Markierungsfreie DNA-Mikrochip Analytik

vorgelegt von

Diplom-Ingenieur

Ole Brandt

Von der Fakultät III - Prozesswissenschaften

der Technischen Universität Berlin

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ingenieurwissenschaften

- Dr.-Ing. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender:	Prof. Dr. Roland Lauster
Gutachter:	Prof. Dr. Ulf Stahl
Gutachter:	Dr. Jörg D. Hoheisel

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 31.03.2004

Berlin 2004

D 83

Danksagung

Diese Arbeit wurde von August 2000 bis Januar 2004 am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg in der Abteilung „Funktionelle Genomanalyse“ unter der Leitung von Herrn Dr. Jörg D. Hoheisel und Prof. Dipl.-Ing. Dr. Ulf Stahl (Institut für Biotechnologie, Fakultät III – Prozesswissenschaften der Technischen Universität Berlin) durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Ulf Stahl danke ich für sein Interesse an dem Projekt und die Betreuung dieser Promotionsarbeit.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Jörg Hoheisel für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Abteilung am Deutschen Krebsforschungszentrum durchführen zu können. Ebenso danke ich ihm für die Freiheiten, die mir bei meinen Experimenten gelassen wurden.

Danken möchte ich auch Julia Feldner und Markus Schröder aus der Gruppe von Prof. Dr. Heinrich F. Arlinghaus am Physikalischen Institut der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster für zahlreiche TOF-SIMS-Analysen.

Dr. Martina Schnölzer gilt mein Dank für die Möglichkeit zur Nutzung des MALDI-TOF-Massenspektrometers.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Anette (Antenne) Jakob und Achim Stephan für die gute Zusammenarbeit, für zahlreiche Diskussionen sowie für die maßgebliche Mitarbeit bei der Herstellung der Oberflächen für die PNA-Microarrays.

Nicht zuletzt möchte ich Boris Beckmann, Tim Waterboer und Dr. Marcel Scheideler für die netten Stunden im gemeinsamen Büro und abseits der Arbeit danken. Den übrigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke für die Hilfsbereitschaft, die angenehme Arbeitsatmosphäre sowie für manch lustige Stunden fernab der Wissenschaft.

Anette und Meike möchte ich für die unermüdliche und kritische Durchsicht des Manuskripts danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern!

Inhaltsverzeichnis

I Zusammenfassung....4

1 Einleitung....5

1.1 DNA-Microarray-Technologie....5

1.2 Synthetische DNA-Analoga....8

1.2.1 Peptide Nucleic Acids (PNAs)....9

1.2.2 Anwendungen von PNAs....10

1.2.2.1 Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH)....10

1.2.2.2 „PCR-Clamping“ mit PNAs....10

1.2.2.3 PNAs als „Light-Up Probes“....11

1.2.2.4 „Molecular Beacons“....12

1.2.2.5 Adressierbare Bibliotheken mit „PNA-Tags“....13

1.3 Synthese von PNAs und Peptiden....14

1.3.1 Boc- / Cbz-Schutzgruppen Chemie....14

1.3.2 Fmoc-Schutzgruppen Chemie....15

1.4 TOF-SIMS (time of flight - secondary ion mass spectrometry)....16

1.5 Ziele und Prinzip der Arbeit....19

2 Material und Methoden....21

2.1 Material....21

2.1.1 Chemikalien....21

2.1.2 Harze für die Festphasensynthese von PNAs....22

2.1.3 Synthetische Oligonukleotide....23

2.1.4 Enzyme....23

2.1.5 DNA-Längenstandards....24

2.1.6 Puffer und Lösungen....24

2.1.7 Materialien....24

2.1.8 Geräte....25

2.1.9 Software....26

2.2 PNA- und Peptid-Synthese....27

2.2.1 PNA-Synthese....28

2.2.2 Synthese von PNAs mit Modifikationen....31

2.2.3 PNA-Synthese an 0,5 mg und in 384er Platten mit Membran....31

2.2.4 Peptidsynthese an unterschiedlichen Harzen....32
2.2.4.1 Abspaltung vom „Rink resin LS“....33
2.2.4.2 Abspaltung vom „NovaSyn® TG Sieber resin“....33
2.2.5 Bestimmung der Kopplungsraten....34
2.2.6 Analyse mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie....35
2.2.7 Konzentrationsbestimmung von PNAs....35
2.2.8 Berechnung der Schmelztemperatur (Tm) von PNA....36
2.3 Derivatisierung der Oberflächen....36
2.3.1 Silanisierung von Glas- oder Siliziumoberflächen....37
2.3.2 Aktivierung von Oberflächen....38
2.3.2.1 Aktivierung mit Di-(N,N'-succinimidyl)-carbonat (DSC)....38
2.3.2.2 Aktivierung mit 6-Maleinimidohexansäure-N-succinimidylester....38
2.3.2.3 Streptavidin-Beschichtung....39
2.3.2.4 Modifikation der Oberflächen mit Fmoc-Rink-Linker....39
2.3.2.5 Jeffamine ED-600® Oberflächen....40
2.4 Auftragen der PNA-Moleküle (Spotting)....41
2.5 Abspalten der PNAs von modifizierten Oberflächen....43
2.6 Hybridisierung der PNA-Microarrays....44
2.7 „Strippen“ der hybridisierten PNA-Microarrays....44
2.8 Analyse der Microarrays....45
2.8.1 Fluoreszenz-Analyse....45
2.8.2 TOF-SIMS-Analyse....45
2.8.3 Auswertung der Signalintensitäten mit GenePix....46
3 Ergebnisse....47
3.1 PNA-Synthese....47
3.1.1 Vergleich unterschiedlicher Syntheseharze....47
3.1.2 Optimierung der Syntheseparameter....49
3.2 Synthese an 0,5 mg Harz und in 384er Platten....51
3.3 Peptidsynthese an unterschiedlichen Harzen....53
3.4 Selektives Anbinden der PNAs an Oberflächen....56
3.4.1 Aktivierung der silanisierten Oberflächen....57
3.4.2 Anbinden von PNAs an aktivierte Oberflächen....58
3.4.3 Vergleich von APTES- und BSIL-Oberflächen....60

3.4.4 Parallele Aufreinigung der PNAs durch selektives Anbinden.....61
3.5 Hybridisierungsversuche mit PNA-Microarrays.....66
3.5.1 Selektivität der Hybridisierung auf PNA-Microarrays.....67
3.5.2 Wiederverwendbarkeit der PNA-Microarrays.....69
3.6 TOF-SIMS-Analyse von PNA-Microarrays.....71
3.6.1 DNA-spezifische Fragmentionen.....71
3.6.2 Unterschiedliche Primärionen.....72
3.6.3 Nachweisempfindlichkeit von TOF-SIMS.....74
3.6.4 Nachweis einer selektiven Hybridisierung mittels TOF-SIMS.....74
4 Diskussion.....76
4.1 Synthese von PNA-Molekülen.....77
4.1.1 Synthese in 384er Platten und an 0,5 mg Harz.....79
4.2 Synthese von Peptiden.....80
4.3 Aktivieren von Oberflächen zum Anbinden von PNAs.....82
4.4 Spotten von PNAs auf aktivierte Oberflächen.....83
4.5 Effektivität der selektiven Anbindung von PNAs.....85
4.5.1 Konzentration der zu spottenden PNAs.....86
4.6 Hybridisierungen von PNA-Microarrays.....88
4.6.1 Selektivität der Hybridisierung.....88
4.6.2 Wiederverwendbarkeit von PNA-Microarrays.....89
4.7 TOF-SIMS-Analyse von hybridisierten PNA-Microarrays.....89
4.7.1 Auswirkungen von unterschiedlichen Primärionen.....90
4.8 Ausblick.....91
5 Literaturverzeichnis.....94
6 Abkürzungsverzeichnis.....103
7 Anhang.....105
8 Eigene Publikationen.....106

I Zusammenfassung

Die DNA-Microarray-Technologie nimmt in der Analyse von Nukleinsäuren eine wichtige Stellung ein. Zur Herstellung eines Microarrays werden üblicherweise DNA-Oligonukleotide oder cDNAs auf einer Oberfläche an definierten Positionen gebunden. Der so hergestellte DNA-Microarray wird anschließend mit DNA-Sonden hybridisiert, die zuvor radioaktiv oder mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden. Mit geeigneten Messinstrumenten können so die Bindungspositionen und Intensitäten der markierten Sonden auf dem Microarray ermittelt werden. Um DNA- / RNA-Moleküle auch ohne zusätzliche Markierungen nachweisen zu können, wurden hier PNA-Microarrays in Kombination mit der TOF-SIMS-Analyse (Time Of Flight - Secondary Ion Mass Spectrometry) eingesetzt.

PNA ist ein synthetisches DNA-Analogon, welches anstelle des Desoxyribose-Phosphat- ein N-(2-Aminoethyl)glycin-Rückgrat besitzt. Durch dieses ungeladene Rückgrat sind PNA-Moleküle in der Lage, wesentlich schneller und mit einer größeren Affinität an komplementäre DNA- oder RNA-Moleküle zu hybridisieren als vergleichbare DNA-Oligonukleotide. Da es mittels TOF-SIMS möglich ist, die Phosphate des DNA- / RNA-Rückgrats nachzuweisen, können PNA-Microarrays, die frei von Phosphaten sind, für die Analyse von hybridisierten DNA-/RNA-Molekülen ohne zusätzliche Markierungen verwendet werden. Zur kostengünstigen und parallelen Herstellung von PNA-Molekülen in Mengen von ca. 150 nmol wurde die automatische Festphasensynthese in 96er und 384er Mikrotiterplatten etabliert, welche in modifizierter Form auch für die Herstellung von Peptiden genutzt werden konnte. Das Spotten von unaufgereinigten PNAs direkt nach der Synthese auf entsprechend aktivierte Glas- und Silizium-Oberflächen ermöglichte eine „On-Chip“-Aufreinigung der Endprodukte von den Abbruchsequenzen. Dabei wurden die PNAs spezifisch über ihre N-terminalen Gruppen an die Oberflächen gebunden. Mit den so hergestellten PNA-Microarrays wurden Hybridisierungen von DNA-Molekülen und deren anschließende Analyse mittels TOF-SIMS erfolgreich durchgeführt.

Zusätzlich wurde gezeigt, dass sich PNA-Microarrays auch für die Detektion von Einzelbasenmutationen eignen.

1 Einleitung

1.1 DNA-Microarray-Technologie

Molekularbiologisch und / oder diagnostisch genutzte Arrays bestehen aus einer definierten geometrischen Anordnung von Probenmolekülen (DNA, DNA-Analoga, Peptide, Proteine, Antikörper, ...), welche auf einer Oberfläche fixiert sind. Im Falle von DNA-Microarrays werden an den einzelnen Positionen, die das Gesamtarray ausmachen, DNA-Moleküle mit definierter Sequenz gebunden. Die DNA-Microarray- oder DNA-Chip-Technologie beruht auf der Eigenschaft, dass sich zwei zueinander komplementäre DNA-Einzelstränge unter bestimmten Bedingungen zu einer Doppelhelix zusammenlagern. Durch das Fixieren von bekannten Proben-DNAs auf einer Oberfläche ist es so möglich, komplementäre Ziel-DNAs aus einem komplexen Gemisch nachzuweisen.

Bereits 1975 wurden DNAs (Southern Blot (Southern, 1975)) und später auch RNAs (Northern Blot) auf Zellulose- oder Nylonmembranen fixiert und mit radioaktiv markierten DNA-Oligonukleotiden hybridisiert. Auf diese Weise konnte festgestellt werden, ob die zu den markierten Oligonukleotiden komplementären DNAs oder RNAs unter den fixierten Molekülen vorhanden waren. Später wurden Filter mit fixierten cDNA-Bibliotheken hergestellt. Diese Filter wurden dazu benutzt, nach einer Hybridisierung mit positiven Signalen Bakterien-Klone aus der verwendeten Bibliothek zu sortieren, welche die entsprechenden komplementären cDNAs für weitere Experimente enthielten. In den 90er Jahren wurden anstelle von Membranen zunehmend Oberflächen aus Kunststoff oder Glas verwendet. Diese festen Oberflächen ermöglichten es, geringere Mengen der Probenmoleküle auf einer kleineren Fläche zu fixieren. Die aufgebrachten Mengen je Spot liegen hier inzwischen im Pico- bis Nanoliterbereich, während sie bei den porösen Membranen um einige Zehnerpotenzen größer sind. Mitentscheidend für das Aufbringen solch kleiner Flüssigkeitsmengen ist das Verhalten der unterschiedlichen Oberflächen. Im Gegensatz zu den Nylon- oder Zellulosemembranen saugen die festen und weniger porösen Materialien die aufgebrachten Proben nicht auf, wodurch ein kleiner Tropfen mit klar umrissenen Konturen aufgebracht werden kann. Durch diverse Modifikationen der Oberflächen und die Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittel kann die Form und Größe des abgegebenen Tröpfchens zusätzlich verändert werden.

Mit dem Wechsel der Oberflächen gelang der Umstieg von Macroarrays (Spotdurchmesser größer als 300 µm) auf Microarrays (Spotdurchmesser kleiner als 200 µm). Einhergehend mit der Miniaturisierung und der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen zum Markieren

der Ziel-Moleküle ist es inzwischen möglich, zehntausende von Genen parallel auf einer Fläche von wenigen Quadratzentimetern zu analysieren. Ein weiterer Vorteil von Microarrays ist die geringe Menge des benötigten Probenmaterials, was besonders im Zusammenhang mit wertvollen Proben wichtig ist.

Generell können DNA-Microarrays durch zwei Methoden hergestellt werden. Die Probenmoleküle können entweder durch Pin- oder Piezospotter direkt auf die Oberfläche aufbracht werden. Hierbei arbeitet der Piezospotter kontaktfrei, was die Gefahr eines möglichen Verschleppens von Probenmolekülen minimiert. Die zweite Möglichkeit ist die *in situ* Synthese von Oligonukleotiden direkt auf dem Trägermaterial (Fodor et al., 1991; Pease et al. 1994), welche noch kleinere Spot-Durchmesser auf der Oberfläche erlaubt. Es können so inzwischen mehr als 200 000 Spots auf einer Fläche von 1 cm^2 generiert werden (Shena et al., 1998; Lipshutz et al., 1999). Die Länge der *in situ* synthetisierten Probenmoleküle ist jedoch begrenzt, da die Kopplungsausbeuten pro Syntheseschritt geringer als 100% sind. Hierdurch entstehen bei jedem Synthesezyklus auf der Oberfläche Abbruchsequenzen, die mit zunehmender Moleküllänge einen immer größeren Anteil an der Summe aller Moleküle auf einem Spot ausmachen.

