA- bzw. PNA-Sequenzen liefern die erwarteten Ergebnisse (s. Abbildung 4-19). Stellvertretend für derartige Versuche sei hier das Verhalten von der DNA ZS-Cy5, komplementär zu Sequenz 3, dargestellt. Sie liefert als DNA-Doppelstrang ein schwaches, aber spezifisches Signal. Die Intensitätswerte der PNA-DNA (ZS3_Cy5)-Doppelhelix fallen aufgrund der höheren Bindungsaffinität stärker, jedoch auch weniger spezifisch aus als diejenigen bei Anbindung auf DNA-modifizierten Oberflächen. Dies gilt als Ursache

dafür, dass bei Sequenz 4, welche sich von Sequenz 3 nur in einer einzigen Base unterscheidet, eine Hybridisierung zu beobachten ist.

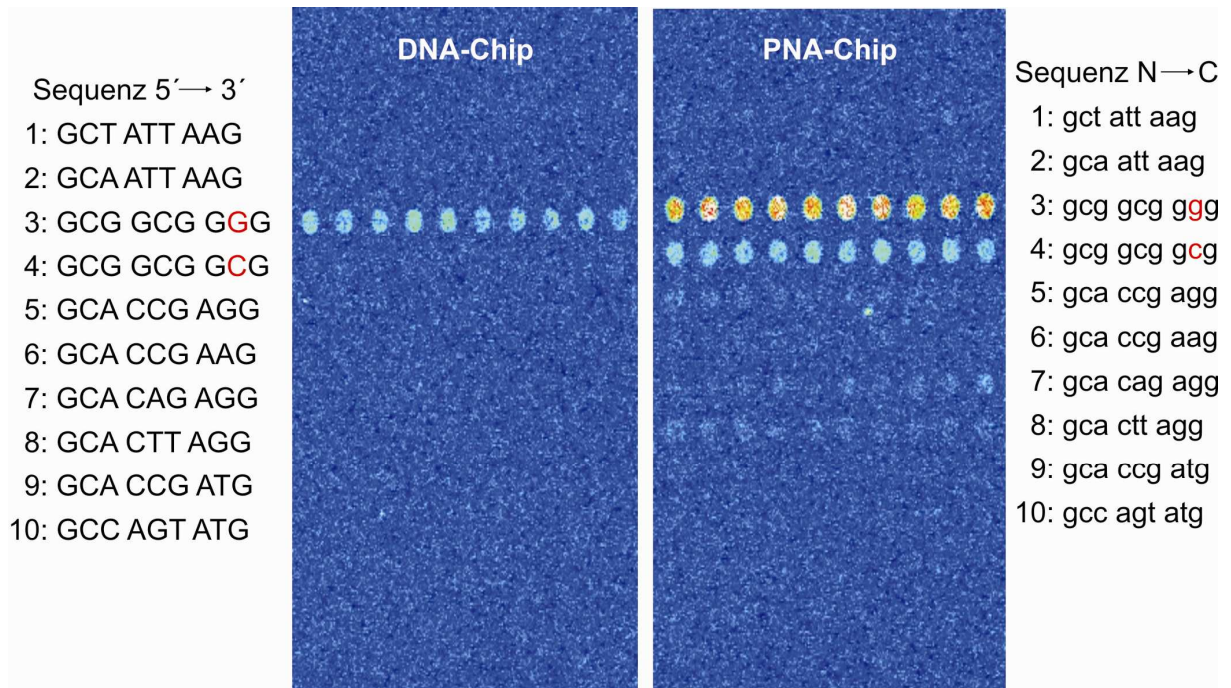


Abbildung 4-19: Via *Microarray*-Scanner ausgelesene Fluoreszenzintensitäten des DNA- sowie PNA-Chips nach zweistündiger Hybridisierung mit 60 µl der komplementären, 200 nM Gegensequenz zu 3 (ZS3_Cy5).

Die Sensitivität von 1,2 pmol DNA absolut ist um einen Faktor von 2 empfindlicher als bei den vorangegangenen Versuchen der Detektion mittels *Molecular Beacon* auf Glasoberflächen bzw. in Lösung.

Identische Experimente für den Nachweis von PNA-Markierungssequenzen scheitern jedoch an für diese DNA-Analoga unzureichender Oberflächenpassivierung, was durch PNA-Adsorption in einem hohen Hintergrund resultiert.

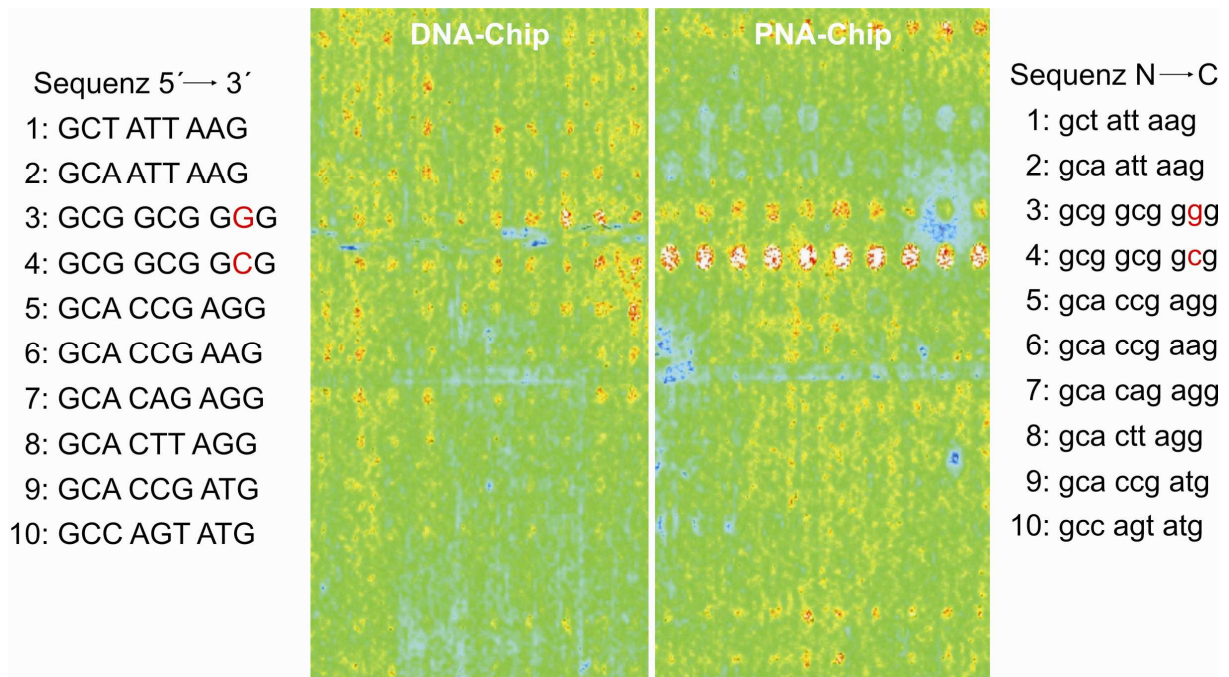


Abbildung 4-20: Via *Microarray*-Scanner ausgelesene Fluoreszenzintensitäten des DNA- sowie PNA-Chips nach achtstündiger Hybridisierung mit 60 µl der komplementären, 200 nM Gegensequenz zu 4 (ZS4_PNA_Cy5).

Da die Deaktivierung der Oberflächen mit Bernsteinsäureanhydrid für DNA-Anbindungen bzw. Hybridisierungen entwickelt wurde, kann dies einer der Faktoren sein, welche maßgeblich zu dem hohen Hintergrundsignal bei den PNA-Experimenten beitragen. Im Folgenden sollen Oberflächendeaktivierungen untersucht werden, die bezüglich des Hintergrundes geeigneter erscheinen.

4.4.2 PNA-Hybridisierung auf verschiedenen deaktivierten Oberflächentypen

Da die Bernsteinsäureanhydriddeaktivierung eine negativ geladene Oberfläche generiert, welche effektiv ebenfalls negativ geladene DNA-Moleküle abstößt, sind die Auswirkungen unterschiedlicher Oberflächenladungen im Hinblick auf ihr PNA-Repulsionsverhalten Thema dieses Abschnitts. Zur Herstellung neutraler Grenzschichten finden Essigsäureanhydrid bzw. 3-Aminopropanol Anwendung. Ethylendiamin erzeugt positive Ladungen auf Oberflächen. Einen Überblick gibt Abbildung 4-21.

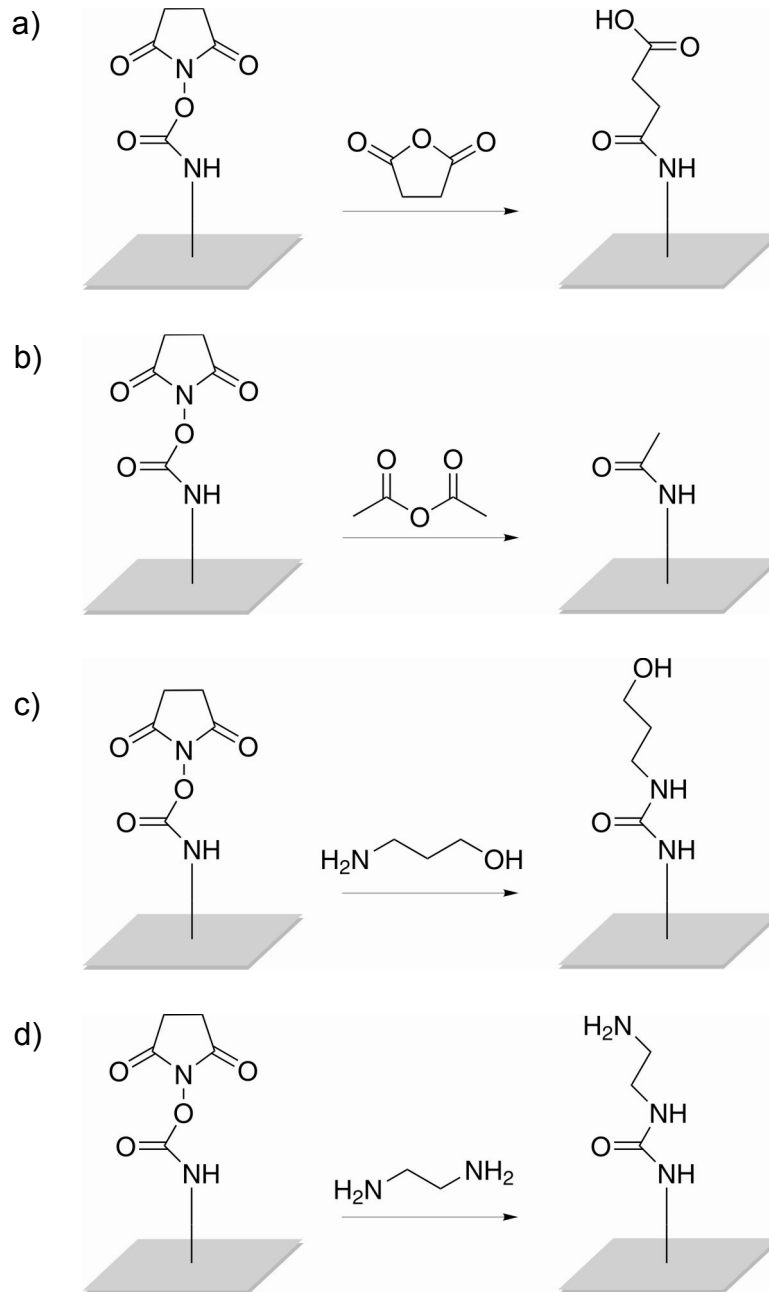


Abbildung 4-21: Verschiedene Deaktivierungsreagenzien zur Herstellung von Oberflächen mit unterschiedlicher Polarität. Hierbei ergibt **a)** Bernsteinsäureanhydrid negativ geladene, **b)** Acetanhydrid und **c)** 3-Aminopropanol neutrale bzw. **d)** Ethylendiamin positiv geladene Oberflächen.