Das Haupteinsatzgebiet der DNA-Microarrays sind Expressionsanalysen, mit denen die Auswirkungen unterschiedlicher Faktoren wie Krankheiten, die Einnahme von Medikamenten, genetische Faktoren und verschiedenste Umwelteinflüsse untersucht werden können. Weitere Anwendungsfelder sind die Analyse von Mutationen / SNPs (single nucleotide polymorphisms) (Pastinen et al., 1997; Landegren et al., 1998), genomische Kartierung (Hoheisel et al., 1993; Aign et al., 2001), CGH (comparative genomic hybridisation) (Solinas-Toldo et al., 1997) oder die Analyse von DNA-Protein-Interaktionen (Bulyk et al., 1999). Dabei gibt es unterschiedliche Kriterien bei der Auswahl der Proben auf dem Microarray. Für die Expressionsanalyse werden eine hohe Spezifität und Signalintensität benötigt, weshalb für diese Anwendung PCR-amplifizierte cDNAs (Brown et al., 1999; Schena et al., 1995) oder lange DNA-Oligonukleotide mit 50 - 120 nt (Kane et al., 2000; Wang et al., 2003; Barczak et al., 2003) als Proben auf dem Microarray vorteilhaft sind. Für die Genotypisierung von SNPs ist es entscheidend, dass sich eine einzelne Basenfehlpaarung (Mismatch) zwischen den zu analysierenden DNA-Molekülen und der Probe auf dem Microarray möglichst destabilisierend auswirkt, gleichzeitig jedoch eine möglichst hohe Spezifität erreicht wird. Dieses wird mit kürzeren Oligonukleotiden (15 - 25 nt) am besten erreicht, wobei auf einen Teil der Spezifität und Bindungsstärke zu Gunsten der Diskriminierung zwischen komplementären DNAs und solchen, die nur eine

Basenfehlpaarung mit der Probe auf dem Microarray haben, verzichtet wird. Für die Diskriminierung ist besonders der Unterschied der Schmelztemperatur ($\Delta T_{m,}$) zwischen vollständig komplementären DNA-Duplexen und solchen mit einem Mismatch entscheidend. Der ΔT_m-Wert kann durch die Verwendung von DNA-Analoga, welche inzwischen in vielen Variationen erhältlich sind (siehe 1.2), erhöht werden.

Die für die Herstellung von DNA-Microarrays verwendete Technik wird seit einigen Jahren auch für Peptid-, Protein- und Antikörper-Microarrays verwendet (MacBeath et al., 2000; Haab et al., 2001; Kusnezow et al., 2003; Miller et al., 2003; Zhu et al., 2001). Ein geringes Reaktionsvolumen, das besonders für kostbare Proben entscheidend ist, und das Array-Format ermöglichen eine parallele Analyse von Bindungskonstanten, katalytischer Aktivität, Protein-Protein-Interaktionen, Transkriptionsfaktoren, Protein-Wirkstoff-Interaktionen, posttranslationalen Modifikationen (Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung, Glykosilierung...) oder der Wirkung von Hormonen.

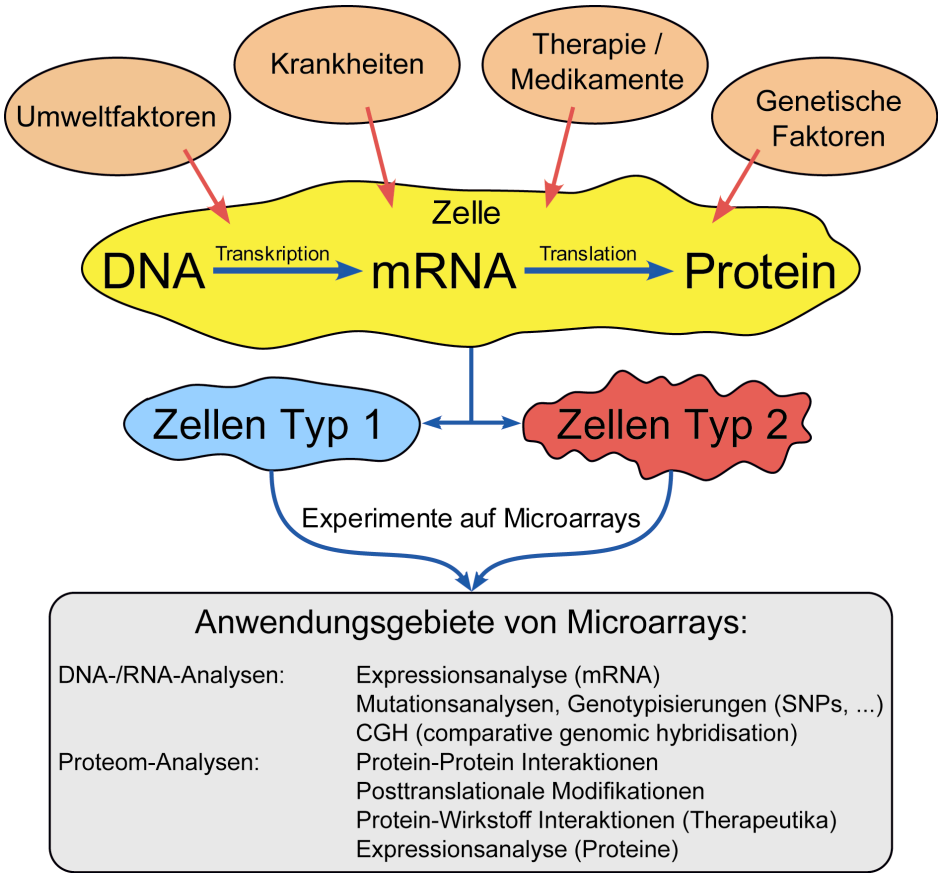

Abb. 1: Anwendungsgebiete von Microarrays. Verschiedene Faktoren beeinflussen den Stoffwechsel von Zellen. Es werden unterschiedliche mRNAs transkribiert und Proteine translatiert, wodurch sich Zelltypen ausbilden. Die unterschiedlichen mRNAs oder Proteine dieser Zelltypen können durch die Analyse mit Microarrays, auf denen DNA-Oligonucleotide, cDNAs, Peptide oder Antikörper fixiert sind, charakterisiert werden.

1.2 Synthetische DNA-Analoga

Synthetische DNA-Analoga spielen inzwischen eine wichtige Rolle in der modernen molekulargenetischen Analytik aber auch als potentielle pharmazeutische Wirkstoffe, da sie unter anderem als Antisense-Oligonukleotide eingesetzt werden können. Diese Antisense-Oligonukleotide können z.B. mit DNA eine doppelhelikale oder tripelhelikale Struktur bilden aber auch an mRNAs binden, wodurch die Transkription bzw. Translation inhibiert werden kann. Entscheidende Faktoren sind hierbei die Bindungsaffinität und Spezifität dieser Analoga, sowie deren chemische Beständigkeit und Stabilität gegenüber Endo- oder Exonukleasen.

Zu der Vielzahl an synthetischen Analoga gehören unter anderem Methylphosphonate, Phosphothioate, 2'-O-Methoxyethyl-RNAs, LNAs (Locked Nucleic Acids) (Singh et al., 1998; Petersen et al., 2000), HNAs (Hexitol Nucleic Acids) (Verheggen et al., 1995; Van Aerschot et al., 2001; Declercq et al., 2002) und nicht zuletzt PNAs (Peptide Nucleic Acids) (Nielsen et al., 1991).

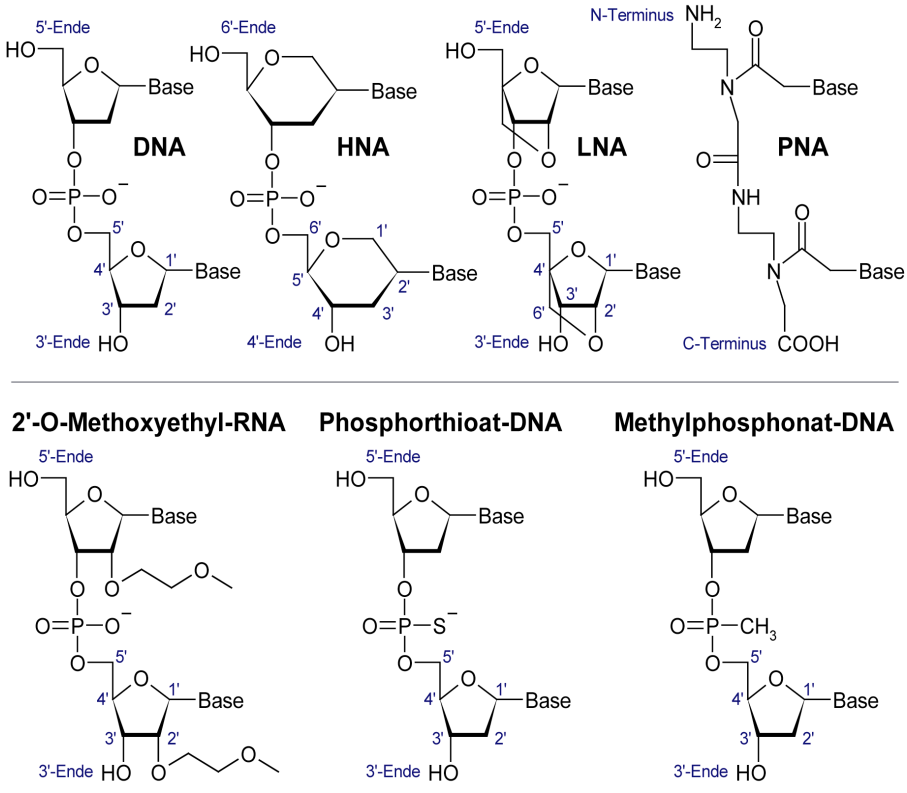

Abb. 2: Strukturen der unterschiedlichen synthetischen DNA-Analoga.

1.2.1 Peptide Nucleic Acids (PNAs)

Peptide Nucleic Acids wurden 1991 das erste Mal von Nielsen et al. beschrieben. Bei PNAs ist das Zucker-Phosphat-Rückgrat der natürlich vorkommenden Oligonukleotide komplett durch ein achirales und ladungsneutrales N-(2-Aminoethyl)glycin-Rückgrat ersetzt. Da PNA-Moleküle achiral sind, gibt es bei der Synthese der PNAs keine Probleme in Hinblick auf die Enantiomeren-Reinheit. Die vier Nukleobasen sind über Methylen-carbonyl-Linker an das Rückgrat der PNA gekoppelt. Da die einzelnen PNA-Monomere durch Peptidbindungen miteinander zum PNA-Oligomer verknüpft werden, kann die für die Synthese von Peptiden verwendete Chemie in abgewandelter Form auch für die PNA-Synthese verwendet werden. PNA-Moleküle sind sowohl chemisch als auch thermisch sehr stabil und werden nicht oder kaum durch Endonukleasen, Exonukleasen oder von Proteasen abgebaut (Demidov et al., 1994). PNA kann mit komplementären DNA- oder RNA-Molekülen nach den Watson-Crick-Regeln in paralleler sowie antiparalleler Richtung hybridisieren, wobei letztere die bevorzugte und stärkere Hybridisierung ist (Egholm et al., 1993). Hierbei hybridisiert der N-Terminus der PNA mit dem 3'-Ende der DNA / RNA. Der N-Terminus der PNA entspricht dabei dem 5'-Ende und der C-Terminus dem 3'-Ende der DNA bzw. RNA. In NMR-Untersuchungen wurde zudem gezeigt, dass PNA:RNA-Hybride eine Typ A-Helix bilden (Brown et al., 1994), während sich bei PNA:DNA-Hybriden sowohl Typ A- als auch Typ B-Helices ausbilden können (Eriksson & Nielsen 1996; Leijon et al. 1994).

Durch das ungeladene Rückgrat der PNA werden komplementäre negativ geladene DNA- oder RNA-Moleküle nicht abgestoßen, so dass PNA:DNA- und PNA:RNA-Duplexe wesentlich stärker hybridisieren als vergleichbare DNA:DNA- oder DNA:RNA-Duplexe (Schwarz et al., 1999; Giesen et al, 1998). Zusätzlich können PNA:DNA-Hybridisierungen auch noch in Lösungen mit geringer Salzkonzentration stattfinden. Im Allgemeinen gilt für PNA:DNA-Hybride, dass die Schmelztemperatur (T_m) im Vergleich zu DNA:DNA-Doppelsträngen pro Base um ca. 1°C höher ist. Für ein PNA 10mer (GTAGATCACT) wurde sogar gezeigt, dass der T_m-Wert vom PNA:PNA-Duplex ($T_m = 67°C$) über den PNA:DNA- ($T_m = 51°C$) bis hin zum DNA:DNA-Duplex ($T_m = 33,5°C$) noch stärker abnimmt (Wittung et al., 1994). Die hohe Selektivität der PNA:DNA-Hybride zeigt sich auch bei der Abnahme der T_m-Werte durch eine einfachen Basenfehlpaarung. Während zwischen zwei komplementären Strängen der T_m-Wert bei einem DNA:DNA-Doppelstrang mit einer Basenfehlpaarung um ca. 4 - 10°C abnimmt, sind es beim vergleichbaren PNA:DNA-Hybrid ca. 8 - 20°C (Egholm et al., 1993). Somit lassen sich Punktmutationen

in DNAs mit PNAs spezifischer detektieren als mit vergleichbaren DNA-Oligonukleotiden (Carlsson et al., 1996; Thiede et al., 1996; Perry-O'Keefe et al., 1996; Ross et al., 1997; Komiyama et al., 2003).

Eine andere Eigenschaft von PNA ist die Möglichkeit, DNA-Doppelstränge sequenzspezifisch zu erkennen und in diese zu interkalieren. Dieses ist besonders bemerkenswert, da die PNA Moleküle, die hierzu die Hybridisierungsentropie des DNA-Duplex überwinden, den bereits gepaarten Doppelstrang aufbrechen und eine neue Struktur mit ihm eingehen. Je nach PNA-Sequenz können unterschiedliche Duplex- und Triplex-Strukturen gebildet werden. Reine Homopyrimidin-PNAs, PNAs mit einem hohen Pyrimidin:Purin-Verhältnis oder PNA-Peptid-Konjugate neigen zur $(PNA)_2$-DNA-Triplexbildung, wobei ein PNA-Molekül nach Watson-Crick und das andere nach Hoogsteen-Regeln mit einem der beiden DNA-Stränge hybridisiert (Nielsen et al., 1991; Hanvey et al., 1992; Peffer et al., 1993; Demidov et al., 2001; Lohse et al., 1999; Kuhn et al., 1999). Der zweite DNA-Strang wird durch die PNAs verdrängt.

Inzwischen wurde eine Vielzahl an Variationen von chemisch modifizierten PNAs getestet, welche die positiven Eigenschaften noch ergänzen oder negative Eigenschaften wie die geringere Löslichkeit in wässrigen Lösungen verbessern (Ganesh et al., 2000).