Die jeweils damit erzielten Ergebnisse stellt Abbildung 4-22 dar. Wie daraus ersichtlich, kann das Problem des hohen Hintergrunds allein durch Variation der Oberflächenpolarität nicht vollständig beseitigt werden.

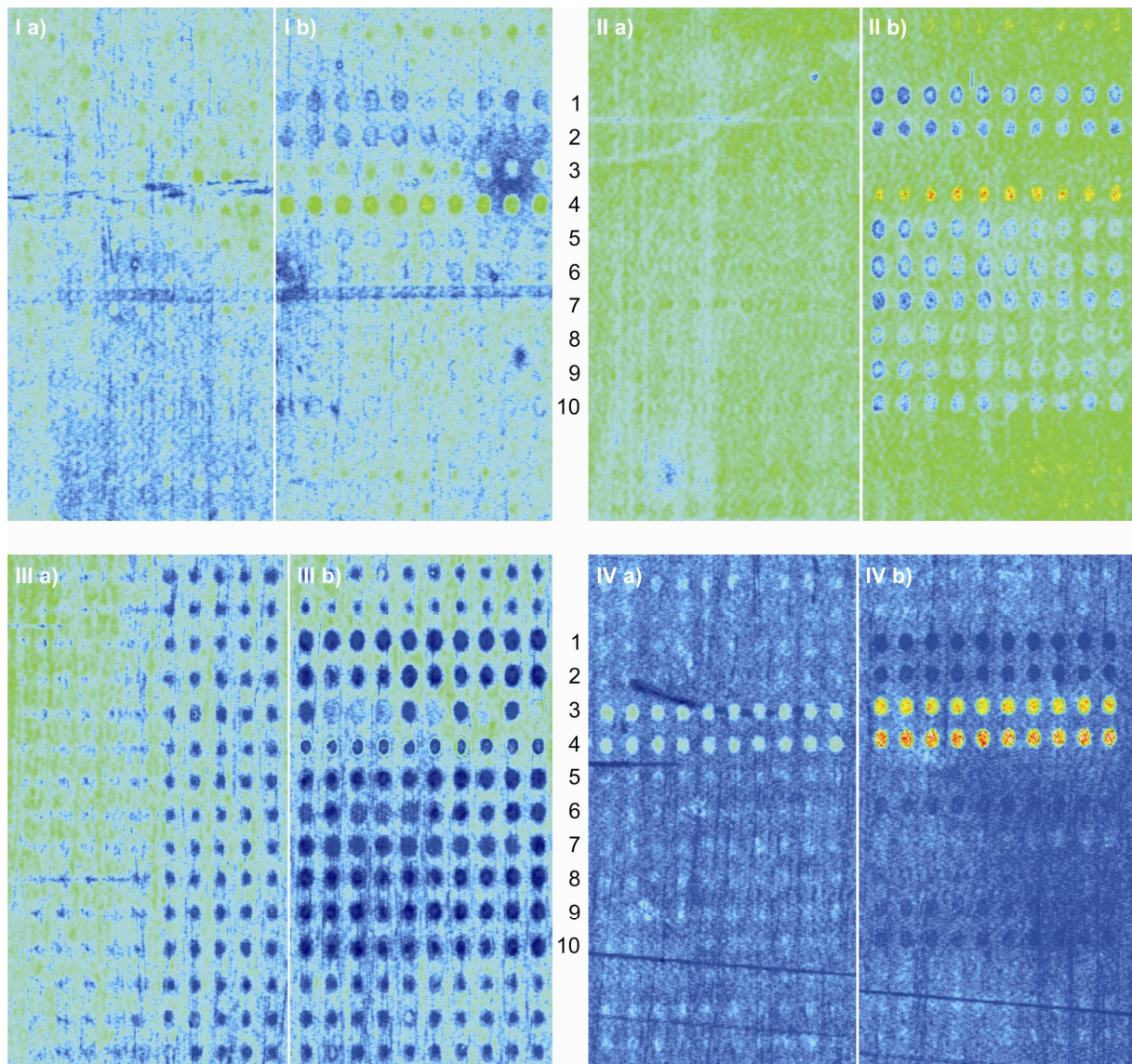


Abbildung 4-22: Deaktivierung mittels I Bernsteinsäureanhydrid, II Essigsäureanhydrid, III 3-Aminopropanol sowie IV Ethylendiamin, wobei a) die DNA- und b) die PNA-funktionalisierten *Microarrays* zeigt. Nach achtstündiger Hybridisierung mit 60 µl der komplementären, 200 nM Gegensequenz zu 4 (ZS4_PNA_Cy5) erfolgt das Auslesen mittels *Microarray-Scanner*.

Alle Oberflächen weisen einen beträchtlichen Hintergrund auf. Diese Tatsache macht eine spezifische und eindeutige Zuordnung der Signale unmöglich. Ferner verhindert das Verhalten eine weitere Sensitivitätssteigerung. Die unspezifische PNA-Adsorption auf der Oberfläche kann mit diesen Deaktivierungsreagenzien nicht unterbunden werden. Durch Bernsteinsäure- bzw. Essigsäureanhydrid passivierte Oberflächen liefern im Fall kovalent angebundener DNA (Abbildung 4-22, I a) und II a)) ein Signal-Rausch-Verhältnis von lediglich 1,1. Auch bei oberflächengebundener

PNA (I b), II b)) sind die Werte mit 1,8 und 1,5 nur unwesentlich höher. Bei einer Passivierung mittels 3-Aminopropanol zeigen die nicht oligomerfunktionalisierten Bereiche sogar höhere Intensitäten als die *Spots*, das Signal-Rausch-Verhältnis beträgt 0,8 für DNA wie für PNA (III a), b)). In dieser Hinsicht können mit Werten von 1,8 (DNA, IV a)) bzw. 4,8 (PNA, IV b)) für die Ethylendiaminpassivierung die besten Resultate erzielt werden, welche jedoch für eine sinnvolle Anwendung ebenfalls zu niedrig ausfallen.

Eine andere Methode der Oberflächenpassivierung bieten die von *Stadler* für die Verwendung in Peptidruckern entwickelten PEGMA-Oberflächen (*PEPperSlide*) [Beyer 2006]. Im Unterschied zu den bisher verwendeten Oberflächentypen erfolgt das *Spotting* auf die bereits passivierten Objektträger, ein anschließender Deaktivierungs- bzw. Passivierungsschritt ist bei dieser Modifikation somit nicht nötig. Ermöglicht wird dies durch die aminofunktionalisierte Poly(ethylenglykol)methacrylat-Beschichtung. Abbildung 4-23 zeigt die Vorteile der PEGMA-Oberflächen. Neben einem deutlich geringeren Hintergrundsignal wirkt sich auch die empfindlichere Nachweisgrenze (benötigte PNA-Menge 300 amol) positiv aus. Hier kann ein sehr viel besseres Signal-Rausch-Verhältnis von 77 beobachtet werden, womit sensitive sowie eindeutige Nachweise möglich sind.

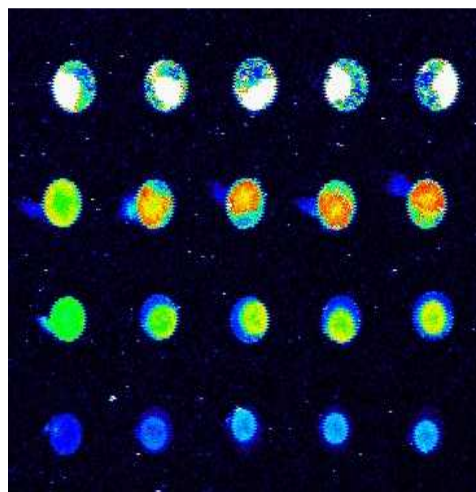


Abbildung 4-23: Zweistranghybridisierung von PNA-Sequenz 4 (abnehmende Konzentrationen von der obersten zur untersten Reihe: 200 μM , 100 μM , 10 μM sowie 1 μM) und ZS4_PNA_Cy5 auf einer PEGMA-Oberfläche.

Für das *Spotting* auf den PEPperSlides kam der *Nano-Plotter 2* zum Einsatz. Das Layout der Oberfläche wird dahingehend geändert, dass unterschiedliche Konzentrationen (200 μM , 100 μM , 10 μM und 1 μM) dreier ähnlicher Sequenzen auf dem Objektträger aufgebracht werden. Pro Reihe erfolgt das Auftragen von jeweils fünf Replikaten einer Konzentration, wobei die aufgetragenen Volumina denjenigen auf den mittels SDDC-2 *Micro-Arrayer* hergestellten Oberflächen entsprechen. Die Oligonukleotidmenge pro *Spot* der höchsten Konzentration (200 μM) stimmt ebenfalls mit denen der zuvor erzeugten *Microarrays* überein.

Somit steht in Form der oligonukleotidfunktionalisierten PEGMA-Oberflächen ein Träger zur Verfügung, welcher zum sensitiven Nachweis der PNA-Markierungsoligomere eingesetzt werden kann.

4.4.3 Dreistrangsystem auf PEGMA-Oberflächen

Der Nachweis durch das Dreistrangsystem erfolgt über eine kovalent auf der PEGMA-Oberfläche angebundene PNA, welche komplementär zu der in das Produkt eingebrachten PNA-Sequenz ist. Abbildung 4-24 zeigt den schematischen Ablauf des Nachweisverfahrens. Im Gegensatz zum Zweistrangsystem trägt der kodierende Teil der Markierungs-PNA (blau) keinen Fluoreszenzfarbstoff, jedoch ein aus 15 Thymineinheiten bestehendes Ende (schwarz). Dieses kann in einem zweiten Hybridisierungsschritt mit einem fluoreszenzmarkierten PolyA-Strang (A15_Cy5) reagieren, wodurch das Oligomere, falls in der Probe vorhanden, nachgewiesen werden kann. Da alle potentiellen Markierungs-PNAs ein PolyT-Ende besitzen, stellt A15_Cy5 eine universelle Detektionssequenz des Systems dar.

Der entscheidende Vorteil des Dreistrangverfahrens liegt darin, dass durch den zweiten Hybridisierungsschritt mit farbstoffmarkierter DNA die eigentliche Markierungs-PNA über kein Fluorophor verfügen muss. Dies spart nicht nur Kosten, sondern umgeht auch die Problematik der vorzeitigen Farbstoffdegeneration noch im dotierten Produkt durch langanhaltenden Kontakt unter widrigen Umwelteinflüssen.

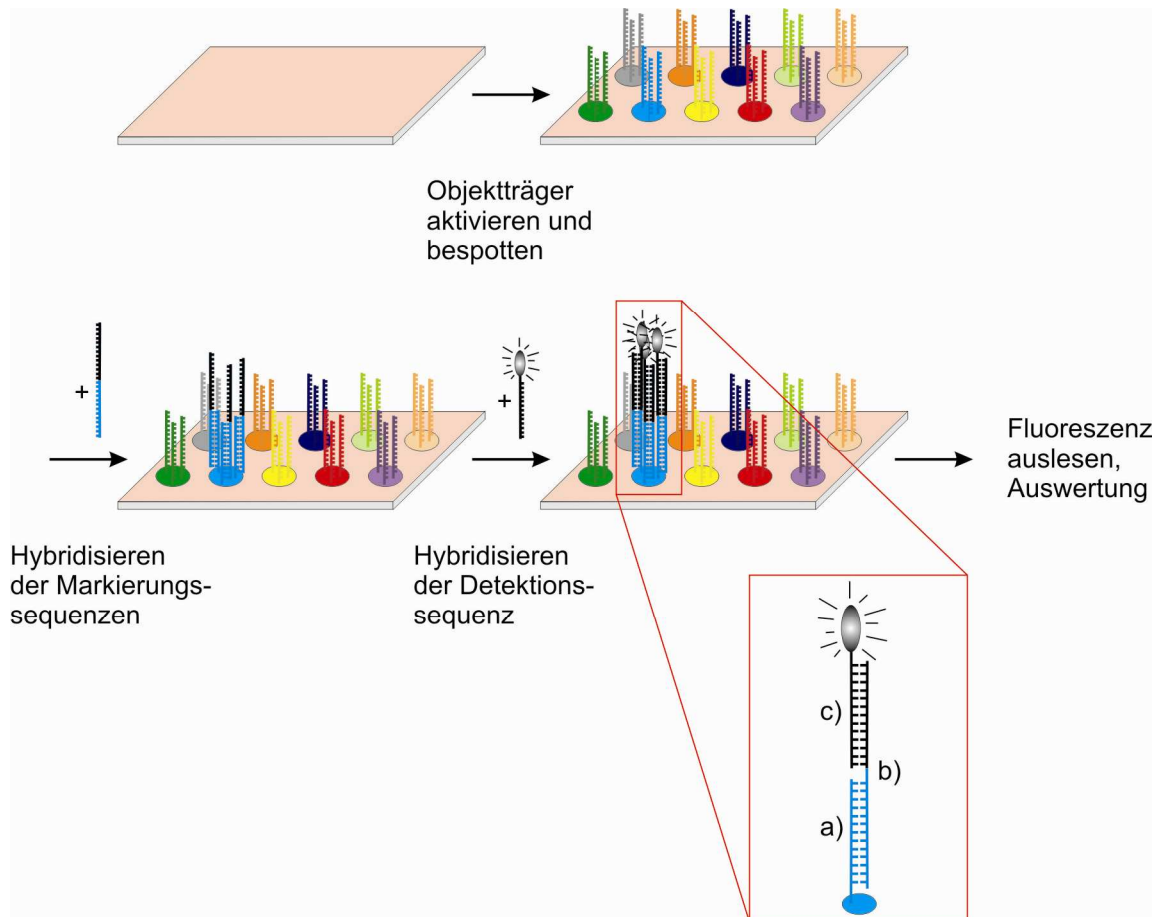


Abbildung 4-24: Schematischer Ablauf der Dreistranghybridisierung. Die Herstellung der *Microarrays* erfolgt durch *Spotting* der PEGMA_PNAs auf die bereits passivierten Oberflächen. Ist die Zielsequenz **(b)** in dem Produkt enthalten, hybridisiert es durch einen ersten Schritt an die komplementäre oberflächengebundene PNA **(a)**. Die Detektion ermöglicht ein farbstoffmarkierter DNA-Strang **(c)**, welcher an das PolyT-Ende der Probe hybridisiert.

Zur Bestimmung der Leistungsfähigkeit des Verfahrens werden verschiedene Konzentrationen der Markierungs-PNAs für die Hybridisierung eingesetzt. Wie aus Abbildung 4-25 ersichtlich, ermöglicht das Dreistrangsystem in Verbindung mit den PEGMA-Oberflächen einen eindeutigen Nachweis von 300 amol bzw. 200 fg PNA. Um Adsorptionen auf unbehandelten Deckgläschen, welche normalerweise zum Abdecken der Hybridisierungsfläche benutzt werden, zu verhindern, kommen bei diesen Versuchen stattdessen sogenannte *Gene frames* zum Einsatz. Darunter versteht man viereckige Rahmen, welche um das bespottete Gebiet geklebt werden. Aufgrund dessen kann man ein Flüssigkeitsvolumen von 50 – 100 µl auf einem definierten Bereich platzieren.

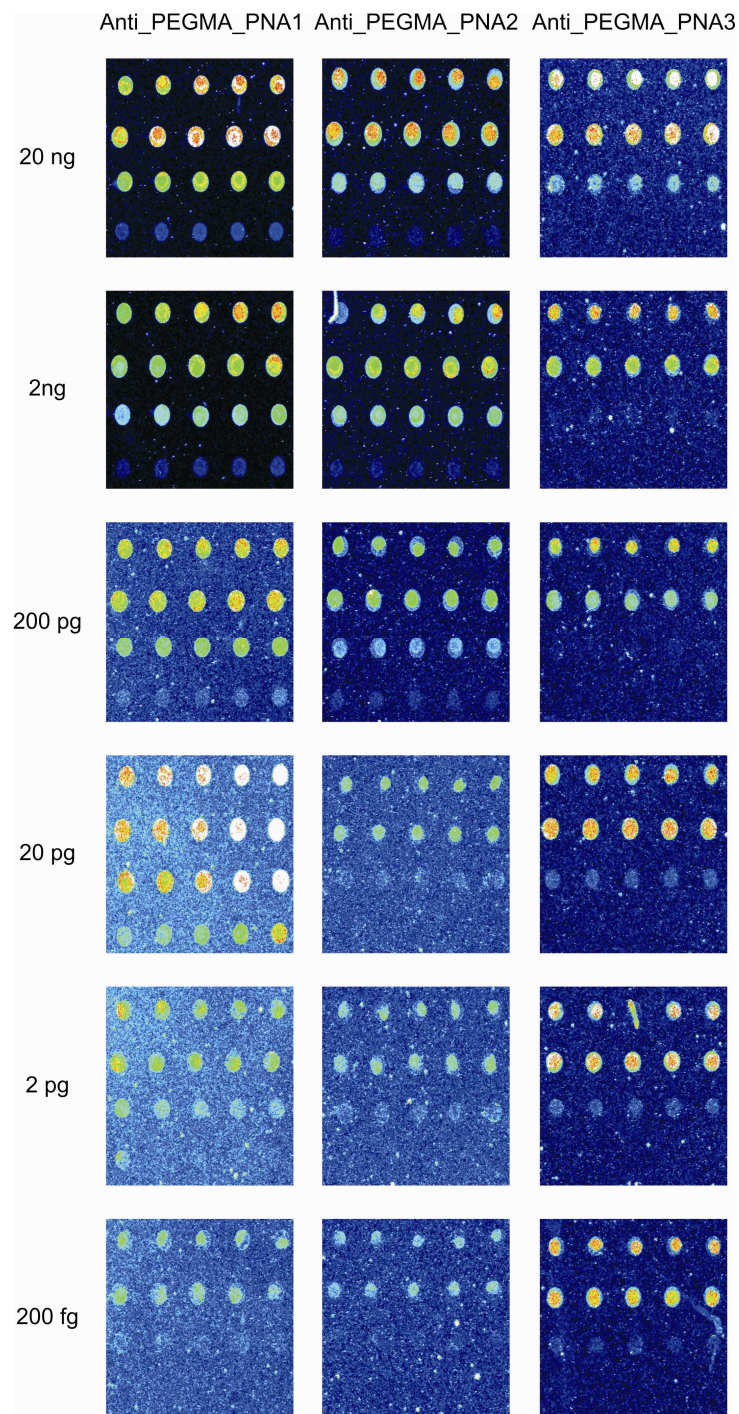


Abbildung 4-25: Konzentrationsreihe von Anti_PEGMA_PNA1, Anti_PEGMA_PNA2 sowie Anti_PEGMA_PNA3. Die PEGMA-Oberflächen sind mit abnehmenden Konzentrationen von der obersten zur untersten Reihe 200 μM , 100 μM , 10 μM sowie 1 μM bespottet. Die erste Hybridisierung zum Ausbilden der PNA/PNA-Duplex dauert 14 Stunden bei 37 $^{\circ}\text{C}$ in 50 μl PBS-Puffer (pH = 7,4) mit der jeweiligen PNA-Menge. Nach gründlichem Waschen in selbigem Puffer erfolgt der zweite Hybridisierungsschritt (PNA/DNA-Helix) in 100 μl PBS-Puffer (pH = 7,4) bei 4 $^{\circ}\text{C}$ für zwei Stunden. Die A15_Cy5-Konzentration beträgt 0,2 μM .

Um dennoch die Hybridisierungslösung vor dem Verdunsten zu bewahren, findet der Vorgang in Feuchtekammern statt. Vergleichende Experimente zeigen zudem, dass höhere Temperaturen die Anbindung der Markierungs-PNA an ihren oberflächengebundenen komplementären Strang fördern und sich somit die Sensitivität weiter steigern lässt. Damit sind Signal-Rausch-Verhältnisse von bis zu 80 zu beobachten. Aufgrund dessen erfolgen die Hybridisierungen bei 37 °C. Die Spezifität ist unter diesen Bedingungen ebenfalls gegeben, wie Abbildung 4-26 belegt.

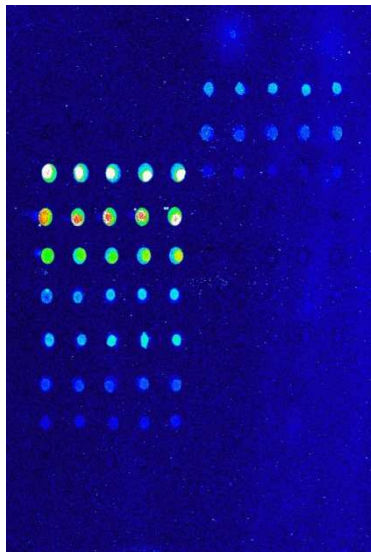


Abbildung 4-26: Spezifität des Nachweises beispielsweise mit 2 ng (3 pmol) Anti_PEGMA_PNA1.