1.2.2 Anwendungen von PNAs

1.2.2.1 Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH)

Mit Fluorszenzfarbstoffen modifizierte PNA-Moleküle werden dazu verwendet, komplementäre RNAs oder bestimmte DNA-Regionen in Zellen zu markieren. So wurde z.B. *Mycobacterium tuberculosis* in Sputum-Abstrichen mit fluoreszenzmarkierten PNA-Proben nachgewiesen (Stender et al., 1999). FISH-Analysen in intakten marinen Cyanobakterien zeigten bei der Verwendung von fluoreszenzmarkierten PNAs wesentlich höhere Signalintensitäten als fluoreszenzmarkierte DNA-Proben gleicher Sequenz (Worden et al., 2000).

1.2.2.2 „PCR-Clamping“ mit PNAs

Diese Methode erlaubt es, auch selten auftretende Punktmutationen mittels PCR nachzuweisen. Die Punktmutation liegt dabei meistens an einer Position, an der einer der beiden PCR-Primer bindet (Abb. 3 a). Dem PCR-Ansatz wird eine zur Wildtyp-DNA komplementäre PNA hinzugefügt, die das Anbinden des Primers und somit die PCR der Wildtyp-DNA verhindert. Bei einer Fehlpaarung (Mismatch) zwischen PNA und DNA wird der

PNA-DNA-Duplex destabilisiert, so dass die PNA durch den vollständig komplementären Primer verdrängt werden kann. Die PCR-Reaktion findet nach dem Binden des Primers für die DNA mit Mutation statt (Orum et al., 1993; Murdock et al., 2000; Sun et al., 2003). Es gibt auch die Möglichkeit PNA zu verwenden, die direkt hinter einem der beiden Primer (Abb. 3 b) oder zwischen den Primerpaaren (Abb. 3 c) liegt. Hierdurch wird verhindert, dass die Polymerase den DNA-Strang weiter verlängert (Behn & Schuermann, 1998). Diese Methode ist allerdings weniger effizient und es werden durchschnittlich längere PNAs benötigt, um die Amplifikation der DNA vollständig zu verhindern.

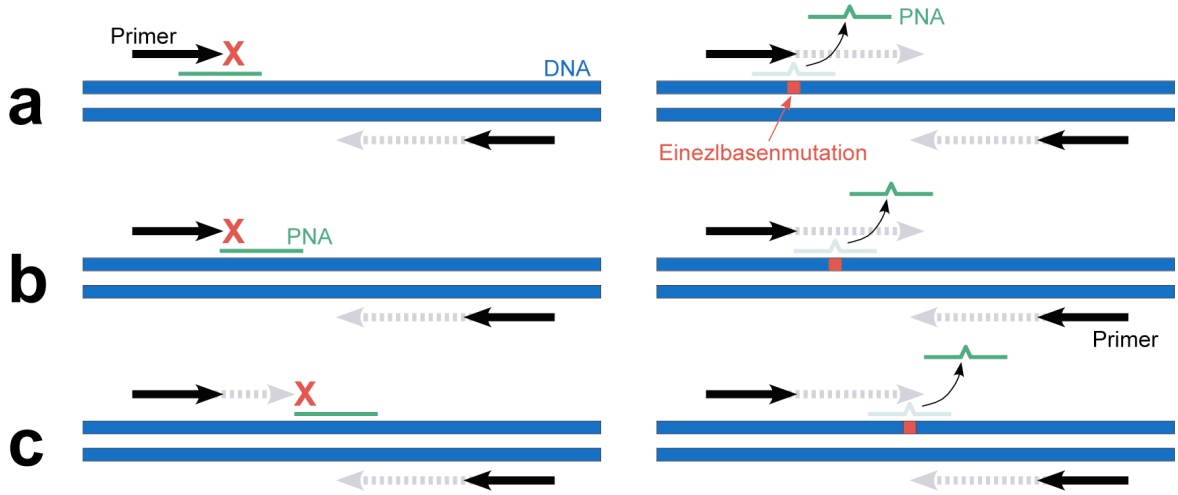

Abb. 3: Komplementäre PNAs (grün) verhindern auf unterschiedliche Art, dass ein PCR-Produkt entsteht: Der Primer kann nicht an die DNA hybridisieren (a), der Polymerase-Komplex kann den Primer nicht verlängern, da die PNA direkt vor dem Primer liegt (b) oder die Polymerase kann den Primer nur bis zur PNA verlängern und bricht dort ab (c). Bei einer einzelnen Fehlpaarung zwischen PNA und DNA wird die Hybridisierung der PNA destabilisiert und das PCR-Produkt kann gebildet werden.

1.2.2.3 PNAs als „Light-Up Probes“

„Light-Up Probes“ sind PNAs mit einem Thiazolorange (TO) Farbstoff, bei dem entweder das Sticktoffatom der Chinolin- (TO-N) oder der Benzothiazol-Gruppe (TO-N') über einen Linker mit dem N-Terminus der PNA verbunden ist. In Lösung ist Thiazolorange kaum fluoreszierend (die Quantenausbeute in freier Lösung ohne DNA ist ca. $2 \cdot 10^{-4}$). Bindet Thiazolorange an Nukleinsäuren, so interkaliert der Farbstoff, wodurch die beiden aromatischen Systeme fixiert werden und stärker fluoreszieren (die Quantenausbeute steigt auf ca. 0,1) (Lee et al., 1986; Nygren et al., 1998). Bindet eine PNA mit Thiazolorange-Farbstoff an eine komplementäre DNA, so interkaliert der Farbstoff zwischen die Basen des DNA-Strangs. Das Fluoreszenzsignal steigt deutlich an und kann detektiert werden. „Light-Up Probes“ können für FISH, zur Detektion von PCR-Produkten oder zur Analyse von Mutationen verwendet werden (Isacsson et al., 2000; Svanvik et al., 2000).

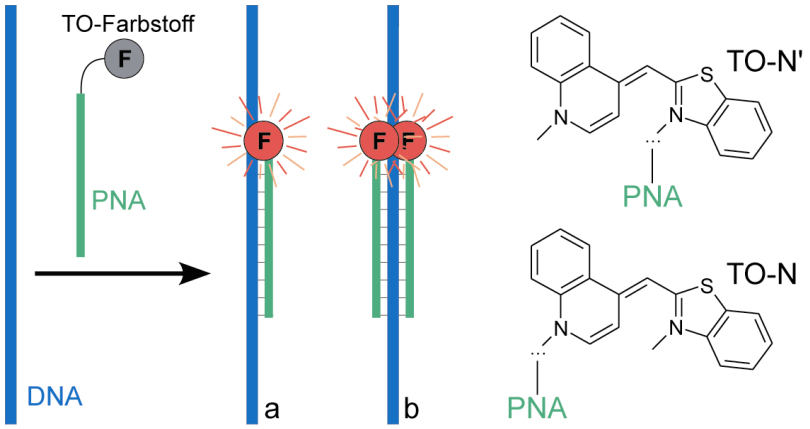

Abb. 4: Schematische Abbildung der Anlagerung von „Light-Up"-PNAs mit gemischten Sequenzen (a) oder Homopyrimidin-Sequenzen (b) an eine komplementäre DNA. Der Thiazolorange-Farbstoff (Struktur auf der rechten Seite) fluoresziert bei Anlagerung an DNA.

1.2.2.4 „Molecular Beacons"

„Molecular Beacons" sind kurze DNA- oder PNA-Moleküle, die an ihrem einen Ende mit einem Fluoreszenz-Molekül und am anderen Ende mit einem Quencher-Molekül modifiziert sind. Das Quencher-Molekül löscht im nicht hybridisierten Zustand das Signal des Fluoreszenz-Moleküls aus. Hybridisiert das DNA- oder PNA-Molekül an einen komplementären DNA- oder RNA-Strang, so sind Fluoreszenz- und Quencher-Molekül soweit voneinander entfernt, dass das Fluoreszenzsignal nicht mehr ausgelöscht wird und somit detektiert werden kann (Tyagi et al., 1996). Die PNA- oder DNA-Beacons können dabei sowohl für die Detektion komplementärer einzelsträngiger als auch doppelsträngiger DNA – bei der Verwendung von sogenannten „PNA openern" – verwendet werden (Kuhn et al., 2001; Kuhn et al., 2002).

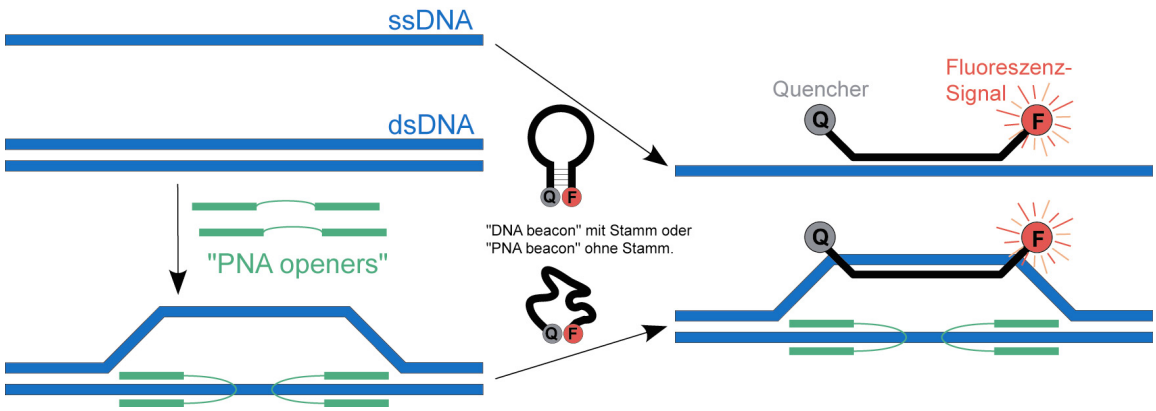

Abb. 5: Sowohl einzelsträngige DNA (ssDNA) als auch doppelsträngige DNA (dsDNA) können mit „molecular beacons" nachgewiesen werden. Bei doppelsträngiger DNA werden die beiden Stränge mit sogenannten „PNA openern" (grün; zwei kurze PNA-Moleküle, die über einen flexiblen Linker miteinander verknüpft sind und mit komplementärer DNA einen stabilen Triplex bilden) voneinander getrennt. Es entsteht ein PD-loop, der für „molecular beacons" zugänglich ist.

1.2.2.5 Adressierbare Bibliotheken mit „PNA-Tags“

Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von PNA-Molekülen als komplementäre Anker („Tags“) in Kombination mit kleinen Molekülen aus Molekül-Bibliotheken (z.B. Protein-Liganden, potentielle Wirkstoffe, usw.) (Winssinger et al., 2002). Dabei werden die Moleküle aus der Bibliothek an PNAs mit definierter Sequenz gekoppelt und anschließend mit zuvor fluoreszenzmarkierten Proteinen inkubiert. Nach dem Inkubieren wird die Lösung auf einen DNA-Microarray geben, auf dem die Sequenzen der gebundenen DNA-Oligonukleotide komplementär zu den „PNA-Tags“ sind. Die PNAs mit den kleinen Molekülen aus der Bibliothek hybridisieren an die DNA-Oligonukleotide auf dem Microarray. Hat während der Inkubation ein markiertes Protein an ein Molekül aus der Bibliothek gebunden, so kann die Position auf dem Microarray anhand des Fluoreszenzsignals bestimmt werden. Mit der Position lässt sich die Sequenz der PNA und damit auch das entsprechende Molekül aus der Bibliothek ermitteln. Es kann somit eindeutig zugeordnet werden, welche potentiellen Liganden / Wirkstoffe aus der Bibliothek während der Inkubation an die Proteine gebunden haben.

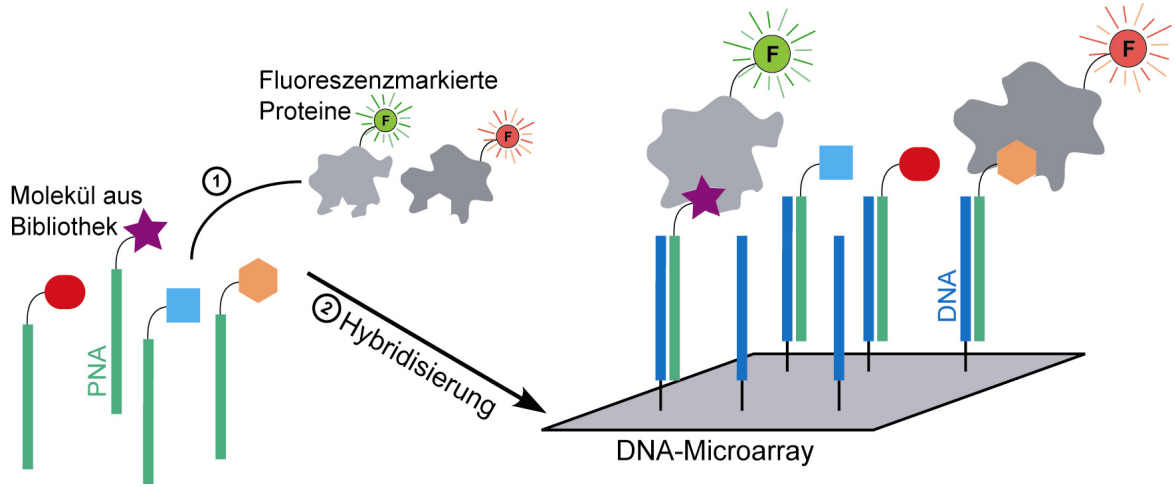

Abb. 6: Schematische Abbildung der Funktionsweise von Bibliotheken mit „PNA-Tags“. Kleine Moleküle aus einer Molekül-Bibliothek werden an PNAs mit definierter Sequenz gebunden. Mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Proteine werden mit dieser Molekül-PNA-Bibliothek inkubiert (①) und anschließend auf einen DNA-Microarray hybridisiert (②). Die DNA-Oligonukleotide auf dem Microarray haben zu den PNAs komplementäre Sequenzen, so dass die Positionen der Signale auf dem Microarray Molekülen aus der Bibliothek zugeordnet werden können.

1.3 Synthese von PNAs und Peptiden

Da PNA-Moleküle im Gegensatz zu DNA-Molekülen in sauren Lösungen nicht depurinieren und die einzelnen Bausteine (Monomere) der PNA über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind, können für die PNA-Synthese Festphasenmethoden verwendet werden, die ursprünglich für die Synthese von Peptiden entwickelt wurden. Zwei gängige Methoden haben sich hier für die Synthese von PNA-Molekülen etabliert. Die erste Methode folgt der klassischen Merrifield-Strategie (Merrifield, 1963), bei der die säurelabile *tert*-Butyloxy-carbonyl-Gruppe (Boc) als temporäre Schutzgruppe am N-Terminus der PNA-Monomere zum Einsatz kommt. Die zweite Methode lehnt sich an die Fmoc / *t*Bu-Strategie der Peptidchemie an (Fields & Noble, 1990), bei der der N-Terminus der PNA-Moleküle während der Synthese mit der basenlabilen 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Gruppe (Fmoc) geschützt ist (Thomson et al., 1995).