Intensive Fluoreszenzsignale sind nur auf mit zur Anti_PEGMA_PNA1 komplementären Sequenzen belegten *Spots* zu detektieren. Die Menge an aufgebrachtener Markierungssequenz (Anti_PEGMA_PNA1) beträgt in diesem Experiment 2 ng.

Des Weiteren ist es mit diesem Dreistrangsystem erstmals möglich, die aus Leinöl isolierte Anti_PEGMA_PNA1 nachzuweisen. Leinöl stellt aufgrund seiner Verwendung in Ölfarben ein anwendungsnahes, lipophiles Medium dar. Nach Dotierung von 1 ml Leinöl/Hexan (1:1) mit 3 nmol PNA erfolgt die Extraktion mittels 100 µl 0,1 M Salzsäure. Die wässrige Fraktion wird abpipettiert, bis zur Trockene eingengt und im Anschluss in 50 µl 0,1 x SSarc aufgenommen. Mit dieser Vorgehensweise können 66 % der ursprünglich eingesetzten PNA zurückgewonnen

werden. Beide Hybridisierungsschritte dauern je eine Stunde, wobei die Konzentration von A15_Cy5 $0,2 \mu\text{M}$ in $0,1 \times \text{SSarc}$ beträgt. Das Ergebnis zeigt Abbildung 4.27.

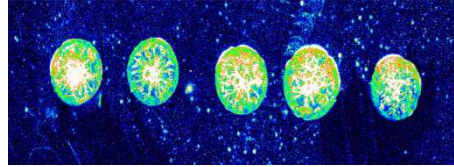


Abbildung 4-27: Positiver Nachweis der aus Leinöl isolierten Anti_PEGMA_PNA1 über die Drei-stranghybridisierung.

Wie bereits bei den Sensitivitäts- und Spezifitätsexperimenten beobachtet, ist auch hier ein niedriger Hintergrund in Verbindung mit hohen Signalintensitäten erkennbar. Zu falsch-positiven Resultaten, wie bei der *Molecular Beacon*-basierten Methode, kann es bei diesem Verfahren nicht kommen, da alle potentiellen, die Hybridisierung störenden Komponenten aufgrund der andersartigen Konzeption zur Signalminderung führen würden. Zusätzlich eliminieren die Waschschriffe solche unerwünschten Begleitstoffe. Die prinzipielle Eignung des entwickelten Systems für die kommerzielle Anwendung im Bereich Künstlerfarben konnte somit gezeigt werden.

4.5 Industrielle Anwendung des Systems in Kooperation mit dem Unternehmen *Faber-Castell*

4.5.1 Anwendungsgebiet und Zielsetzung

Die in der vorliegenden Arbeit entwickelte Markierungsmethode mittels PNA-Oligomeren findet bei den Grip 2001-Bleistiften aus dem Hause *Faber-Castell* Anwendung (s. Abbildung 4-28). Während des Lackiervorgangs werden diese Stifte in einer Endloskette durch ein Lackbad geführt. Um eine haltbare Lackierung zu gewährleisten, wird der Vorgang mehrmals wiederholt. Aufgrund dessen sorgen mehrere Lackschichten für eine erhöhte Leuchtkraft der Farbe sowie die für

Hochwertigkeit des Erscheinungsbildes. Der sogenannte Wasserlack, mit welchem diese Art von Stiften überzogen ist, besteht neben Wasser und den farbgebenden Pigmenten lediglich aus einem geringen Anteil organischer Lösungsmittel. Dadurch werden gesundheitsschädliche Dämpfe stark vermindert, jedoch ebenfalls die Trocknungsdauer aufgrund der geringen Menge organischer Solventien verlängert.



Abbildung 4-28: Grip 2001-Bleistift aus dem Hause *Faber-Castell*. In der grauen Kappe rechts unten im Bild könnte sich die Markierung im Lack befinden.

Zu Markierungszwecken wurden von *Faber-Castell* 200 µg Anti_PEGMA_PNA1 in 200 µl Wasser gelöst, in 20 g des grauen Kappenlacks überführt und solange gerührt, bis Homogenität vorlag. In diesen Lack wurden 20 Stifte getaucht, die somit in der Kappe die Markierung trugen. Die Lackmenge pro Stift betrug ca. 13 mg, was ungefähr 4,6 mg trockenem Lack und somit ca. 126 ng PNA je Stift entspricht. All diese Stifte erhielten die gleiche Buchstabenkennzeichnung. Um die in der vorliegenden Arbeit entwickelte Methode zu testen, wurden drei weitere, PNA-unmarkierte Bündel, ebenfalls à 20 Stifte, von *Faber-Castell* bereitgestellt. Aus den vier Bündeln A, B, C sowie D galt es dasjenige herauszufinden, dessen Stifte die Markierung trugen.

4.5.2 Aufbereitung der Proben

Zur Gewinnung des Probenmaterials musste die Kappe vom Stift entfernt werden. Da Wasserlacke im Allgemeinen auf Acrylharzen basieren, welche beim Aushärten polymerisieren, konnten Lösungsmittel, welche die Monomere erfolgreich in Lösung halten, nicht die gewünschten Ergebnisse erbringen. Nach Versuchen mit gängigen organischen Lösungsmitteln, stellte sich ein Gemisch aus Trifluoressigsäure/Tetrahydrofuran im Verhältnis 1:1 als erfolgversprechend heraus, da es den Bleistiftlack solubiliziert.

Der Abtrennung der Kappe je eines Stifts der Bündel A, B, C und D mittels eines Skalpell folgte deren Überführung in je ein Eppendorfgefäß. Im Anschluss an die Zugabe von 50 µl konzentrierter Trifluoressigsäure wurde das gleiche Volumen an Tetrahydrofuran zugefügt. Nach 5 Minuten bildete sich eine graue Dispersion, welche nur noch aus feinen Anteilen bestand. Auf das 30-minütige Schütteln folgte die Einengung der Lösungsmittel, welche aber nicht bis zur vollkommenen Trockene ausgeführt wurde. Die Zugabe von 200 µl Chloroform führte innerhalb einer Minute zur vollständigen Resuspension. Die Extraktion der PNA-Markierung sollten 400 µl 1 M Trifluoressigsäure und ein Schütteln für 30 min gewährleisten. Durch einminütige Zentrifugation konnte die klare wässrige Phase problemlos von der organischen separiert werden. Erstere wurde bis zur Trockene eingengt, um dann in 50 µl PBS-Puffer (pH=7,4) aufgenommen zu werden.

4.5.3 Nachweis der Markierung

Die Detektion der Markierung sollte mit dem in dieser Arbeit etablierten Fluoreszenznachweis über die bereits vorgestellte Dreistranghybridisierung auf PEGMA-Oberflächen erfolgen. Dazu wurden je 50 µl der vier PBS-Pufferlösungen (Endprodukte der Probenaufbereitungen, s.o.) der jeweiligen Bleistiftbündel, wovon eine die potentielle PNA-Markierung enthalten musste, auf vier Hybridisierungsbereiche pipettiert und für 14 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur in einer Feuchtekammer inkubiert. Nach dieser Zeit erfolgte ein kurzes, gründliches Waschen mit PBS-Puffer (pH=7,4). Pro Bereich wurden 100 µl einer $2 \cdot 10^{-7}$ M A15_Cy5-Lösung

in PBS aufgebracht, welche die Dreistranghybridisierung der Positivprobe vervollständigt und so beim Auslesen ein detektierbares Fluoreszenzsignal auf den entsprechenden *Spots* generiert. Die Reaktionszeit betrug 1,5 Stunden und fand unter den erwähnten Bedingungen statt. Nach Abschluss der Inkubation wurden die Oberflächen erneut gründlich mit PBS-Puffer gewaschen und abschließend im Stickstoffstrom getrocknet. Das Auslesen der Biochips mittels Fluoreszenzscanner brachte die in Abbildung 4-29 gezeigten Ergebnisse.

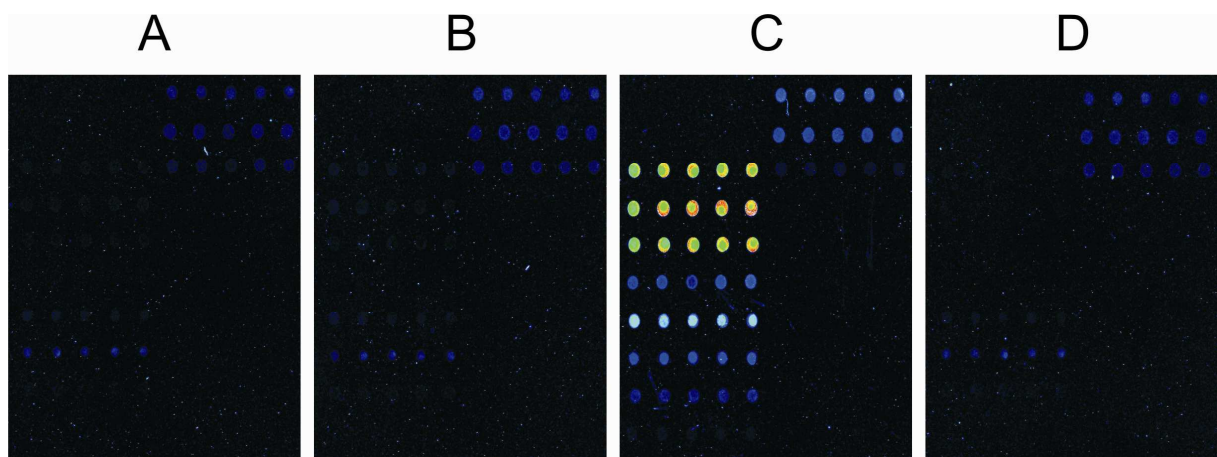


Abbildung 4-29: Ergebnisse der Hybridisierungen der in Lösung gebrachten Kappenlacke A, B, C und D.

Wie aus Abbildung 4-29 ersichtlich, zeigen sich deutliche Signale im gewünschten Bereich bei dem Kappenlack von Bleistift C, was sich durch mehrmalige Reproduktion untermauern ließ. *Faber-Castell* bestätigte die PNA-Markierung des Stiftbündels C und damit die Richtigkeit der gewonnenen Daten. Somit konnte der Beweis erbracht werden, dass das in der vorliegenden Arbeit entwickelte Markierungssystem auf Basis von PNA-Oligomeren sowie das Dreistrangnachweissystem industrietauglich und deshalb in kommerziellen Produkten weitreichend einsetzbar sind. Aufgrund der deutlichen Signale ist auch eine Reduzierung der eingebrachten PNA-Menge möglich, um die Kosten für die Markierung weiter zu senken.

5 DISKUSSION UND AUSBLICK

Der Einsatz reiner Oligomere in den beabsichtigten Experimenten ist unabdingbar. Konventionell geschieht dies durch präparative HPLC-Trennung. Dies birgt mitunter Schwierigkeiten, da das gewünschte Produkt im ersten Lauf nicht rein anfällt und, wie bei jeder Chromatographie, schnell die Mengenkapazität der Säule erreicht ist. Aus diesem Grunde wäre es wünschenswert, eine alternative Reinigungsprozedur zu etablieren. Ein Derivatisierungszyklus, welcher nicht auf Säulenchromatographie basiert, wäre geeignet. Um trotzdem einen effektiven Trennprozess auf jeder Stufe zu erreichen, kann man z.B. mit festen Phasen arbeiten. Dort besteht die jeweilige Aufarbeitung lediglich in einer Filtration, um das Reaktionsmedium, Neben- sowie Ausgangsprodukte bequem abzutrennen. In der vorliegenden Arbeit wurden zu der genannten Problematik einleitende Experimente mit Peptiden und Glaswolle als fester Phase durchgeführt, da diese wie die eigentlich zu trennenden PNAs primäre Amine darstellen und somit die geplante Trennsystematik entwickelt und danach auf PNAs übertragen werden kann. Das geschilderte Verfahren konnte für Peptide realisiert werden. Entwicklungsbedarf bestünde demnach für Anwendungen der Methode zur Reinigung von PNAs unter Berücksichtigung größerer Mengen oder auch für eine Hochdurchsatzversion beispielsweise in 384-*well*-Platten. Beides wurde aus Zeitgründen zurückgestellt. Ein zu lösendes Problem besteht nach wie vor darin, die Anbindung des Amins (Peptid oder PNA) an das Dimedonderivat möglichst quantitativ zu gestalten, da andererseits die Gesamtausbeute an Peptid oder PNA stark reduziert wird.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war, oligomere DNAs oder PNAs in lipophile Flüssigkeiten einbringen zu können. Dies lässt sich nur erreichen, wenn die Oligomere lipophilisiert sind, d.h. ihre im Prinzip polare Natur kompensiert wird. Bei DNA bietet sich, wegen ihres anionischen Charakters, eine Komplexierung mit einem Kation an. Dieses sollte, um das Ziel der Lipophilisierung noch besser zu gewährleisten, selbst, im Gegensatz zu einfachen anorganischen Kationen wie z.B. Na^+ oder Mg^{2+} , über lipophile Partialstrukturen verfügen. Naheliegenderweise entscheidet man sich für ein lipophil-organisches, permanentes Kation. Letztere Eigenschaft gewährleistet die Neutralität der Ladung des Gesamtkomplexes bei

jedem pH-Wert. Im Dihexadecyldimethylammoniumbromid konnte ein solches Kation gefunden werden, das alle Anforderungen erfüllt. Mit ihm konnte man doppelsträngige, nicht aber einzelsträngige DNA (längere Bruchstücke und Oligonukleotide) zu in lipophilen Lösungsmitteln, wie Chloroform oder Dichlorethan, löslichen Komplexen umsetzen. Dies ließ erwarten, dass die lipophilisierte DNA auch in den zur Methodenentwicklung gewählten lipophilen Medien Nujol, Sonnenblumen-, Diesel- sowie Leinöl homogen verteilt werden kann. Eine erfolgreiche Realisierung war möglich. Der Grund, die einzelsträngige DNA nicht auf gleiche Weise komplexieren zu können, liegt daran, dass sie nicht, wie doppelsträngige DNA, eine mizellenartige Struktur ausbildet, bei der die negative geladenen Phosphatgruppen in einer Art Hülle außen liegen. Diese strukturelle Gestalt des Doppelstrangs erlaubt vermutlich eine einfache sowie wirkungsvolle Kompensation der negativen Ladungen durch Kationen. Einzelsträngige DNA-Oligomere wären für die verfolgten Zielsetzungen besser geeignet, da sie das Verfahren in der Handhabung (Synthese, Detektion) vereinfachen. Die Komplexbildung mit dem oben erwähnten quartären Ammoniumsalz ließ sich nicht auf die einzelsträngige DNA übertragen. Eine Lösungsmöglichkeit bestünde darin, verschiedene Komplexbildungsmethoden zu testen. Beispielsweise könnten kationische, lipophile Transfektionsreagenzien, wie sie routinemäßig und in großer Typenvielfalt in der Molekularbiologie angewandt werden, um DNAs in Zellen einzuschleusen [Luo 2000], auf ihre Eignung zur Komplexbildung untersucht werden.

Die Lipophilisierung von PNA erscheint gegenüber der von DNA einfacher möglich zu sein, da PNA ein elektrisch neutrales Rückgrat und aufgrund dessen einen höheren Grad an Lipophilie als DNA aufweist. Andererseits ist die fehlende Ladung von Nachteil, da z.B. organische, lipophile Ionen nicht assoziieren können. Dies erzwingt eine andere konzeptionelle Vorgehensweise. Erachtet man die inhärente Lipophilie der PNA als ausreichend, so kann man sie als solche unmodifiziert einsetzen. Eine Steigerung des lipophilen Charakters kann beispielsweise durch Modifikationen erreicht werden. Chemisch relativ einfach lassen sich an den Enden der PNA lipophile Aminosäuren, z.B. Phenylalanine, anbringen. Dieses Prinzip wurde hier dadurch verfolgt, dass ein oder drei solcher Reste pro Terminus angeknüpft wurden. Beide Typen, unveränderte und modifizierte PNA, ließen sich in Nujol, Sonnenblumen- sowie Dieselöl einbringen. Bei der späteren Detektion der Dotierung ließ sich jedoch kein Vorteil der derivatisierten gegenüber der unveränderten PNA

erkennen. Somit kann festgestellt werden, dass PNAs der verwendeten Oligomerlänge bei der Markierung lipophiler Medien als solche eingesetzt werden können. Weitere Untersuchungen zur beschriebenen Problematik der homogenen Verteilung von PNAs in entsprechenden Flüssigkeiten sind daher zurzeit nicht notwendig.

Nach der Dotierung mit DNA oder PNA müssen die Markierungssubstanzen nachgewiesen werden. Dies ist aus den unveränderten Lösungen meist nicht möglich, da die Matrix in sehr großem Überschuss, unter Umständen auch störende Substanzen beinhaltend, vorhanden ist. Aus diesem Grund verwendet praktisch jedes analytische Verfahren eine Probenvorbereitung, d.h. einen Schritt, der die nachzuweisenden Substanzen stark anreichert und mit dem nachfolgenden Detektionssystem nicht interferiert. Wie unten dargelegt, werden DNAs sowie PNAs durch Hybridisierung an einen komplementären Strang detektiert. Diese Reaktion findet in wässrigem Puffer statt. Es ist nicht zu erwarten, dass lipophile Proben direkt ins System eingebracht werden können, ohne den Hybridisierungsprozess negativ zu beeinflussen. Um die geschilderte Problematik zu umgehen, wurden zunächst Festphasenkartuschen eingesetzt, welche in vielen Fällen gestatten, die Matrix des Analyten effektiv, bequem und schnell zu entfernen. Diese Experimente führten nicht zum Erfolg, da es nicht gelang, die jeweilige DNA oder PNA in einer scharfen Fraktion, d.h. in kleinem Volumen, zu eluieren. Da Festphasenkartuschen eine weit verbreitete, elegante und erfolgreiche Probenvorbereitungsmethode sind, wäre es gerechtfertigt, die Methodik weiterzuverfolgen, um mit ihr dennoch eine funktionierende Aufreinigung zu etablieren. Es sind zahlreiche Kartuschentypen, befüllt mit vielen verschiedenen stationären Phasen, kommerziell erhältlich. Zusammen mit der Vielfalt möglicher Eluenten ergibt sich eine Unzahl an Variationen der praktischen Durchführung. Diese wären experimentell zu prüfen und die am besten geeignete zu optimieren. Als alternative Probenvorbereitung wurde eine Flüssig-Flüssig-Verteilung in Betracht gezogen. Da die Proben lipophil sind, musste die zweite Phase hydrophil sein, um Nichtmischbarkeit zu gewährleisten und die Substanzen in der Probe nach Klassen zu trennen. In Frage kamen Wasser oder, da PNAs primäre Amine darstellen, auch wässrige Säuren, die, wie in klassischen Trennungsgängen, Amine als Ammoniumsalze in die Wasserphase überführen. Dieses Extraktionsverfahren konnte für DNAs sowie PNAs als geeignet befunden

werden. Allerdings waren die Wiederfindungen unter 90 %, so dass für die Methodik noch Optimierungsbedarf besteht, um die Nachweisgrenze möglichst zu senken.

Die Detektion der Markierungssubstanzen DNA oder PNA sollte durch Hybridisierung an komplementäre Gegensequenzen erfolgen, welches ein Standardverfahren der Molekularbiologie darstellt. Alternativ bliebe nur ein analytisches HPLC-Verfahren, was aber einen *High Throughput*-Durchsatz nicht ohne Weiteres gestattet und auch technisch aufwendiger ist.

Der Nachweis von DNA- oder PNA-Oligomeren mittels Hybridisierung kann nach verschiedenen Ausführungsformen stattfinden. Zuerst wurden *Molecular Beacons* als Detektionssonden eingesetzt. Das System funktioniert derart, dass der *Molecular Beacon* selbst erheblich geringere Fluoreszenz zeigt, solange er nicht mit einer komplementären Sequenz hybridisiert ist. Bei Anwesenheit des nachzuweisenden Oligomers ist ein erheblicher Fluoreszenzanstieg registrierbar. Getestet wurden zwei *Molecular Beacons*, die sich nur in ihrer Löschkomponente, Guanin bzw. DABCYL, unterschieden. Zur weiteren Verwendung kam nur letzterer, wegen seines wesentlich besseren Fluoreszenzanstiegs. Dieser wurde im Vorfeld bezüglich seiner Schmelztemperatur, Spezifität sowie seiner Sensibilität gegenüber verschiedenen Konzentrationen an nachzuweisenden Oligomeren charakterisiert. Letztlich konnte das *Molecular Beacon*-System nicht erfolgreich verwendet werden, weil die Werte der Negativkontrollen oftmals deutlich erhöht waren. Ursächlich hierfür sind während der Extraktionsprozesse nicht abgetrennte Komponenten der lipophilen Medien, welche ihrerseits ein erhöhtes Fluoreszenzsignal erzeugen. Aufgrund dessen war eine ausreichende Nachweisempfindlichkeit nicht zu erzielen.