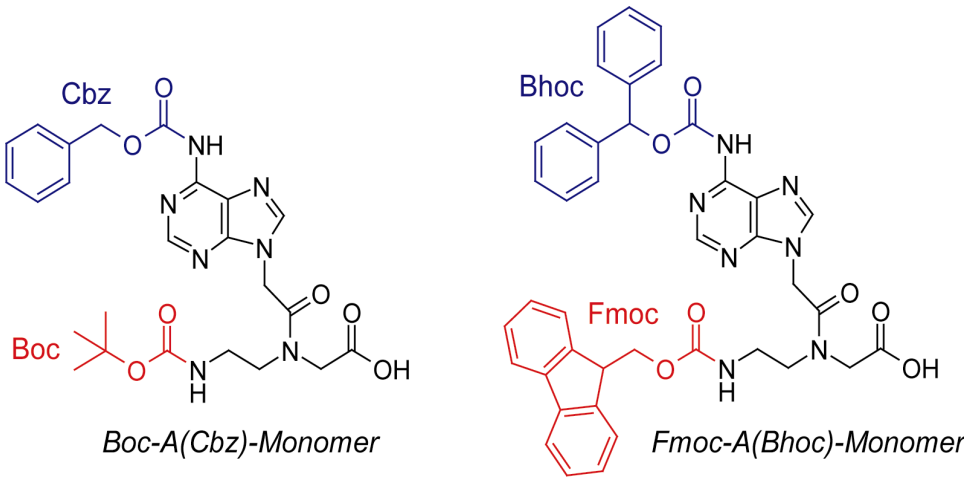

Abb. 7: PNA-Monomere mit den geschützten Nukleobasen, hier am Beispiel von Adenin. Auf der linken Seite ist das Adenin-Monomer für die Boc / Cbz-Synthese und auf der rechten Seite das für die Fmoc / Bhoc-Synthese dargestellt.

1.3.1 Boc- / Cbz-Schutzgruppen Chemie

Die *tert*-Butyloxycarbonyl / Benzyloxycarbonyl (Boc / Cbz) Chemie wurde für die Synthese der ersten PNAs, reine Homopolymere aus Thyminen, an Boc-L-Lysin-derivatisierten Polystyren-Harzen mit MBHA-Linker verwendet (Nielsen et al., 1991). Die Kopplung der PNA-Monomere erfolgte hier nach der Abspaltung der Boc-Schutzgruppen mit TFA über aktive Pentafluorphenyl-Ester mit Kopplungsausbeuten von 94 - 99%. Das fertige PNA-Molekül wurde nach der Synthese mit HF von der festen Phase abgespalten.
Mit den später genau beschriebenen Boc-geschützten PNA-Monomeren (Dueholm et al., 1994) wurden für alle vier Monomere nach deren Aktivierung mit DIC (N,N-Diisopropyl-

carbodiimid) hohe Kopplungsausbeuten festgestellt. Die N-terminale Gruppe wurde hier mit 50% TFA in Dichlormethan abgespalten. Systematische Untersuchungen anhand eines 17mer PNA-Moleküls wurden 1995 von Christensen et al. durchgeführt (Christensen et al., 1995), der feststellte, dass hohe Kopplungsraten mit HBTU als Aktivierungsreagenz erzielt werden konnten. Später wurde bei Synthese des gleichen PNA 17mers festgestellt, dass noch effektivere Kopplungsraten von durchschnittlich 99,4% mit Boc / Cbz geschützten Monomeren und HATU als Aktivierungsreagenz zu erreichen waren (Koch et al., 1997).
Generell ist die Boc / Cbz-Strategie eine sehr robuste und effiziente Methode zur Synthese von PNA-Molekülen. Die sauren Bedingungen, unter denen die Boc-Gruppen während der Synthese abgespalten werden, schützen gleichzeitig die freigesetzte primäre Aminogruppe durch Protonierung vor der N-Acyl-Transferreaktion, einer typischen Nebenreaktion, die unter basischen oder neutralen Bedingungen auftreten kann (Abb. 8 a). Trotz dieses Vorteils und der guten Kopplungsausbeuten, sind der Boc / Cbz-Methode aber auch Grenzen gesetzt. Da Trifluoressigsäure ein sehr aggressives Reagenz ist, kann sie in vielen Geräten nicht eingesetzt werden. Die zweite Strategie, die PNA-Synthese mit Fmoc-geschützten Monomeren, läuft unter wesentlich milderen Bedingungen ab.

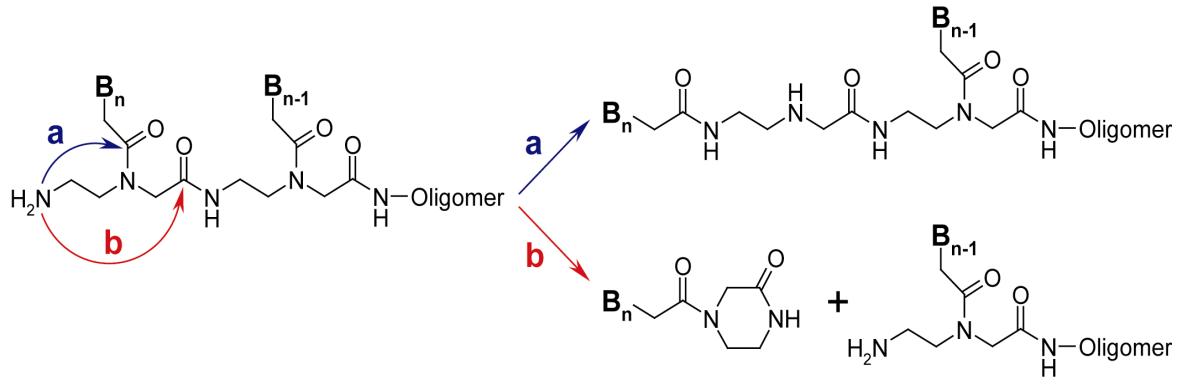

Abb. 8: Nebenreaktionen, die während der PNA-Synthese auftreten können. (a) N-Acyl-Transferreaktion (Christensen et al., 1995) und (b) Abspaltung des letzten PNA-Monomers am N-Terminus bei zu langer Einwirkung von Piperidin (Thomson et al., 1995). **B** = Basen (Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin).

1.3.2 Fmoc-Schutzgruppen Chemie

Die Synthese von PNAs mit Fmoc-geschützten Monomeren wurde das erste Mal 1995 von Thomson et al. gezeigt (Thomson et al., 1995), wobei die exozyklischen Aminogruppen der Nukleobasen mit der Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe während der Synthese geschützt waren. Mit den aktiven Pentafluorphenyl-Estern wurden hier Kopplungsausbeuten von 95 - 99% erreicht. Beim Entfernen der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe mit 30% Piperidin in 20% DMSO / NMP wurde das Abspalten des letzten PNA-Monomers vom

N-Terminus des PNA-Oligomers bei längeren Einwirkungszeiten festgestellt (Abb. 8 b). Die zweite Umlagerungsreaktion (N-Acyl-Transferreaktion, Abb. 8 a) war unter den verwendeten Bedingungen nicht nachweisbar. Anstelle der Cbz-Gruppe kann auch die säurelabile Benzhydryloxycarbonyl-(Bhoc)-Gruppe verwendet werden (Abb. 7). Nach abgeschlossener Synthese werden die Seitenschutzgruppen von den Nukleobasen und gleichzeitig die PNA-Moleküle mit TFA vom polymeren Träger abgespalten. Hierfür kann die letzte Fmoc-Gruppe an der PNA belassen werden, wodurch eine effizientere Aufreinigung über HPLC möglich ist. Die Fmoc-Gruppe fungiert beim HPLC-Lauf dann als lipophiler Anker (Thomson et al., 1995), wodurch höhere Retentionszeiten und somit eine bessere Auftrennung erreicht werden. Im Anschluss an die HPLC kann die Fmoc-Gruppe dann mit Piperidin abgespalten werden. Für die normale Aufreinigung von PNAs hat es sich allerdings bewährt, die Fmoc-Gruppe direkt nach der Synthese abzuspalten und die PNAs anschließend über HPLC zu trennen. Mit geeigneten Gradienten funktioniert die Auftrennung auch ohne die letzte Fmoc-Gruppe sehr gut.

Mit der Fmoc-Strategie ist eine milde Methode für die Synthese von PNA-Molekülen gegeben, die im Vergleich zur Boc-Strategie weniger hohe Anforderungen an die Materialien stellt. Ein weiterer Vorteil der Fmoc-Chemie ist die Möglichkeit zur direkten Bestimmung der Kopplungsausbeuten während der Synthese anhand des Dibenzofulven-Piperidin-Adduktes, welches bei der Abspaltung der Fmoc-Gruppe entsteht. Die Absorption dieses Abspaltungsproduktes wird bei einer Wellenlänge von 301 nm bestimmt, so dass anschließend die Konzentration nach dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet werden kann (Fields & Noble, 1990).

1.4 TOF-SIMS (time of flight - secondary ion mass spectrometry)

Bei der SIMS-Analyse wird durch einen primären Ionenstrahl mit Energien von 5-25 keV eine Kollisionskaskade von Molekülen auf der zu analysierenden Oberfläche ausgelöst. Durch diese Kaskade von Zusammenstößen der Primärionen mit den Molekülen der Oberfläche sowie von Molekülfragmenten untereinander werden Sekundärionen von der Oberfläche freigesetzt, die im Massenspektrometer analysiert werden können. Die Auftrennung der Sekundärionen nach ihrem Masse- zu Ladungsverhältnis (m/z) erfolgt beim TOF-SIMS im hohen Vakuum in einem Flugrohr, in welches die Ionen durch eine angelegte Spannung von einigen kV beschleunigt und am Ende des Flugrohres detektiert werden (Abb. 9).

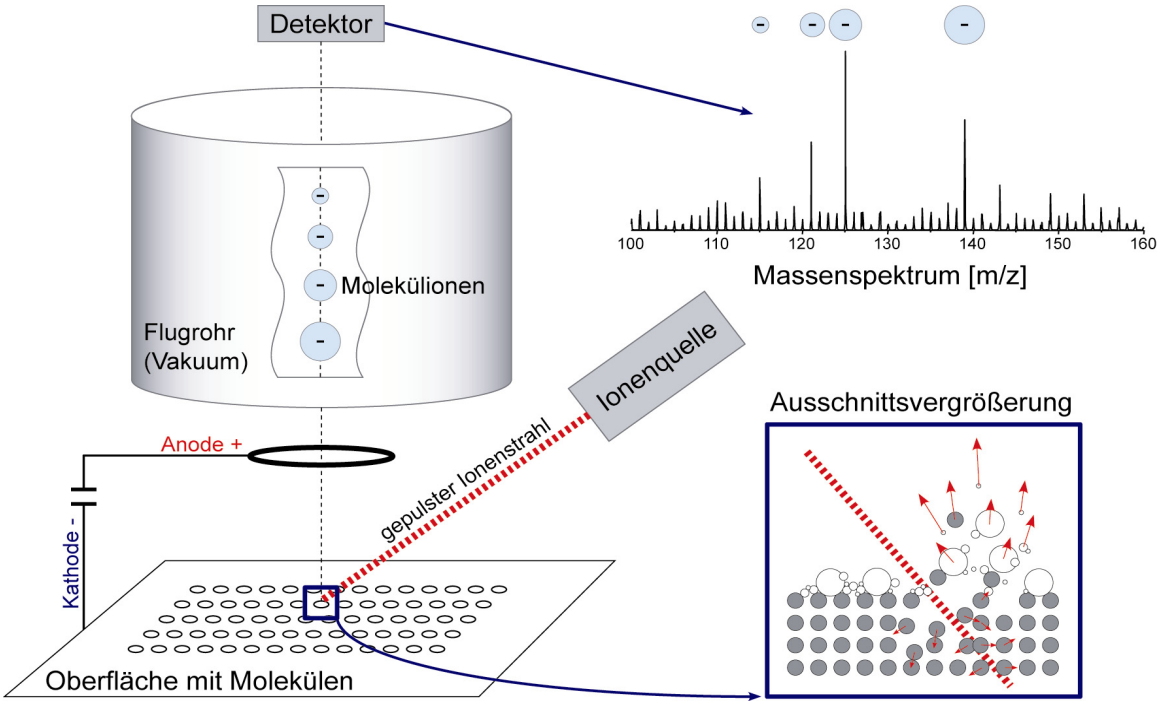

Abb. 9: Schematische Abbildung einer TOF-SIMS-Analyse. Auf die zu analysierende Oberfläche wird ein gepulster Ionenstrahl geschossen, der eine Kollisionskaskade auf der Oberfläche auslöst (siehe Ausschnittsvergrößerung). Durch diese Kaskade werden Sekundärionen erzeugt, die in das Flugrohr beschleunigt, dort aufgetrennt und am Ende detektiert werden. Im resultierenden Massenspektrum werden die Signale mit dem dazugehörigem Masse- zu Ladungsverhältnis (m/z) dargestellt.

Die entscheidenden Entwicklungen zur statischen TOF-SIMS-Analyse wurden in den 70er Jahren zum größten Teil von Benninghoven an der Universität Münster gemacht (Benninghoven, 1970 und 1972). Benninhoven untersuchte dabei die Oxidation von Metalloberflächen und kleine organische Moleküle auf Metalloberflächen. Ermöglicht wurde hierbei das Analysieren von organischen Molekülen im statischen SIMS-Modus erst durch das Reduzieren der Primärionen-Dosis. Im Unterschied zur dynamischen SIMS wird bei der statischen SIMS nur eine geringe Anzahl an Primärionen pro Puls verwendet. Hierdurch ist es möglich, die Oberfläche in nur geringem Maße zu zerstören und die Anzahl der großen Molekülfragmente unter den Sekundärionen zu erhöhen. In den 80er Jahren ermöglichte es die Weiterentwicklung der Geräte, größere organische Moleküle und Polymere zu untersuchen (Brown & Vickerman, 1984; Briggs & Wooten, 1982). Während aufgrund der geringen Kosten zunächst Quadrupol-Geräte verwendet wurden, kommen heute immer mehr TOF-Geräte zum Einsatz, mit denen im Gegensatz zu Quadrupol-Geräten größere Massenbereiche innerhalb kürzerer Zeit detektiert werden können.