Um die zur Markierung verwendeten DNA- bzw. PNA-Oligomere nachzuweisen, wurde auf Chiptechnologie zurückgegriffen. Die praktische Ausführung erfolgte derart, dass oligomere DNA- oder PNA-Sonden durch kovalente Bindung auf vorher aktivierten Glasoberflächen fixiert wurden. Die zu detektierenden Proben (DNA oder PNA) müssen zu den fixierten Sequenzen komplementär sein und zum Zwecke der Detektion einen Fluoreszenzfarbstoff tragen. Das sogenannte Zweistrangsystem arbeitet auf diese Weise. Sonde und fluoreszierendes Probenmolekül hybridisieren. Nach Waschen des *Microarrays* bleibt die vom Hybrid verursachte Fluoreszenz bestehen, während nicht hybridisierte Teile des Objektträgers kein Signal liefern. Das Verfahren funktionierte zufriedenstellend mit den zugegebenen DNA-Oligomeren. Bei

den PNA-Oligomeren jedoch blieb auch nach intensivem Waschen ein stark fluoreszierender Hintergrund bestehen. Die PNA-Probe adsorbiert unspezifisch an die verwendeten Objektträger, so dass keine punktuelle sondern flächenhafte Fluoreszenz entsteht. Aufgrund dessen wurden verschiedene Oberflächen-deaktivierungsreagenzien getestet, um deren Charakteristik bezüglich PNA-Assoziation zu beurteilen. Diese Versuche waren ohne wesentlichen Erfolg. Eine erhebliche Verbesserung des Nachweisverfahrens konnte durch Verwendung von PEGMA-Oberflächen erzielt werden. In diesem Falle konnte das hohe Hintergrundsignal maßgeblich reduziert werden. Dies erlaubte die Etablierung eines Dreistrangsystems, wobei Sondenoligomere kovalent an die Oberfläche gekoppelt werden. Die nachzuweisende komplementäre Probe hybridisiert daran, trägt aber am abgewandten Ende statt einem Farbstoff eine PolyT-Sequenz. Letztere erlaubt, dass ein drittes Oligomer mit einer fluoreszenzmarkierten PolyA-Sequenz in einem zweiten Hybridisierungsschritt an die zu detektierende Probe anbindet, wodurch diese nachgewiesen werden kann. Diese Methodik hat den Vorteil, dass das nachzuweisende Oligomer keine Farbstoffmarkierung tragen muss, wodurch einerseits eine Kostenreduktion erfolgt und gleichzeitig eine potentielle Instabilität des Farbstoffs im später markierten Produkt umgangen wird.

Mit diesem System konnte eine Sensitivitätssteigerung bis zum spezifischen Nachweis von 200 fg bzw. 300 amol Markierungs-PNA erzielt werden.

Auf diesen Ergebnissen aufbauend, sollte eine Markierung eines lipophilen Produkts mit einem PNA-Oligomer stattfinden. Dessen Rückgewinnung geschieht mittels Säureextraktion, wobei 66 % der ursprünglich eingesetzten PNA-Menge zurückgewonnen werden konnte. Der Nachweis erfolgt im Dreistrangsystem auf PEGMA-Oberflächen. Eine eindeutige Detektion der PNA-Dotierung in Leinöl war anhand dieses Verfahrens nach Extraktion erstmals möglich.

Um die praktische Anwendung einer Dotierung eines Industrieprodukts mit PNA zu demonstrieren, konnte das Unternehmen *Faber-Castell* gewonnen werden, das PNA-markierte und unmarkierte Bleistifte zur Verfügung stellte. Nach Markierung des Bleistiftlacks mit einem PNA-Oligomer durch *Faber-Castell* ließ sich diese mithilfe des eben beschriebenen Dreistrangverfahrens zweifelsfrei nachweisen. Die Tauglichkeit des Systems ist damit bewiesen. Eine Weiterführung wäre in dem Sinne

denkbar, die Nachweisgrenze weiter zu senken und die Anwendbarkeit auf anderen Gebieten zu etablieren.

6 LITERATUR

- Antsyrovich, S. I. - Peptide nucleic acids: Structure, properties, applications, strategies and practice of chemical synthesis. *Usp. Khim.*, **2002**, 71 (1), 81-96.
- Armitage, B. A. - The impact of nucleic acid secondary structure on PNA hybridization. *Drug Discov. Today*, **2003**, 8 (5), 222-228.
- Balzani, V.; Credi, A.; Venturi, M. - Molecular devices and machines. *Nano Today*, **2007**, 2 (2), 18-25.
- Balzani, V.; Credi, A.; Venturi, M. - Molecular Devices and Machines: Concepts and Perspectives for the Nanoworld. **2008**, Wiley-VCH, Weinheim.
- Becker, A. L.; Johnston, A. P. R.; Caruso, F. - Peptide Nucleic Acid Films and Capsules: Assembly and Enzymatic Degradation. *Macromol. Biosci.*, **2010**, 10 (5), 488-495.
- Becker, H. G. O. - Einführung in die Photochemie. **1983**, Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Beyer, M.; Felgenhauer, T.; Bischoff, F. R.; Breitling, F.; Stadler, V. - A novel glass slide-based peptide array support with high functionality resisting non-specific protein adsorption. *Biomaterials*, **2006**, 27 (18), 3505-3514.
- Beyer, M.; Nesterov, A.; Block, I.; König, K.; Felgenhauer, T.; Fernandez, S.; Leibe, K.; Torralba, G.; Hausmann, M.; Trunk, U.; Lindenstruth, V.; Bischoff, F. R.; Stadler, V.; Breitling, F. - Combinatorial synthesis of peptide arrays onto a microchip. *Science*, **2007**, 318 (5858), 1888-1888.
- Bialy, H. - Detecting drug-resistant tuberculosis: Beacons in the dark. *Nat. Biotechnol.*, **1998**, 16, 331.
- Bockslaff, K.; Schlüter, H. C. - Sicherheit für Geldinstitute und Cashlogistik. **2004**, Secumedia Verlag, Ingelheim.
- Bodwell, G. J.; Li, J. - Concise Synthesis and Transannular Inverse Electron Demand Diels-Alder Reaction of [3](3,6)Pyridazino[3](1,3)indolophane. Rapid Access to a Pentacyclic Indoloid System. *Org. Lett.*, **2001**, 4 (1), 127-130.
- Bonnet, G.; Tyagi, S.; Libchaber, A.; Kramer, F. R. - Thermodynamic basis of the enhanced specificity of structured DNA probes. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, 96 (11), 6171-6176.
- Braich, R. S.; Chelyapov, N.; Johnson, C.; Rothmund, P. W. K.; Adleman, L. - Solution of a 20-Variable 3-SAT Problem on a DNA Computer. *Science*, **2002**, 296 (5567), 499-502.

- Brandt, O.; Feldner, J.; Stephan, A.; Schroder, M.; Schnolzer, M.; Arlinghaus, H. F.; Hoheisel, J. D.; Jacob, A. - PNA microarrays for hybridisation of unlabelled DNA samples. *Nucleic Acids Res.*, **2003**, 31 (19), 9.
- Brandt, O. - Markierungsfreie DNA-Mikrochip Analytik. *Dissertation*, Technische Universität Berlin, **2004**.
- Breitling, F.; Nesterov, A.; Stadler, V.; Felgenhauer, T.; Bischoff, F. R. - High-density peptide arrays. *Mol. Biosys.*, **2009**, 5 (3), 224-234.
- Budker, V. G.; Slattum, P. M.; Monahan, S. D.; Wolff, J. A. - Entrapment and Condensation of DNA in Neutral Reverse Micelles. *Biophys. J.*, **2002**, 82, 1570-1579.
- Bundesministerium der Finanzen - Der Zoll - Produktpiraterie im Visier. Berlin, **2010**.
- Bundesministerium der Justiz - Produktpiraterie. **2010**, http://www.bmj.bund.de/enid/Handels_und_Wirtschaftsrecht/Produktpiraterie_1h0.html.
- Bundeszollverwaltung - Jahresstatistik 2009. Berlin, **2010**.
- Chargaff, E. - Structure and function of nucleic acids as cell constituents. *Fed. Proc.*, **1951**, 10 (3), 654-659.
- Chargaff, E. - How genetics got a chemical education. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1979**, 325, 344-360.
- Chen, J.; Deng, Q.; Wang, R.; Houk, K. N.; Hilvert, D. - Shape Complementarity, Binding-Site Dynamics, and Transition State Stabilization: A Theoretical Study of Diels-Alder Catalysis by Antibody 1E9. *ChemBioChem*, **2000**, 1 (2), 255-261.
- Cortesi, R.; Marastoni, M.; Tomatis, R.; Nienegatti, E.; Esposito, E.; Nastruzzi, C. - Peptide-based cationic molecules for the production of positive charged liposomes and micelles. *J. Microencapsul.*, **2008**, 25 (2), 71-81.
- Dauber, M.; Schnolzer, M.; Hoheisel, J.; Jacob, A. - "Fmoc-on" purification for parallel peptide and PNA synthesis in 384-well plate formats. *J. Pep. Sci.*, **2006**, 12 125-125.
- Deisingh, A. K. - Pharmaceutical counterfeiting. *Analyst*, **2005**, 130 (3), 271-279.
- Demidov, V. V.; Potaman, V. N.; Frank-Kamenetskii, M. D.; Egholm, M.; Buchard, O.; Sönnichsen, S. H.; Nielsen, P. E. - Stability of peptide nucleic acids in human serum and cellular extracts. *Biochem. Pharmacol.*, **1994**, 48 (6), 1310-1313.
- Diehl, F.; Beckmann, B.; Kellner, N.; Hauser, N. C.; Diehl, S.; Hoheisel, J. D. - Manufacturing DNA microarrays from unpurified PCR products. *Nucleic Acids Res.*, **2002**, 30 (16), e79.

- Diels, O.; Alder, K. - Synthesen in der hydroaromatischen Reihe. *Ann. Chem.*, **1928**, 460, 98-122.
- Dimitrov, R. A.; Zuker, M. - Prediction of Hybridization and Melting for Double-Stranded Nucleic Acids. *Biophys. J.*, **2004**, 87 (1), 215-226.
- Duffy, M. J.; O'Donovan, N.; Crown, J. - Use of molecular markers for predicting therapy response in cancer patients. *Cancer Treat. Rev.*, **2010**, In Press, Corrected Proof.
- Egholm, M.; Buchardt, O.; Christensen, L.; Behrens, C.; Freier, S. M.; Driver, D. A.; Berg, R. H.; Kim, S. K.; Norden, B.; Nielsen, P. E. - PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature*, **1993**, 365 (6446), 566-568.
- Europäische Kommission - Produktnachahmung und Markenpiraterie. **2010**, http://ec.europa.eu/taxation_customs/customs/customs_controls/counterfeit_piracy/index_de.htm.
- Fernandez, F. M.; Green, M. D.; Newton, P. N. - Prevalence and detection of counterfeit pharmaceuticals: A mini review. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2008**, 47 (3), 585-590.
- Fields, G. B.; Noble, R. L. - Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int. J. Pept. Prot. Res.*, **1990**, 35 (3), 161-214.
- Filipovska, A.; Eccles, M. R.; Smith, R. A. J.; Murphy, M. P. - Delivery of antisense peptide nucleic acids (PNAs) to the cytosol by disulphide conjugation to a lipophilic cation. *FEBS Lett.*, **2004**, 556 (1-3), 180-186.
- Fleck, M. - Molecular architecture using DNA. *Materials Today*, **2008**, 11 (11), 9-9.
- Flemming, S. - Die funktionelle Form der DNA? *Naturwissenschaften*, **1982**, 69 (7), 337-338.
- Förster, T. - Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.*, **1948**, 2, 55-75.
- Fringuelli, F.; Taticchi, A. - Dienes in the Diels-Alder-Reaction. **1990**, Wiley-VCH, New York.
- Group, T. A.-C. - The dangers of fakes. **2008**, http://www.a-cg.org/guest/pdf/Dangers_of_Fakes08.pdf.
- Heckel, A.; Famulok, M. - Building objects from nucleic acids for a nanometer world. *Biochimie*, **2008**, 90 (7), 1096-1107.
- Hermanson, G. T. - Bioconjugate Techniques. **2008**, Elsevier, Heidelberg.