Bei einer statischen TOF-SIMS-Messung werden zumeist die oberen 10 - 20 Å von Oberflächen analysiert. Durch die im Vergleich zu chemischen Bindungsenergien hohen Energien der Primärionen von einigen keV fragmentieren die Oberflächenmoleküle an der

Auftreffstelle der Primärionen sehr stark. In größerer Entfernung von dieser Stelle nehmen die Energien, mit denen die Atome / Moleküle zusammenstoßen, immer mehr ab, wodurch größere Molekülfragmente gebildet werden. Die Anzahl der großen Molekülfragmente erhöht sich mit zunehmenden Abstand und somit auch durch eine geringere Primärionendichte pro Fläche. Abhängig von den verwendeten Primärionen und der zu analysierenden Probe ist die Dichte bei der statischen SIMS kleiner als 10^{13} Primärionen pro Quadratzentimeter. Partikel, die in den ersten zwei bis drei Monolagen entstehen, haben genug Energie, um die Oberflächenbindungsenergie zu überwinden und verlassen die Oberfläche (Desorption). Diese Sekundärteilchen bestehen aus Atomen, Molekülfragmenten und Elektronen. Dabei sind nur ca. 10^{-6} bis 10^{-1} aller entstehenden Atome und Molekülfragmente geladen und können im Massenspektrometer analysiert werden. Hier wird allerdings schon seit einiger Zeit an einer Nachionisierung der neutralen Teilchen mittels Laser gearbeitet, welche die Ausbeute und damit die Sensitivität des TOF-SIMS erheblich verbessern kann (Schnieders & Benninghoven, 2000; Wucher, 2001).

Als Primärionenquellen werden die Elektronen- oder Plasmaionisierung von reaktiven oder inerten Gasen (z.B. O_2^+, Ar^+, Xe^{2+}), die Oberflächenionisierung (Cs^+) oder die Feldemission von Flüssigmetallen (Ga^+, Au^+) verwendet. Cs^+, Ga^+ und Au^+ als Primärionen erhöhen die Anzahl der negativ geladenen Sekundärionen für einige Molekülarten. Generell gilt für die Verwendung größerer Primärionen, dass die Anzahl der Sekundärionen, auch in den oberen Massenbereichen, erhöht wird (Stipdonk, 2001). In den letzten Jahren wurden Ionenquellen entwickelt, die aus mehreren Atomen bestehende Primärionen abgeben (z.B. SF_5 oder Gold-Cluster (Au_n^+)) (Davies et al., 2003; Walker & Winograd, 2003). Besonders Gold-Cluster als Primärionen erhöhen den Anteil an hochmolekularen Fragmentionen unter den gebildeten Sekundärionen signifikant. Zusätzlich haben sie einen sehr kleinen Ionenstrahldurchmesser (< 1 µm), wodurch eine hohe Auflösung beim Vermessen einer Fläche erzielt werden kann (Van Vaeck et al. 1999). Dieses ist besonders für die hochauflösende Darstellung der Intensitätsverteilung als Bild entscheidend.

1.5 Ziele und Prinzip der Arbeit

Gängige Methoden zur Auswertung von Microarrays beruhen auf der Detektion von markierten DNA- oder RNA-Molekülen. Zur Markierung werden hierbei entweder Fluoreszenzfarbstoffe oder radioaktive Isotope verwendet, welche in die zu analysierenden DNAs bzw. RNAs eingebaut werden müssen. Ziel der Arbeit war es, DNA-Moleküle nach einer Hybridisierung auf Microarrays ohne vorheriges Markieren nachzuweisen. Hierzu wurden anders als bei gängigen DNA-Microarrays keine DNA-Oligonukleotide oder cDNAs als Probenmoleküle auf der Oberfläche gebunden, sondern PNA-Moleküle. PNA-Moleküle besitzen im Gegensatz zu DNA oder RNA kein Phosphatrückgrat, wodurch es mit einer Methode zur Detektion von Phosphat-spezifischen Signalen möglich ist, Hybridisierungssignale von DNAs oder RNAs auf einem PNA-Microarray zu analysieren. Hybridisieren DNA- oder RNA-Moleküle an einer bestimmten Position auf dem Microarray an die dort fixierten PNAs, so können die Phosphate aus dem Rückgrat dieser DNA- / RNA-Moleküle nachgewiesen werden. An Positionen, an denen keine Hybridisierung stattfindet, können die Phosphat-spezifischen Signale nicht detektiert werden, da PNA völlig frei von Phosphaten ist. Arlinghaus und Kollegen (Arlinghaus et al., 1997) zeigten die Möglichkeit auf, Phosphat-spezifische Signale von DNA-Molekülen auf Oberflächen mit TOF-SIMS zu detektieren. Abbildung 10 zeigt exemplarisch eine Analyse von zwei PNA-Oberflächen, von denen eine mit komplementärer DNA hybridisiert wurde und die andere nicht. Es sind deutlich die Phosphat-spezifischen Peaks der Massen 63 Da (PO_2^-) und 79 Da (PO_3^-) bei der mit DNA hybridisierten PNA-Oberfläche zu sehen.

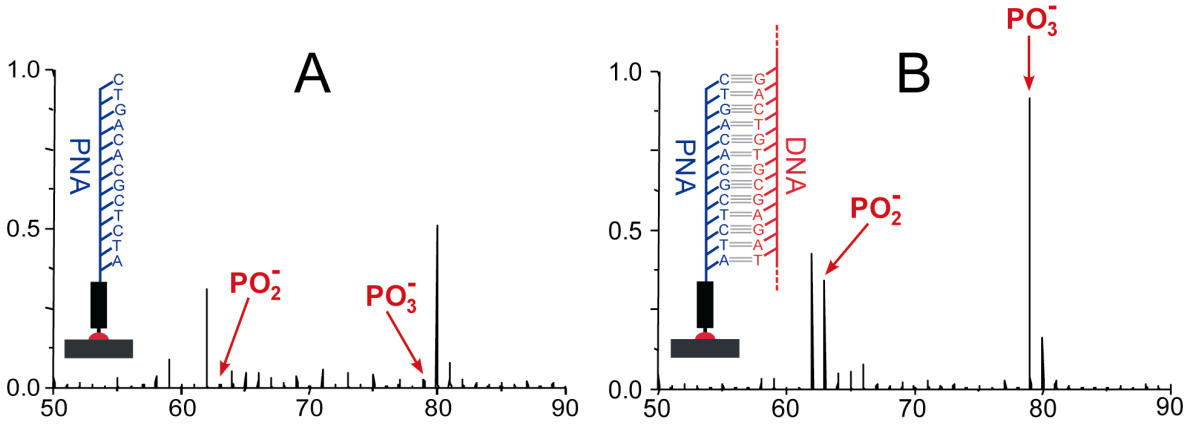

Abb. 10: Prinzip der Detektion von Phosphat-spezifischen Signalen aus dem Rückgrat von DNA- oder RNA-Molekülen. Auf der linken Seite ist ein TOF-SIMS-Spektrum eines fixierten PNA-Moleküls auf einer Oberfläche gezeigt (A). Auf der rechten Seite ist das TOF-SIMS-Spektrum der gleichen Oberfläche, die zuvor mit einer zur gebundenen PNA komplementären DNA hybridisiert wurde, abgebildet (B). Die zuvor nicht vorhandenen PO_2^-- und PO_3^--Signale sind hier deutlich zu sehen.

Ziel der Arbeit war es, die Produktion von PNA-Microarrays mit Oberflächen zu etablieren, welche die Analyse in TOF-SIMS-Geräten erlauben. Hierzu gehören vor allem Materialien, deren Oberfläche sich während der TOF-SIMS-Messung nicht zu stark auflädt wie z.B. mit Metallen beschichtete Oberflächen oder Silizium-Oberflächen. Hierfür sollte zunächst die PNA-Synthese automatisiert und der Maßstab der Synthese an die benötigten Mengen angepasst werden. Da gängige Apparate zur Synthese von PNAs nur eine oder wenige PNAs parallel synthetisieren konnten, sollte mit einem modifizierten Robotersystem die Parallelisierung der Synthese erreicht werden. Anschließend sollten unterschiedliche chemische Kopplungen der PNA-Moleküle für die verwendeten Oberflächen getestet werden und die Hybridisierungsbedingungen von DNAs auf den PNA-Microarrays optimiert werden. Nach der Optimierung der nötigen Parameter sollte die Analyse der mit DNA-Molekülen hybridisierten PNA-Microarrays mittels TOF-SIMS erfolgen und mit der gängigen Fluoreszenzanalyse der gleichen PNA-Microarrays verglichen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Agarose	Sigma, Taufkirchen
3-Aminopropyl-triethoxysilan (APTES)	Fluka
Aminosäure-Monomere mit Schutzgruppen:	Novabiochem
Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg-(Pbf)-OH, Fmoc-Asn-(Trt)-OH, Fmoc-Asp-(OtBu)-OH, Fmoc-Cys-(Mmt)-OH, Fmoc-Cys(tBu)-OH, Fmoc-Gln-(Trt)-OH, Fmoc-Glu-(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His-(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys-(Boc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Ser-(tBu)-OH, Fmoc-Thr-(tBu)-OH, Fmoc-Trp-(Boc)-OH, Fmoc-Tyr-(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH	
Alexa Fluor® 488 (als Succinimidyl-carbonat)	Molecular Probes
Ammoniumcitrat	Fluka
7-Aza-1-hydroxybenzotriazol (HOAt)	Applied Biosystems
Bernsteinsäureanhydrid	Fluka, Deisenhofen
Betain Monohydrat	Sigma, Taufkirchen
(+)-Biotin	Fluka
3-[Bis-(2-hydroxyethyl)-amino]-propyl-triethoxysilan	Fluka
1,1'-Carbonyldiimidazol (CDI)	Fluka, Deisenhofen
1,2-Dichlorethan	Fluka
Dichlormethan (DCM)	Fluka
2,5-Dihydroxybenzoesäure	Aldrich
N,N-Diisopropylcarbodiimid (DIC)	Fluka
N,N-Diisopropylethylamin (DIPEA)	Fluka
N,N-Dimethylformamid (DMF)	SdS, Frankreich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka
Di-(N,N'-succinimidyl)-carbonat (DSC)	Fluka
Essigsäureanhydrid (Ac_2O)	Fluka
Fmoc-A(Bhoc)-OH, Fmoc-C(Bhoc)-OH, Fmoc-G(Bhoc)-OH, Fmoc-T-OH (PNA-Monomere)	Applied Biosystems
Fmoc-AEEA-OH-Linker {2-[2-(Fmoc-amino)ethoxy] etoxy}acetic acid	Applied Biosystems

Fmoc-Rink-Linker (4-[(2,4-Dimethoxyphenyl)-(Fmoc-amino)-methyl]-phenoxyessigsäure)	Fluka
Glycerin	Roth
HATU (O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetra-methyluronium-hexafluorphosphat)	Applied Biosystems
HBTU (O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium hexafluorophosphate)	Fluka
HOAt (7-Aza-1-hydroxybenzotriazol)	Applied Biosystems
3-Hydroxypicolinsäure (3-HPA)	Fluka
Jeffamine ED-600® (O,O'-Bis-(2-aminopropyl)-poly-propylenglykol-block-poly-ethylenglykol-block-poly-propylenglykol 500)	Fluka
N-Lauroylsarcosin (Na-Salz), 30%	Serva, Heidelberg
2,6-Lutidin	Fluka
6-Maleinimidohexansäure-N-succinimidylester (EMCS)	Fluka
6-Mercapto-1-hexanol	Fluka
3-Mercaptopropionsäure	Fluka
1-Methyl-2-pyrrolidon (NMP)	Fluka
1-Methylimidazol (NMI)	Fluka
Natiumdodecylsulfat, SDS-b, DAB-10	Gerbu Biotechnik, Gaiberg
Piperidin	Fluka
Pyridin	SdS, Frankreich
Poly-L-Lysin Lösung	Sigma, Taufkirchen
Suprapur (25% NH_3 in Wasser)	Merk, Darmstadt
Trifluoressigsäure (TFA)	Fluka
Triisopropylsilan (TIPS)	Fluka

Alle anderen, nicht aufgelisteten Chemikalien wurden von den Firmen Fluka, Sigma oder Merck bezogen.

2.1.2 Harze für die Festphasensynthese von PNAs

Trityl amine resin Beladungsgrad: 2,3 mmol/g	Advanced ChemTech
NovaSyn® TG Sieber resin (9-Fmoc-amino-xanthen-3-yloxy TG resin) Beladungsgrad: 0,16 mmol/g	Novabiochem
Rink resin LS Beladungsgrad: 0,2 mmol/g	Advanced ChemTech

TentaGel®-S RAM Fmoc resin Beladungsgrad: 0,3 mmol/g	Advanced ChemTech
Wang amide resin Beladungsgrad: 0,7 mmol/g	Advanced ChemTech

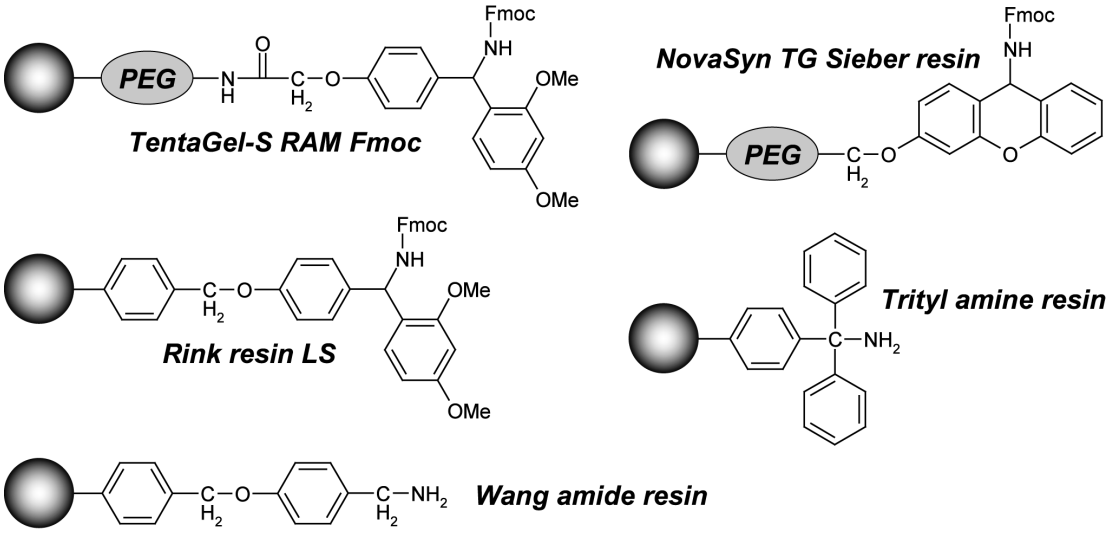

Abb. 11: Verwendete Syntheseharze mit Aminogruppen. Einige Harze haben einen zusätzlich PEG-Linker am Polystyrol-Grungerüst. PEG = Polyethylenglycol, Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-Gruppe.

2.1.3 Synthetische Oligonukleotide

DNA-Seq1_long: 5'-AGCGATAGCAGTTTGACCATCTGATCCGTAAGCTGCGTAAGCCGTATTCC-3'

DNA-Seq1-Cy5: 5'-Cy5-CTGATCCGTAAGCT-3'

DNA-TC_long: 5'-TTCGATAGCAGCTAAATTCTGAGAGAGGGAGAATTCTACAATAACTGCGC-3'

DNA-TC-Cy5: 5'-Cy5-GAGAGAGGGAGAA-3'

DNA-Seq2_long: 5'-GCTTTACCATTGATACTCTTCGAGCGATTCAATCGGTCAGAATACTTCTA-3'

DNA-Seq2A-Cy5: 5'-Cy5-TCGAGCAATTCAA-3'

DNA-Seq2C-Cy5: 5'-Cy5-TCGAGCCATTCAA-3'

DNA-Seq2G-Cy3: 5'-Cy3-TCGAGCGATTCAA-3'

DNA-Seq2T-Cy5: 5'-Cy5-TCGAGCTATTCAA-3'

In rot sind die komplementären Sequenzen zu den verwendeten PNA-Molekülen gekennzeichnet.

2.1.4 Enzyme

Taq DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden

2.1.5 DNA-Längenstandards

GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.6 Puffer und Lösungen

20× SSC-Puffer:	3 M NaCl 300 mM Tri-Natriumcitrat → in H_2O, auf pH 7,0 einstellen
50× TAE-Puffer:	0,4 M Tris-Base 0,4 M Essigsäure 20 mM EDTA
10× TBE-Puffer:	1,27 M Tris-Base 0,42 M Borat 24 mM EDTA → mit HCl auf pH 8,3 einstellen
1× TE-Puffer:	100 mM Tris-HCl 10 mM EDTA → auf pH 7,5 – 8,0 einstellen
2× BW-Puffer:	1 mM $Na_2EDTA \times 2H_2O$ 10 mM Tris × HCl (pH 7,5) 2 M NaCl
1× SSarc-Puffer:	600 mM NaCl 300 mM Tri-Natriumcitrat 7,2% (v/v) Natriumlauroylsarcosinat (30%) → in H_2O, auf pH 7,0 einstellen
10× PBS:	26,8 mM KCl 1,369 M NaCl 104,25 mM Na_2HPO_4 14,7 mM KH_2PO_4 → in H_2O, auf pH 7,4 einstellen

2.1.7 Materialien

Deckgläser, 22x22 mm	Roth, Karlsruhe
Eppendorfgefäße 0,5 ml / 1,5 ml / 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Falcon Gefäße 15 ml / 50 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Glaswolle	Serva, Heidelberg
Hybridisierungskammern	TeleChem Inc., Sunnyvale, USA
HybriSlip™, Deckgläser	Sigma, Taufkirchen

Kimwipes lite Präzisionstücher	Roth, Karlsruhe
Klebefolien für 96well / 384well Platten	Biozym, Hess. Oldendorf
Mikrotiterplatten 96well / 384well	Genetix, Christchurch, UK
Mikrotiterplatten 384well	Nunc, Wiesbaden
Objektträger	Menzel, Braunschweig
Oligonukleotide	Interactiva, Ulm
PCR-Softstripes 0,2 ml	Biozym, Hess. Oldendorf
Polyfiltronics, 384well Platten	Whatman Inc, Clifton, USA
Silizium-Wafer (2 × 2 cm / 5 × 5 mm)	GeSim, Grosserkmannsdorf
Spotting-Pins SMP3 / SMP10B	TeleChem, Sunnyvale, USA
Syntheseplatte (96well mit Fritten)	Intavis AG, Köln
Syntheseplatte (384well mit Filtern)	Pall, Dreieich
UV-Küvette	Eppendorf, Hamburg
ZipTip Pipettenspitzen	Millipore, Eschborn

2.1.8 Geräte

Analysewaage KERN 434	Kern & Sohn GmbH, Albstadt
Analysewaage KERN 440-45	Kern & Sohn GmbH, Albstadt
Auto-Spot Robot ASP 222	Intavis AG, Köln
Bruker Reflex II MALDI-TOF-MS	Bruker-Daltonik, Bremen
Elektrophoresekammern	Neolab, Heidelberg
Geldokumentationsstation	Biostep, Jahnsdorf
Heizblock	Grant Instruments, Cambridge, UK
Membranvakuumpumpe	Vacuubrand GmbH + Co KG, Wertheim
Membran-Vakuumpumpe CVC2000	H. Sauer Laborbedarf, Reutlingen
Photometer Ultrospec 2000	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
ScanArray 3000 / 5000	PerkinElmer
Schüttler	Neolab, Heidelberg
SDDC-2 Micro-Arrayer (ESI)	Eurogentec, Brüssel
Switch-Box B-745	BÜCHI Labortechnik GmbH, Essen
Thermocycler PTC-200	MJ Research, Waltham, USA
TOF-SIMS Typ IV (modifiziert)	ION-TOF GmbH, Münster
Ultraschall-Gerät	Sonorex Bandelin, Berlin
Vakuum-Konzentrator BA-VC-300H	H. Sauer Laborbedarf, Reutlingen
Vakuum-Station	Millipore, Schwalbach

Vakuumkontroller B-721	BÜCHI Labortechnik GmbH, Essen
Verteilersystem (402 Dilutor-Dispenser)	Gilson, Middleton (WI), USA
Wasserbad	Grant Instruments, Cambridge
Zentrifuge „Biofuge pico“	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge „Megafuge 1.0R“	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge „Sorval RC2-B“	Dupont Instruments, Bad Homburg

2.1.9 Software

GenePix™ Pro 4.1	Axon Instruments, Union City, USA
moverz (m/z)	Proteometrics, LLC
OpenOffice 1.1.0	http://www.openoffice.org
SigmaPlot 8.0	SPSS, Chicago, USA

2.2 PNA- und Peptid-Synthese

Die PNA- bzw. Peptid-Synthese wurde in Mikrotiter-Platten (96er-Format) mit integrierter Fritte in jedem „well“ an Syntheseharzen durchgeführt. Hierzu wurde ein Robotersystem zum automatischen Verteilen der Reagenzien sowie zum Absaugen der Lösungen aus der Platte verwendet. Das Robotersystem setzte sich aus einem Verteilersystem (402 Dilutor-Dispenser) mit zwei Spritzen (1 ml und 10 ml), einem in x-y-z-Richtung steuerbaren Roboterarm mit einer teflonbeschichteten Kanüle und einem 8er-Kamm zum Verteilen von Lösungsmitteln, einer Vakuumstation mit Pumpe sowie den Halterungen für Lösungsmittel, Reagenzien und Syntheseplatte zusammen (Abb. 12).

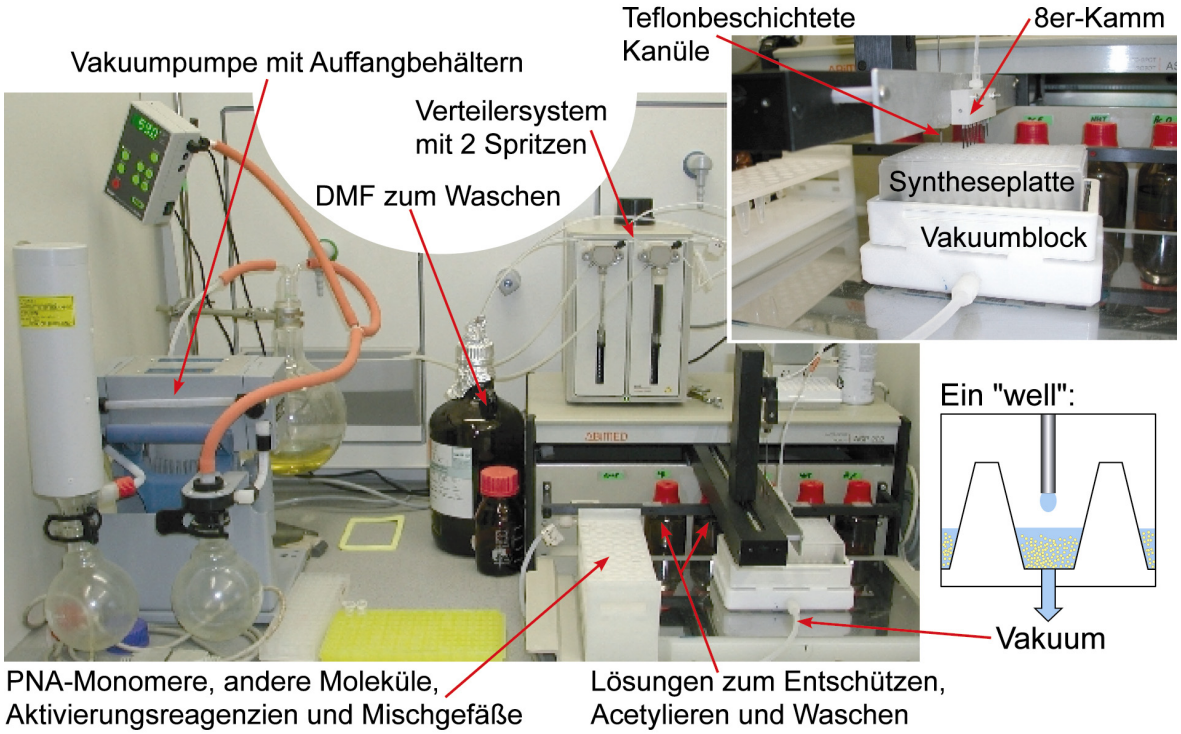

Abb. 12: Aufbau des Systems für die automatische PNA- oder Peptidsynthese. Über die teflonbeschichtete Kanüle werden die Aktivierungsreagenzien mit den Monomeren gemischt und in die einzelnen „wells“ der Syntheseplatte verteilt. Die 8er-Kamm wird zum gleichzeitigen Waschen von acht „wells“ verwendet. Alle Lösungen werden automatisch mittels einer Vakuumpumpe aus der Syntheseplatte abgesaugt.

Die teflonbeschichtete Kanüle wurde zum Mischen und Verteilen aller Reagenzien verwendet. Nur das Lösungsmittel DMF zum Waschen zwischen den einzelnen Synthese-schritten wurde über den 8er-Kamm verteilt. Vor Beginn einer Synthese wurde das System mit den entsprechenden Lösungsmitteln, Reagenzien, PNA- bzw. Aminosäure-Monomeren und anderen Bausteinen wie z.B. Biotin bestückt. Nachdem die zu synthetisierenden Sequenzen, die Koordinaten der anzufahrenden Positionen, die verwendeten Mengen der einzelnen Reagenzien und die Reaktionszeiten für die Synthese in den Computer einge-

geben waren, regelte dieser anschließend die komplette Synthese vollautomatisch. Dabei wurde auch das An- und Ausschalten der Vakuumpumpe über den Computer gesteuert. Nach der Synthese konnte ein zusätzlicher Zyklus programmiert werden. Dieser terminale Zyklus wurde zumeist für das Abspalten der letzten Schutzgruppe nach der Synthese sowie für das gründliche Waschen der PNA-Moleküle am Harz verwendet.

Zunächst wurden die Synthesebedingungen für verschiedene Syntheseharze mit unterschiedlichen Beladungsgraden in den 96er Platten optimiert. Hierbei sollten möglichst kleine Mengen der Syntheseharze verwendet werden, so dass auch der Verbrauch an relativ teuren PNA-Monomeren und Lösungsmitteln minimiert werden konnte. Für die Synthese wurde die in der Peptidsynthese gängige Kopplungschemie für Fmoc-geschützte (9-Fluorenylmethoxycarbonyl) PNA- / Aminosäure-Monomere verwendet. Als permanente Schutzgruppe für die Aminogruppen der Basen Adenin, Guanin und Cytosin kam die säurestabile Bhoc-Schutzgruppe (Benzhydryloxycarbonyl) zum Einsatz. Die Aminosäuren waren mit unterschiedlichen Seitenschutzgruppen, die unter 2.1.1 aufgelistet sind, versehen. Ein einzelner Synthesezyklus gliederte sich in das Abspalten der basenlabilen Fmoc-Schutzgruppe, die Kopplung des nächsten PNA- / Aminosäure-Monomers und die Acetylierung der nicht verlängerten Moleküle, damit diese für die nächste Kopplung nicht mehr zur Verfügung standen. Je nach Syntheseharz wurde mit der Kopplung des ersten Monomers oder mit der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe vom Harz begonnen. Die Synthese der PNAs / Peptide begann am Harz mit dem C-Terminus und endete am N-Terminus. Da die Ausbeuten der einzelnen Kopplungsschritte während der Synthese im allgemeinen geringer als 100% sind, wurde durch den Acetylierungsschritt verhindert, dass zuvor nicht verlängerte Sequenzen für die anschließende Kopplung zur Verfügung standen. Nach dem letzten Entschützen der vollständig synthetisierten Molekülen wurden diese vom Harz abgespalten (Abb. 13). Dabei wurden gleichzeitig auch die permanenten Bhoc-Schutzgruppen der Nukleobasen abgespalten.

2.2.1 PNA-Synthese

Die PNA-Monomere, Aminosäure-Monomere und andere zu koppelnde Moleküle wurden 0,3 M in NMP gelöst und bis zur Synthese als Stammlösungen bei -20°C aufbewahrt. Die Lösung zum Abspalten der Fmoc-Schutzgruppen (20% Piperidin in DMF) sowie die Acetylierungslösung (5% Essigsäureanhydrid und 6% 2,6-Lutidin in DMF) wurden drei bis vier Wochen verwendet, während die beiden Lösungen zum Aktivieren der Monomere (0,6 M HATU in DMF / 0,6 M DIPEA und 0,9 M 2,6-Lutidin in DMF) jeweils frisch

angesetzt wurden. Das Syntheseharz wurde vor der Synthese ca. eine Stunde in DMF quellen gelassen (2 mg Harz auf 100 µl DMF).