- Hoffmann, R.; Bril, G.; Otvos, L. - Prediction of retention times of peptide nucleic acids during reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1998**, 814 (1-2), 111-119.
- Huisgen, R. - On the Mechanism of 1,3-Dipolar Cycloadditions. A Reply. *J. Org. Chem.*, **1968a**, 33 (6), 2291-2297.
- Huisgen, R.; Gotthardt, H.; Grashey, R. - 1.3-Dipolare Cycloadditionen, XXXIV. Pyrazole aus Sydnonen und acetylenischen Dipolarophilen. *Chem. Ber.*, **1968b**, 101 (2), 536-551.
- Hyrup, B.; Nielsen, P. E. - Peptide nucleic acids (PNA): Synthesis, properties and potential applications. *Bioorgan. Med. Chem.*, **1996**, 4 (1), 5-23.
- Ijro, K.; Okahata, Y. - A DNA-Lipid Complex Soluble in Organic Solvents. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1992**, 1339-1341.
- Imre, V. E.; Luisi, P. L. - Solubilization and Condensed Packaging of Nucleic Acids in Reversed Micelles. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, **1982**, 107, 538-545.
- International Anti Counterfeiting Coalition - The truth about counterfeiting. **2010**, <http://www.iacc.org/about-counterfeiting/the-truth-about-counterfeiting.php>.
- Jablonski, A. - Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren. *Z. Phys.*, **1935**, 94 38-46.
- Kan, Y.; Schuster, G. B. - Long-Range Guanine Damage in Single-Stranded DNA Charge Transport through a Duplex Bridge and in a Single-Stranded Overhang. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121 (47), 10857-10864.
- Kaura, S. K.; Viridi, S. P. S.; Aggarwal, A. K. - Holographic optical elements encoded security holograms with enhanced features. *Indian J. Pure App. Phys.*, **2006**, 44 (12), 896-902.
- Kelesidis, T.; Kelesidis, L.; Rafailidis, P.; Falagas, M. E. - Counterfeit or substandard antimicrobial drugs: a review of the scientific evidence. *J. Antimicrob. Chemoth.*, **2007**, 60 (2), 214-236.
- Kellam, B.; Chan, W. C.; Chhabra, S. R.; Bycroft, B. W. - Transient affinity tags based on the Dde protection/deprotection strategy: Synthesis and application of 2-biotinyl- and 2-hexanoyldimedone. *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 38 (30), 5391-5394.
- Klunder, A. J. H.; Zhu, J.; Zwanenburg, B. - The Concept of Transient Chirality in the Stereoselective Synthesis of Functionalized Cycloalkenes Applying Retro-Diels-Alder Methodology. *B. Chem. Rev.*, **1999**, 99, 1163-1190.
- Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. - Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2001**, 40 2004-2021.

- Kwart, H.; King, K. - The reverse Diels-Alder or retrodiene reaction. *Chem. Rev.*, **1968**, 68 (4), 415-447.
- Lieberwirth, U.; Arden-Jacob, J.; Drexhage, K.; Herten, D.; Müller, R.; Neumann, M.; Schulz, A.; Siebert, S.; Sagner, G.; Klingel, S.; Sauer, M.; Wolfrum, J. - Multiplex dye DNA sequencing in capillary gel electrophoresis by diode laser-based time-resolved fluorescence detection. *Anal. Chem.*, **1998**, 70 (22), 4771-4779.
- Liu, C. H.; Yu, S. Y. - Cationic nanoemulsions as non-viral vectors for plasmid DNA delivery. *Colloid. Surface. B*, **2010**, 79 (2), 509-515.
- Liu, Z. C.; Shin, D. S.; Shokouhimehr, M.; Lee, K. N.; Yoo, B. W.; Kim, Y. K.; Lee, Y. S. - Light-directed synthesis of peptide nucleic acids (PNAs) chips. *Biosens. Bioelectron.*, **2007**, 22 (12), 2891-2897.
- Löffler, G. - Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie. **2001**, Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Lowry, T. H.; Richardson, K. - Mechanismen und Theorie in der organischen Chemie. **1980**, Verlag Chemie, Weinheim.
- Lu, X.-W.; Zeng, Y.; Liu, C.-F. - Modulating the Hybridization Property of PNA with a Peptoid-Like Side Chain. *Org. Lett.*, **2009**, 11 (11), 2329-2332.
- Luo, D.; Saltzman, W. M. - Synthetic DNA delivery systems. *Nat. Biotech.*, **2000**, 18 (1), 33-37.
- Meier, C.; Engels, J. W. - Peptide nucleic-acids (PNAs) - unusual properties of nonionic oligonucleotide analogs. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1992**, 31 (8), 1008-1010.
- Merrifield, R. B. - Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85 (14), 2149-2154.
- Müller, H. J.; Röder, T. - Microarrays. **2004**, Spektrum Akademischer Verlag, München.
- Mullis, K. B.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H. - Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Sym.*, **1986**, 51 (1), 263-273.
- Mullis, K. B. - The polymerase chain reaction. **1994**, Birkhäuser, Boston.
- Natsume, T.; Ishikawa, Y.; Dedachi, K.; Tsukamoto, T.; Kurita, N. - Hybridization energies of double strands composed of DNA, RNA, PNA and LNA. *Chem. Phys. Lett.*, **2007**, 434 (1-3), 133-138.
- Nelson, D.; Cox, M. - Lehninger Biochemie. **2008**, Springer, Heidelberg.

- Newton, P. N.; White, N. J.; Rozendaal, J. A.; Green, M. D. - Murder by fake drugs. *Brit. Med. J.*, **2002**, 324 (7341), 800-801.
- Newton, P. N.; Green, M. D.; Fernández, F. M. - Impact of poor-quality medicines in the developing world. *Trends Pharmacol. Sci.*, **2010**, 31 (3), 99-101.
- Nielsen, P. E. - Sequence selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine substituted polyamide. *Science*, **1991**, 254, 1497-1500.
- Nord, S. - Spektroskopische Untersuchung der inter- und intramolekularen Fluoreszenzlöschung von Rhodaminfarbstoffen durch Nukleotide und Nukleinsäuren. *Dissertation*, **1998**, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- O'Connell, J. - RT-PCR Protocols. *Method. Mol. Biol.*, **2002**, 193, 380.
- OECD - Die wirtschaftlichen Folgen von Produkt- und Markenpiraterie. **2008**, OECD.
- Peyret, N. - Prediction of Nucleic Acid Hybridization: Parameters and Algorithms. *Dissertation*, Wayne State University, **2000**.
- Piatek, A. S.; Tyagi, S.; Pol, A. C.; Telenti, A.; Miller, L. P.; Kramer, F. R.; Alland, D. - Molecular beacon sequence analysis for detecting drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Biotechnol.*, **1998**, 16 (4), 359-363.
- Pinel, J.; Varaine, F.; Fermon, F.; Marchant, G.; Maritoux, J. - Des faux vaccins anti-méningocoques lors d'une épidémie de méningite au Niger. Phénomène isolé ou généralisation de circuits criminels? *Méd. Mal. Infect.*, **1997**, 27 (Supplement 5), 563-563.
- Ratilainen, T.; Holmen, A.; Tuite, E.; Nielsen, P. E.; Norden, B. - Thermodynamics of Sequence-Specific Binding of PNA to DNA. *Biochemistry*, **2000**, 39 (26), 7781-7791.
- Sauer, J.; Wiest, H. - Diels-Alder-Additionen mit "inversen" Elektronenbedarf. *Angew. Chem.*, **1962**, 74 (10), 353.
- Sauer, J.; Sustmann, R. - Mechanistic Aspects of Diels-Alder Reactions: A Critical Survey. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1980**, 19 (10), 779-807.
- Sauer, M. - Entwicklung effizienter Fluoreszenzfarbstoffe für den hochempfindlichen Nachweis von Biomolekülen unter Einsatz zeitaufgelöster LIF-Spektroskopie. *Dissertation*, **1995**, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Sauer, M.; Drexhage, K. H.; Lieberwirth, U.; Müller, R.; Nord, S.; Zander, C. - Dynamics of the electron transfer reaction between an oxazine dye and DNA oligonucleotides monitored on the single-molecule level. *Chem. Phys. Lett.*, **1998**, 284 (3-4), 153-163.
- Seiter, A. - Health and Economic Consequences of Counterfeit Drugs. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **2009**, 85 (6), 576-578.

- Sergeyev, V. G.; Pyshkina, O. A.; Lezov, A. V.; Mel'nikov, A. B.; Ryumtsev, E. I.; Zezin, A. B.; Kabanov, V. A. - DNA Complexed with Oppositely Charged Amphiphile in Low-Polar Organic Solvents. *Langmuir*, **1999**, 15 (13), 4434-4440.
- Shin, D. S.; Lee, K. N.; Yoo, B. W.; Kim, J.; Kim, M.; Kim, Y. K.; Lee, Y. S. - Automated Maskless Photolithography System for Peptide Microarray Synthesis on a Chip. *J. Comb. Chem.*, **2010**, 12 (4), 463-471.
- Smith, A. M.; Heisler, L. E.; St Onge, R. P.; Farias-Hesson, E.; Wallace, I. M.; Bodeau, J.; Harris, A. N.; Perry, K. M.; Giaever, G.; Pourmand, N.; Nislow, C. - Highly-multiplexed barcode sequencing: an efficient method for parallel analysis of pooled samples. *Nucleic Acids Res.*, **2010**, 38 (13), 7.
- Southern, E. M. - Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **1975**, 98 (3), 503-517.
- Stadler, V.; Felgenhauer, T.; Beyer, M.; Fernandez, S.; Leibe, K.; Guttler, S.; Groning, M.; Konig, K.; Torralba, G.; Hausmann, M.; Lindenstruth, V.; Nesterov, A.; Block, I.; Pipkorn, R.; Poustka, A.; Bischoff, F. R.; Breitling, F. - Combinatorial synthesis of peptide arrays with a laser printer. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2008**, 47 (37), 7132-7135.
- Stokes, G. G. - On the Change of Refrangibility of Light. *Phil. Trans. R. Soc. London*, **1852**, 142, 463-562.
- Strohalm, M.; Hassman, M.; Kosata, B.; Kodíček, M. - mMass data miner: an open source alternative for mass spectrometric data analysis. *Rapid Commun. Mass Sp.*, **2008**, 22 (6), 905-908.
- Strohalm, M.; Kavan, D.; Novák, P.; Volný, M.; Havlíček, V. - mMass 3: A Cross-Platform Software Environment for Precise Analysis of Mass Spectrometric Data. *Anal. Chem.*, **2010**, 82 (11), 4648-4651.
- Stryer, L. - Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Ann. Rev. Biochem.*, **1978**, 47, 819-846.
- Stryer, L. - Biochemie. **1999**, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Tan, W.; Wang, K.; Drake, T. J. - Molecular beacons. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2004**, 8, 547-553.
- Thomson, S. A.; Josey, J. A.; Cadilla, R.; Gaul, M. D.; Fred Hassman, C.; Luzzio, M. J.; Pipe, A. J.; Reed, K. L.; Ricca, D. J.; Wiethe, R. W.; Noble, S. A. - Fmoc mediated synthesis of Peptide Nucleic Acids. *Tetrahedron*, **1995**, 51 (22), 6179-6194.
- Tyagi, S.; Kramer, F. R. - Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization. *Nat. Biotechnol.*, **1996**, 14 (3), 303-308.