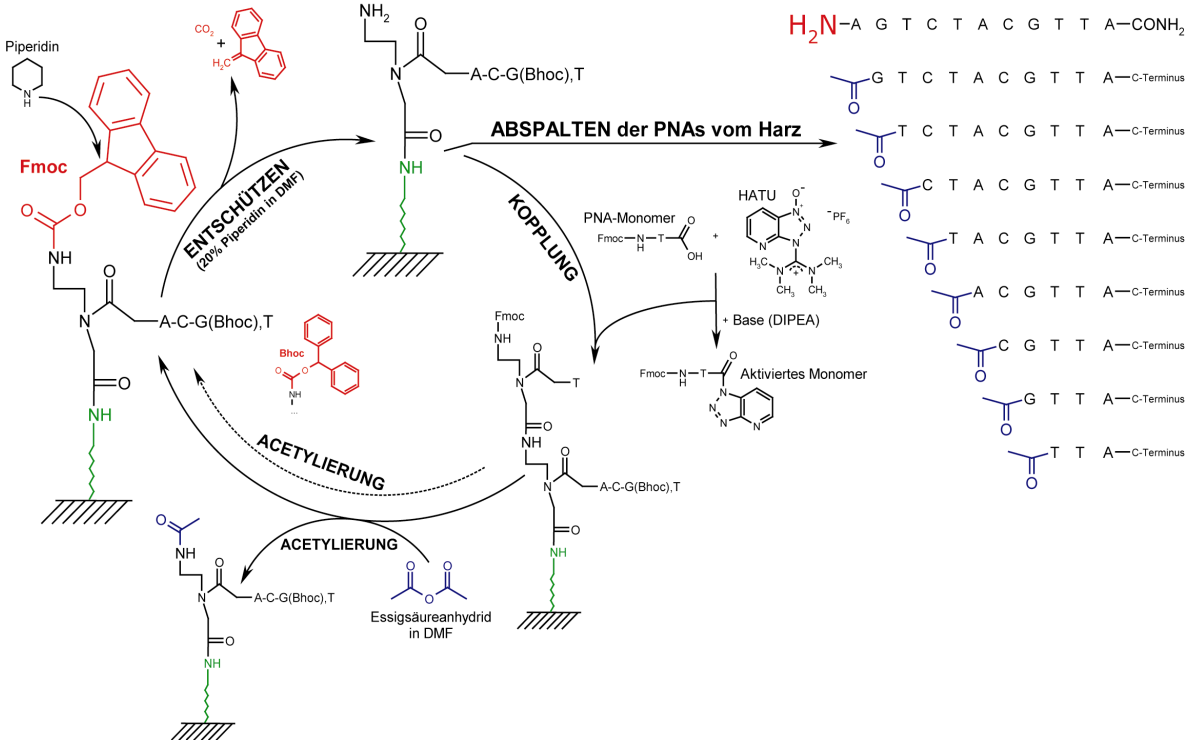

Abb. 13: Schematischer PNA-Synthesezyklus. Der Zyklus gliedert sich in das Abspalten der Fmoc-Schutzgruppen (Entschützen), die Kopplung des nächsten PNA-Monomers und die Acetylierung der nicht verlängerten PNA-Moleküle. Zum Schluss der Synthese werden die PNA-Moleküle vom Syntheseharz abgespalten.

Für die optimierte Synthese wurden pro „well“ 2 mg eines Fmoc-geschützten Rink-Linker-Syntheseharzes („Rink resin LS“) auf Polystyrol-Basis mit einem Beladungsgrad von 0,2 mmol/g verwendet. Je nach Anzahl der zu synthetisierenden PNA-Moleküle wurden entsprechende Mengen des Harzes für eine Stunde in DMF gequollen (100 µl DMF pro 2 mg Harz). Anschließend wurde die Suspension aus Harz und DMF gut gemischt und jeweils 100 µl pro „well“ in die 96er Syntheseplatte verteilt. Nach der Eingabe der Synthesparameter und der Sequenzen der zu synthetisierenden PNA-Moleküle wurde die Synthese mit dem Entschützen des Harzes gestartet. Generell wurden alle Lösungen, mit Ausnahme der Waschlösung (DMF), über die teflonbeschichtete Kanüle verteilt. Nach der vorgegebenen Zeit wurden die Lösungen über die Vakuumstation (15 sek) wieder aus der Syntheseplatte abgesaugt.

Die Fmoc-Schutzgruppe konnte durch zweimalige Zugabe von jeweils 30 µl 20% Piperidin in DMF für 1 min und für weitere 5 min entfernt werden. Anschließend wurde das Harz gründlich mit DMF gewaschen (5 × 80 µl). Für die Kopplung der ersten PNA-Monomere

wurden diese entsprechend der für den Zyklus benötigten Anzahl (n) gemischt und für 1 min voraktiviert. Dazu wurden n × 4 µl des entsprechenden Monomers mit n × 2 µl HATU (0,6 M in DMF) und n × 2 µl eines Gemisches aus DIPEA und 2,6-Lutidin (0,6 M / 0,9 M in DMF) gesondert in ein 0,5 ml Eppendorfgefäß gegeben. Die Voraktivierung war notwendig, da HATU auch mit der freien Aminogruppe des Harzes oder der zu verlängernden PNA unter der Bildung eines Guanidiniumsalzes reagieren kann (Abb. 14) (Koch et al., 1997). Anschließend wurden je „well" 8 µl der voraktivierten Monomere zum Harz gegeben, wo sie für 18 min (Monomer 1 bis 10), 21 min (Monomer 11 bis 15) oder 24 min (ab Monomer 16) an die freien Aminogruppen gekoppelt wurden. Nach einem Waschschritt mit 80 µl DMF wurde die Kopplung ein zweites Mal wiederholt und das Harz anschließend nochmals mit DMF gewaschen (3 × 80 µl). Die nicht umgesetzten Aminogruppen wurden für 5 min mit einer Lösung aus 5% Essigsäureanhydrid und 6% 2,6-Lutidin in DMF acetyliert. Das Harz wurde erneut gründlich gewaschen (5 × 80 µl DMF) und der gesamte Zyklus anschließend solange wiederholt, bis alle PNAs in der 96er Platte vollständig synthetisiert waren. Nach Abschluss der Synthese wurden die terminalen Fmoc-Schutzgruppen der PNAs wie schon zuvor beschrieben abgespalten. Das Harz wurde nochmals gründlich mit DMF (5 × 80 µl) und Dichlorethan (3 × 200 µl) gewaschen.

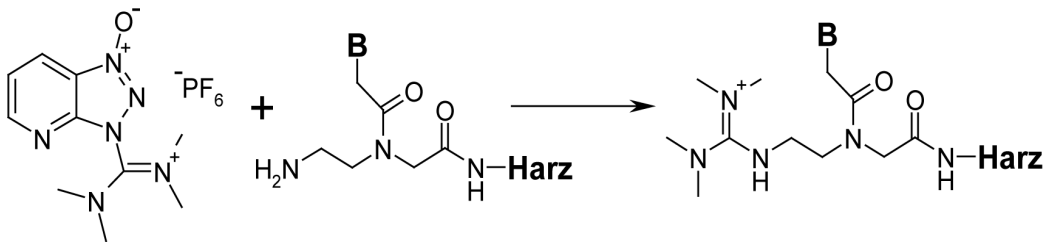

Abb. 14: Bildung des Guanidiniumadduktes, hier beispielhaft für das erste PNA-Monomer am Syntheseharz gezeigt, durch das Aktivierungsreagenz HATU. **B** = Basen (Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin).

Nachdem das Harz getrocknet war wurden die PNAs mit 80% TFA und 5% TIPS in Dichlorethan abgespalten (2 × 150 µl für je 30 min). Die vom Harz abgespaltenen PNAs wurden entweder mit zusätzlichen 200 µl Wasser in eine neue 96er Platte eluiert, lyophilisiert und in 100 µl Wasser wieder gelöst oder sie wurden mit weiteren 150 µl des Abspaltungsgemisches eluiert und zweimal mit eiskaltem Diethylether gefällt. Hierzu wurden 800 µl eiskalten Diethylethers zu jeder abgespaltenen PNA in ein Eppendorfgefäß gegeben, kurz abzentrifugiert und anschließend mit weiteren 800 µl eiskalten Diethylethers nochmals nachgewaschen. Nach dem erneuten Abzentrifugieren, wurde das Pellet getrocknet und in 100 µl Wasser wieder gelöst. Zur Kontrolle wurden die PNAs mittels

MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert.

2.2.2 Synthese von PNAs mit Modifikationen

Die verwendete Kopplungschemie erlaubte es zusätzlich zu den PNA-Monomeren auch Aminosäuren, Biotin oder andere Moleküle mit Carboxylgruppe kovalent an den N-Terminus der PNA-Moleküle zu binden, bzw. in die PNA-Moleküle mit einzubauen. Als Modifikationen wurden zumeist Cystein, Biotin, Lysin oder AEEA-OH-Linker verwendet. Um die Löslichkeit von PNA-Molekülen zu erhöhen, können z.B. ein bis zwei Lysine an den N- oder C-Terminus synthetisiert werden (Egholm et al., 1992).
Alle diese Moleküle wurden 0,3 M in NMP gelöst und wie die PNA-Monomere aktiviert und gekoppelt. Als Cystein-Monomer wurde Fmoc-Cys(Mmt)-OH (Fmoc-Schutzgruppe an der Aminogruppe und 4-Methyltrityl-Schutzgruppe (Mmt) an der Thiolgruppe) eingesetzt. Die Lysin-Monomere (Fmoc-Lys(Boc)-OH) waren mit Fmoc-Schutzgruppe am N-Terminus und tert-Butoxycarbonyl-Schutzgruppe an der zweiten Aminogruppe geschützt. Biotin wurde ohne Schutzgruppen verwendet und beim AEEA-OH-Linker wurde die Aminogruppe mit der Fmoc-Schutzgruppe geschützt. Der oben beschriebenen Abspaltung der Moleküle vom Syntheseharz ging bei den mit Cystein modifizierten PNAs das Abspalten der Mmt-Schutzgruppe mit 2% TFA und 5% TIPS in Dichlorethan voraus (2 × 150 µl für jeweils 30 min).

2.2.3 PNA-Synthese an 0,5 mg und in 384er Platten mit Membran

Neben den 96er Platten, in denen die Synthese zuerst optimiert wurde, wurden auch 384er Platten für die Synthese von PNAs getestet. Zuerst wurde die Synthese wie in den 96er Platten an 2 mg Harz durchgeführt. Hierzu wurden die zuvor verwendeten Syntheseparameter verwendet. Nur die Mengen an Lösungsmittel zum Waschen wurden auf jeweils 30 µl reduziert, da das Fassungsvermögen der einzelnen „wells“ für größere Volumina nicht ausreichte.
Eine weitere Reduzierung des eingesetzten Syntheseharzes auf 0,5 mg wurde zunächst in den 96er Platten getestet. Hierzu wurden 0,5 mg des „Rink resin LS“ oder „NovaSyn® TG Sieber resin“ in jedes „well“ gegeben. Für einen Kopplungschritt wurden 2 µl Monomer (0,15 M in NMP) mit 3 µl HATU (0,1 M in DMF) und 3 µl einer Lösung aus DIPEA und 2,6-Lutidin (0,1 M und 0,15 M in DMF) gemischt. Die restlichen Lösungsmittelmengen zum Waschen, Entschützen und Acetylieren wurden beibehalten, da bei der PNA-Synthese

HATU und vor allem die Monomere den größten Teil der Kosten verursachen. Auch alle übrigen Parameter wie Reaktionszeiten und Waschschritte wurden nicht verändert. Nach der Synthese wurden die PNAs mit 80% TFA und 5% TIPS in Dichlorethan abgespalten (2 × 150 µl für je 30 min). Die vom Harz abgespaltenen PNAs wurden mit weiteren 150 µl des Abspaltungsgemisches eluiert und zweimal mit eiskaltem Diethylether gefällt. Hierzu wurden 800 µl eiskalten Diethylethers zu jeder abgespaltenen PNA in ein Eppendorfgefäß gegeben, kurz abzentrifugiert und anschließend mit weiteren 800 µl eiskalten Diethylethers nochmals nachgewaschen. Nach dem erneuten Abzentrifugieren, wurde das Pellet getrocknet und in 100 µl Wasser aufgenommen.
In den 384er Platten wurde die Abspaltung wie gerade beschrieben, jedoch nur mit 40 µl des Abspaltungsgemisches durchgeführt. Die PNAs wurden anschließend mit 500 µl Diethylether gefällt, abzentrifugiert und nochmals mit 500 µl Diethylether gewaschen. Nach dem Verdampfen des Ethers wurde jede PNA in 100 µl Wasser gelöst. Alternativ hierzu wurden nach der Abspaltung mit einer Lösung aus 80% TFA und 5% TIPS in Dichlorethan (2 × 40 µl) 100 µl Wasser zugegeben und das komplette Volumen im Vakuumrotationsverdampfer lyophilisiert.

2.2.4 Peptidsynthese an unterschiedlichen Harzen

Zusätzlich zur Synthese von PNAs wurde gezeigt, dass es mit dem optimierten System ohne große Schwierigkeiten möglich war, Peptide für verschiedenste Anwendungen zu synthetisieren. Hierfür wurden einige Harze mit unterschiedlichen Methoden für das Abspalten von geschützten als auch ungeschützten Peptiden getestet. Will man die synthetisierten Peptide während der Anbindung an Oberflächen parallel aufreinigen, so ist es wichtig, dass die Seitengruppen der Peptide geschützt bleiben. Nur so kann gewährleistet werden, dass die Peptide über die N-terminale Gruppe und nicht über eine entsprechende Seitengruppe der Aminosäuren anbinden.
Anstelle von HATU wurde für die Synthese von Peptiden das günstigere HBTU verwendet. Zusätzlich wurden die Moläquivalente der Aktivierungsreagenzien und Monomere erhöht, da so höhere Kopplungsausbeuten zu erwarten waren. Die Kosten der Aminosäure-Monomere fallen im Gegensatz zu den PNA-Monomere bei den Gesamtkosten der Synthese weniger stark ins Gewicht. Die einzelnen Aminosäure-Monomere wurden 0,5 M in NMP gelöst und bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Für einen Zyklus der Synthese wurden insgesamt 11 µl eines Gemisches aus Aminosäure-Monomer, HBTU, DIPEA und 2,6-Lutidin zu 2 mg des entsprechenden Harzes gegeben. Dabei wurden in

Bezug auf den Beladungsgrad des verwendeten Harzes fünf Moläquivalente der Monomere mit jeweils fünf Moläquivalenten HBTU und DIPEA und 7,5 Moläquivalenten 2,6-Lutidin gemischt. Für ein Harz mit einem Beladungsgrad von 0,2 mmol/g bedeutete dieses folgende Lösungsmengen und Konzentrationen:

4 µl Monomer (0,5 M in NMP)
4 µl HBTU (0,5 M in DMF)
3 µl DIPEA / 2,6-Lutidin (0,667 M / 1,0 M in DMF)

Alle weiteren Lösungen, Konzentrationen, Mengen und Zeiten wurden aus der zuvor optimierten PNA-Synthese übernommen (2.2.1). Die Abspaltung der synthetisierten Peptide vom Syntheseharz erfolgte entsprechend der Linker am jeweiligen Harz auf unterschiedliche Weise.

2.2.4.1 Abspaltung vom „Rink resin LS“

Für die Abspaltung der synthetisierten Peptide am Harz mit Rink-Linker wurden 2 × 120 µl einer Abspaltungslösung (95% TFA und 5% TIPS) für jeweils 30 min zum Harz gegeben. Anschließend wurde nochmals mit 120 µl der gleichen Lösung nachgewaschen und das Peptid mit 800 µl eiskaltem Diethylether gefällt. Nach dem Abzentrifugieren der gefällten Peptide wurde ein weiteres Mal mit 800 µl eiskaltem Diethylether gewaschen und abzentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet und das Peptid in 150 µl Wasser wieder gelöst.
Die so abgespaltenen Peptide hatten keine Seitenschutzgruppen mehr, so dass sie vollständig entschützt vorlagen. Zur Kontrolle wurden die Peptide mittels MALDI-TOF-MS analysiert.