- Venter, J. C.; Adams, M. D.; Myers, E. W.; Li, P. W.; Zhu, X.; u.a. - The Sequence of the Human Genome. *Science*, **2001**, 291 (5507), 1304-1351.
- Vernille, J. P.; Kovell, L. C.; Schneider, J. W. - Peptide Nucleic Acid (PNA) Amphiphiles: Synthesis, Self-Assembly, and Duplex Stability. *Bioconjugate Chem.*, **2004**, 15 (6), 1314-1321.
- Wang, K.; Tang, Z.; Yang, C. J.; Kim, Y.; Fang, X.; Li, W.; Wu, Y.; Medley, C. D.; Cao, Z.; Li, J.; Colon, P.; Lin, H.; Tan, W. - Molecular Engineering of DNA: Molecular Beacons. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2009**, 48 (5), 856-870.
- Wei, Y.; Marino, M.; Thompson, B.; Girard, J. E. - High-performance liquid chromatography separation methods for the analysis of peptide nucleic acids. *J. Chromatogr. A*, **1999**, 864 (1), 49-57.
- WHO - Good manufacturing practices and inspection. **2007**, WHO Press, Genf, Schweiz.
- WHO - Medicines: counterfeit medicines. **2010a**, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs275/en/>.
- WHO - General information on counterfeit medicines. **2010b**, <http://www.who.int/medicines/services/counterfeit/overview/en/>.
- Wiessler, M.; Waldeck, W.; Kliem, C.; Pipkorn, R.; Braun, K. - The Diels-Alder-Reaction with inverse-Electron-Demand, a very efficient versatile Click-Reaction Concept for proper Ligation of variable molecular Partners. *Int. J. Med. Sci.*, **2010**, 7 (1), 19-28.
- Wittung, P.; Nielsen, P.; Norden, B. - Direct observation of strand invasion by peptide nucleic acid (PNA) into double-stranded DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118 (30), 7049-7054.
- Wittung, P.; Nielsen, P.; Nordén, B. - Observation of a PNA-PNA-PNA Triplex. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119 (13), 3189-3190.
- Woodward, R. B.; Hoffmann, R. - Stereochemistry of Electrocyclic Reactions. *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, 87, 395-397.
- Woodward, R. B.; Hoffmann, R. - The Conservation of Orbital Symmetry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1969**, 8 (11), 781-932.
- Yang, D. L.; Fryxell, G. E. - Brand Positioning and Anti-counterfeiting Effectiveness. *Manage. Int. Rev.*, **2009**, 49 (6), 759-779.
- Zhilina, Z. V.; Ziemba, A. J.; Ebbinghaus, S. W. - Peptide Nucleic Acid Conjugates: Synthesis, Properties and Applications. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2005**, 5 (12), 1119-1131.
- Zuker, M. - Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.*, **2003**, 31 (13), 3406-3415.

- www1 - http://refworks.reference-global.com.ubproxy.ub.uni-heidelberg.de/Xaver/start.xav?startbk=10.1515_AKL&noredirect=1&SID=anonymous279380823337#_10.1515_AKL_%2F%2F*%5B%40attr_id%3D'_00103149'%5D
- www2 - <http://prometheus.uni-koeln.de.ubproxy.ub.uni-heidelberg.de/pandora/image/show/Image-frankfurt-57cf2ea0f3d56fef6033c00ad6ce5024f1272fc1>
- www3 - http://www.pci.tu-bs.de/aggericke/PC4/Kap_III/franck_1.gif
- www4 - <http://www.glenresearch.com/GlenReports/Images/GR17-14Fig2.gif>
- www5 - <http://www.jcu.edu.au/cgc/Nanodrop.jpg>
- www6 - http://www.pro-4-pro.com/media/product_hires/peglab3_p4p0805.jpg
- www7 - http://www.esPOCH.edu.ec/Imagenes/Iconos/escuela/2ef743_a-dna_b-dna_and_z-dna.png
- www8 - <http://www.gesim.de/upload/bilder/Dosiertchnik/Nano-Plotter/Typen/NP2.1E-neu.jpg>
- www9 - <http://www.gesim.de/upload/bilder/Dosiertchnik/Nano-Plotter/Technik/Pipzyklus-DE.jpg>
- www10 - <http://www.adnas.com/home>

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich während meines Studiums und meiner Doktorarbeit maßgeblich unterstützt haben und ohne die ich wahrscheinlich nicht bis hierher gekommen wäre.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Wolfrum danke ich herzlichst für die akademische Betreuung sowie sein Engagement und Interesse am Gelingen meiner Arbeit.

Bei Herrn Dr. Jörg Hoheisel möchte ich mich dafür bedanken, dass ich in seiner Arbeitsgruppe unter sehr angenehmen Bedingungen und mit großer Freiheit meine Versuche durchführen durfte. Es ist toll einen Chef zu haben, dessen Tür immer und für jeden offen steht!

Vielen Dank an Frau Dr. Anette Jacob, die neben der Betreuung auch die sozialen Komponenten nicht hat zu kurz kommen lassen! Danke liebe Nette, dass ich jetzt mit den Inlinern durch Matsch und über Schotter fahren kann!

Allen dreien danke ich dafür, dass sie auch in schwierigen Zeiten hinter mir gestanden und mich unterstützt haben!

Was ist eine Idee, die keinen interessiert?! Diese Frage musste ich mir nicht stellen! Ein riesiges Dankeschön gebührt Wolfgang Graf zu Castell-Castell für das Weiterleiten meiner Unterlagen, sein Engagement sowie die Vermittlung des Termins im Hause Faber-Castell. Anton Graf von Faber-Castell, Frau Dr. Spickenreither, Herrn Dr. Lugert und Herrn Dr. Knäble danke ich von Herzen für die Möglichkeit, mein Projekt vorzustellen, für die Begeisterung, die sie meiner Idee entgegenbrachten, sowie für die Verwirklichung der Anwendung!

Eine gute Arbeitsatmosphäre ist nicht zuletzt auch von netten Kollegen abhängig. Ich hatte Glück und durfte mit ihnen zusammenarbeiten. Stellvertretend für die Gruppe „Funktionelle Genomanalyse (B070)“ sei Marc (Marci) Dauber für die Hilfe in vielen Laborsituationen sowie Wolfgang Weinig für die zahlreichen PNA-Synthesen und für das Zuhören gedankt. Des Weiteren danke ich Christoph Schröder und Michaela Schanné für eine schöne Zeit. Danke, Anke (Mahler), dass Du meine Bestellungen immer schnell bearbeitet hast. Und nicht zu vergessen Sandeep Botla und Soniya Savant, die mir neben dem Labor auch beigebracht haben, wie richtiges indisches Essen schmeckt! Als der ESI-Spotter irreparabel zusammenbrach, sprangen Manuel Fugazza und Ronny Schmidt sofort ein. Dafür, dass sie mir ohne Wenn und Aber die anderen Spotter erklärten, gebührt ihnen ein großes Dankeschön.

Zuerst waren wir „nur“ Kommilitonen, während des Studiums wurden wir richtig enge Freunde. Ein großes Dankeschön schulde ich Nils, seiner Frau Melanie, Sabine, ihrem Mann Lars und Anne. Besonderen Spaß hatten Anne und ich bei gemeinsamen Kurzreisen, Fernsehsessions oder kulinarischen Events. Danke, dass Du immer alles gegessen hast, was ich gekocht habe!

Auch wenn die Rückenschmerzen fast unerträglich waren und ich mich kaum bewegen konnte, ist sie mit mir ins Boot gestiegen, um für Linderung zu sorgen! Deswegen und auch für die Suche nach dem Rechtschreibfehlerteufel möchte ich mich herzlich bei Katrin Jörger bedanken!

Guido Kamin hat für mich einen wichtigen Stein ins Rollen gebracht und mir damit die Tür gezeigt, durch welche ich gehen durfte! Vielen lieben Dank!

Bei meinem „Onkel“ Sorry bedanke ich mich dafür, dass er dazu beigetragen hat, dass sich Erna und Turk Sein in den wohlverdienten Ruhestand begeben können und Rudi endlich seiner wahren Bestimmung folgen kann.

Ich möchte besonders meinen Freunden aus Zypern danken, die schon seit Beginn meines Lebens wie eine Familie für mich waren, allen voran bei meinem Taufpaten Andreas, seiner Frau Konstantina, deren Tochter Maria mit ihrem Mann Dimitri und meinem Patenkind Konstantina:

Σας ευχαριστώ
για την αγάπη και την ζεστασιά με την οποία με δέχεστε,
για το ότι είμαι πάντα καλόδεκτη,
επειδή παραδέχεστε ολοκάρδια τις επιτυχίες μου χωρίς φθόνο,
γιατί είστε οικογένειά μου.

Auch Liane und Karl Friedrich gebührt ein großes Dankeschön, dafür, dass ich immer fürstlich umsorgt und bewirtet wurde. Danke für die geistreichen Diskussionen und die besten Kuchen, die ich je in meinem Leben essen durfte!!!

Achim, ich danke Dir dafür,

dass Du immer für mich da bist.

dass Du, wenn ich Probleme habe, Deine vergisst und alles liegen lässt, um mir zu helfen.

dass Du während dieser Doktorarbeit so oft meinen Kopf aus dem Sand gezogen und mich zum Weitermachen ermutigt hast.

dass die Zeit mit Dir so wunderschön ist.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinem Vater dafür bedanken, dass er mir beigebracht hat, dass wenn nicht der Glaube, so doch ein eiserner Wille, gepaart mit harter Arbeit, Berge versetzen können und damit ungeahnte Ziele erreichbar werden. Für manchen sah das in meiner Jugend nach Zwang und Einengung aus, doch nur dies ermöglicht mir jetzt und in Zukunft in einer Freiheit zu leben von der andere nicht einmal zu träumen wagen. Danke für die Förderung meiner sämtlichen Interessensgebiete und die Motivation zum lebenslangen Lernen! Um es mit den Worten von Wilhelm Busch zu beschließen: Dieses war der erste Streich, doch der zweite folgt sogleich!

Erklärungen gemäß § 8 (3) b) und c) der Promotionsordnung:

- a) ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.
- b) ich erkläre hiermit, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Heidelberg, im September 2010

Andrea Nies