2.2.4.2 Abspaltung vom „NovaSyn® TG Sieber resin“

Der Sieber-Linker des „NovaSyn® TG Sieber resin“ bot die Möglichkeit, sowohl vollständig entschützte Peptide als auch geschützte Peptide mit Seitenschutzgruppen vom Harz abzuspalten. Hierzu wurde die Abspaltung entweder wie beim „Rink resin LS“ durchgeführt, um die entschützten Peptide zu erhalten, oder es wurde mit geringer Säurekonzentration abgespalten, so dass die Seitenschutzgruppen an den Peptiden verblieben. Für letzteres wurde eine Lösung aus 0,5 % TFA und 5% TIPS in Dichlormethan zum Harz gegeben und der Durchlauf in einer neuen 96er Platte aufgefangen (6 × 80 µl, jedes Durchfließen dauerte ca. 5 min). Da Dichlormethan sehr flüchtig ist, erhöhte sich die TFA-Konzentration während dieser Abspaltung leicht. Nach dem letzten Durchlauf wurde mit

200 µl Methanol nachgespült und weitere 500 µl Methanol zugegeben, wodurch die TFA-Konzentration deutlich gesenkt wurden. Dieses sollte verhindern, dass die Seitenschutzgruppen durch ein weiteres Verdampfen des Dichlormethans und einer damit verbundenen Erhöhung der TFA-Konzentration abgespalten werden. Das komplette Volumen wurde unter Vakuum auf ca. 200 - 100 µl eingeengt und das geschützte Peptid dann mit 700 µl eiskaltem Wasser gefällt. Nach dem Zentrifugieren (Zentrifuge „Biofuge pico“, 2 min bei 13000 rpm) wurde das Wasser mit einer Pipette abgenommen und das Produkt im Vakuum vollständig getrocknet. Die geschützten Peptide ließen sich in DMSO oder DMF gut lösen.

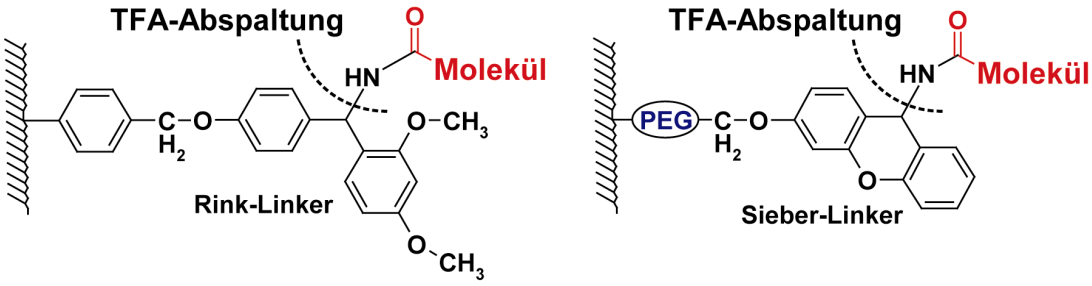

Abb. 15: Rink- und Sieber-Linker. Links ist das „Rink resin LS“ und rechts das „NovaSyn® TG Sieber resin“ dargestellt. Beide Linker sind säurelabil. Vom Rink-Linker wird mit TFA-Konzentrationen größer als 25% abgespalten, während vom Sieber-Linker schon mit TFA-Konzentrationen um die 1% abgespalten werden kann. PEG = Polyethylenglycol.

2.2.5 Bestimmung der Kopplungsraten

Die Kopplungsraten wurden nur exemplarisch bei der optimierten Synthese an 2 mg Rink-Harz mit einer Beladung von 0,2mmol/g bestimmt. Hierzu wurden die Lösungen beim Abspalten der Fmoc-Gruppe aufgefangen und auf 1000 µl mit 20% Piperidin in DMF verdünnt (2 - 6 ml Gesamtvolumen), so dass die Messung im linearen Bereich des Photometers möglich war. Die Absorption des Dibenzofulven-Piperidin-Adduktes wurde bei 301 nm gemessen und die Konzentration anschließend nach Lambert-Beer bestimmt:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad \Leftrightarrow \quad c = \frac{E}{\varepsilon \cdot d} \quad \Rightarrow \quad c = \frac{E_{301}}{\varepsilon_{301} \cdot d} = \frac{E_{301\,nm} \cdot \mu mol \cdot cm}{7800\,ml \cdot 1\,cm}$$

c = Konzentration der gemessenen Substanz

E_{301} = Extinktion bei der Wellenlänge von 301nm

ε_{301} = Extinktionskoeffizient bei 301nm = $7800\,ml \cdot \mu mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ für das Dibenzofulven-Piperidin-Addukt.

d = Schichtdicke der verwendeten Küvette

Die Molmenge an gekoppelten Monomeren ergibt sich damit aus: $\frac{E_{301\,nm} \cdot \mu mol \cdot cm}{7800\,ml \cdot 1\,cm} \cdot V$

V = Volumen der gesamten Lösung des Dibenzofulven-Piperidin-Adduktes.

Damit berechnet sich die Effizienz eines Kopplungsschrittes wie folgt:

$$Kopplungsrate = \frac{\left(\frac{E_{301\,nm} \cdot \mu mol}{7800\,ml} \cdot V\right)_n}{\left(\frac{E_{301\,nm} \cdot \mu mol}{7800\,ml} \cdot V\right)_{n+1}}$$

n = Die Messung nach dem Abspalten der Fmoc-Gruppe n.

n+1 = Die Messung nach dem Abspalten der Fmoc-Gruppe n+1.

2.2.6 Analyse mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Von den Ausgangslösungen der in Wasser gelösten PNAs, wurde jeweils 1 µl in 19 µl Wasser verdünnt. 0,5 µl dieser Verdünnung wurden zusammen mit 0,5 µl Matrix (0,7 M 3-Hydroxypicolinsäure (3-HPA) und 70 mM Ammoniumcitrat in Wasser:Acetonitril (1:1)) auf den Probenträger (Target) gegeben. Nachdem alle so präparierten Proben auf dem Träger bei Raumtemperatur getrocknet waren, wurden diese in einem Reflex II MALDI-TOF-Massenspektrometer analysiert. Die Messungen wurden im positiven Ionenmodus mit „delayed extraction“ durchgeführt (nach der Desorption der Moleküle durch den Laser, wird die erste Beschleunigungsspannung mit ca. 200 ns Verzögerung eingeschaltet). Die erste Beschleunigungspannung betrug 15,1 kV, die zweite 20 kV und die Spannung des Reflektors 21,5 kV. Der Stickstoff-Laser des Gerätes hat eine Wellenlänge von 337 nm.
Die Messung der Peptide wurde wie bei den PNAs zuvor durchgeführt. Anstelle der 3-HPA-Matrix wurde hier allerdings 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) (100 mg DHB in 2,5 ml 0,1% TFA und 2,5 ml 30% Acetonitril) als Matrix verwendet.

2.2.7 Konzentrationsbestimmung von PNAs

Die Konzentrationen der PNA-Lösungen wurden photometrisch bestimmt. Hierzu wurde die Extinktion einer zumeist 1:400 verdünnten PNA-Ausgangslösung in einer Küvette (100 µl) bei 260 nm ermittelt. Die Berechnung der Konzentration wurde nach dem Lambert-Beerschen Gesetz durchgeführt:

Lambert-Beer'sches Gesetz: $E = \varepsilon \cdot c \cdot d$

E = Extinktion bei einer bestimmten Wellenlänge

ε = Extinktionskoeffizient der gemessenen Substanz bei der gleichen Wellenlänge

c = Konzentration der gemessenen Substanz

d = Schichtdicke der verwendeten Küvette

Molare Extinktionskoeffizienten der PNA-Monomere bei 260nm:

PNA A-Monomer: $13{,}7\, ml \cdot \mu mol^{-1} \cdot cm^{-1}$

PNA C-Monomer: $6{,}6\, ml \cdot \mu mol^{-1} \cdot cm^{-1}$

PNA G-Monomer: $8{,}6\, ml \cdot \mu mol^{-1} \cdot cm^{-1}$

PNA T-Monomer: $11{,}7\, ml \cdot \mu mol^{-1} \cdot cm^{-1}$

Der Extinktionskoeffizient für ein definiertes PNA-Molekül berechnet sich damit wie folgt:

$$\varepsilon_{ges} = (A_{Anzahl} \cdot 13{,}7 + C_{Anzahl} \cdot 6{,}6 + G_{Anzahl} \cdot 8{,}6 + T_{Anzahl} \cdot 11{,}7)\, ml \cdot \mu mol^{-1} \cdot cm^{-1}$$

Die Konzentration der Ausgangslösung für eine analysierte 1:400 Verdünnung ist somit:

$$c = \frac{E_{260} \cdot V}{\varepsilon_{ges} \cdot d} = \frac{E_{260} \cdot 400}{\varepsilon_{ges} \cdot 1\, cm} \text{ in } [\frac{mol}{l}]$$

E_{260} = gemessener Extinktionswert bei 260 nm

V = Verdünnungsfaktor = 400

d = Schichtdicke der verwendeten Küvette = 1 cm

Hierbei muss beachtet werden, dass sich einzelsträngige PNA-Moleküle bei Raumtemperatur teilweise aneinanderlagern, wodurch Hypochromizität auftritt. Diese verringert den Extinktionswert um ca. 20%, woduch die eigentlichen Konzentrationen um den Faktor 1,2 höher sind als die berechneten Werte.

2.2.8 Berechnung der Schmelztemperatur (T_m) von PNA

Die theoretische Schmelztemperatur ($T_{m_{pred}}$) eines PNA-DNA-Duplex wurde nach Giesen et al. (1998) mit folgender Formel berechnet:

$$T_{m_{pred}} = c_0 + c_1 \cdot T_{m_{nnDNA}} + c_2 \cdot f_{pyr} + c_3 \cdot Länge$$

Mit den Faktoren: $c_0 = 20{,}79$; $c_1 = 0{,}83$; $c_2 = -26{,}13$; $c_3 = 0{,}44$

Pyrimidin-Anteil: $f_{pyr} = \frac{Anzahl_{Pyrimidine}}{Länge} = \frac{Anzahl_C + Anzahl_T}{Länge}$

$T_{m_{nnDNA}} = T_m$ des entsprechenden Oligonukleotids („nearest neighbour method“)

$Länge$ = Basenanzahl der PNA

2.3 Derivatisierung der Oberflächen

Als Oberflächen für die PNA-Microarrays wurden modifizierte Glas-, Silizium- und mit Gold bedampfte Siliziumoberflächen verwendet. Alle Oberflächen mit Ausnahme der Gold-Oberflächen wurden silanisiert. Die Silanisierungen, sowie das Umsetzen der

Oberflächen mit dem säurelabilen Rink-Linker und die Beschichtung mit Streptavidin wurden in unserer Arbeitsgruppe entwickelt und durchgeführt (Brandt et al., 2003). Vor dem Auftragen der PNA-Moleküle wurden die silanisierten Oberflächen entweder mit Di-(N,N'-succinimidyl)-carbonat, 6-Maleinimidohexansäure-N-succinimidylester oder mit Streptavidin derivatisiert. Die Di-(N,N'-succinimidyl)-carbonat Oberflächen wurden für das kovalente Anbinden von PNAs mit terminaler Aminogruppe, die 6-Maleinimidohexansäure-N-succinimidylester- und Gold-Oberflächen für das Anbinden von PNAs mit Thiolgruppe und die Streptavidin-Oberflächen für das Anbinden von biotinylierten PNAs verwendet.

2.3.1 Silanisierung von Glas- oder Siliziumoberflächen

Die unbehandelten Silizium- und Glasoberflächen wurden mit Dimethylsulfoxid (DMSO), Ethanol und Wasser gründlich gewaschen. Anschließend wurden sie für eine Stunde bei Raumtemperatur in 10% NaOH (w/w), gefolgt von weiteren 15 min im Ultraschallbad, angeätzt. Nach erneutem Waschen mit Wasser und Ethanol wurden die Oberflächen für eine Stunde in die Silanisierungslösung gegeben (1 ml 3-Aminopropyl-triethoxysilan (APTES) oder 1ml 3-[Bis-(2-hydroxyethyl)-amino]-propyl-triethoxysilan (BSIL) in 20 ml 95%igem Ethanol) und in der gleichen Lösung noch zusätzliche 15 min ins Ultraschallbad gestellt. Nach zwei Waschschritten in Ethanol und einem in Wasser wurden die Oberflächen mit Stickstoff getrocknet und für 20 min bei 110°C gebacken. Die fertig silanisierten Silizium-Wafer und Glasobjektträger wurden bei 4°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

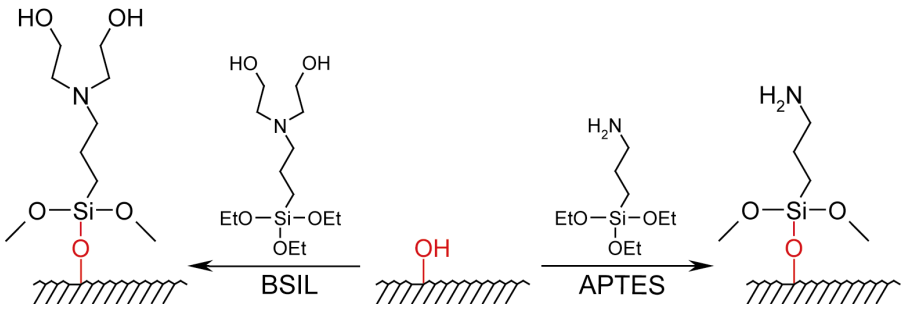

Abb. 16: Silanisierung von Silizium- oder Glasoberflächen mit 3-Aminopropyl-triethoxysilan (APTES) bzw. 3-[Bis-(2-hydroxyethyl)-amino]-propyl-triethoxysilan (BSIL).

Sowohl die APTES- als auch die BSIL-Oberflächen konnten für die weiteren Aktivierungen und Modifikationen benutzt werden. In den Abbildungen der folgenden Aktivierungen und Derivatisierungen sind jeweils nur die APTES-Oberflächen dargestellt.

2.3.2 Aktivierung von Oberflächen

Die silanisierten Oberflächen wurden direkt vor dem Auftragen entsprechend dem N-Terminus der PNA-Moleküle aktiviert (DSC für PNAs mit terminaler Aminogruppe, EMCS für PNAs mit Thiolgruppe und Streptavidin für PNAs mit Biotin am N-Terminus).

2.3.2.1 Aktivierung mit Di-(N,N'-succinimidyl)-carbonat (DSC)

Die silanisierten Oberflächen wurden für zwei Stunden in einer Lösung aus 220 mg Di-(N,N'-succinimidyl)-carbonat und 0,5 ml N,N-Diisopropylethylamin (DIPEA) in 14,5 ml getrocknetem Aceton aktiviert. Dabei liegt das DSC im Überschuss vor und löst sich nicht komplett. Nach der zweistündigen Aktivierung wurden die Oberflächen zweimal mit wasserfreiem Aceton und zweimal mit Dichlorethan gewaschen. Die Oberflächen wurden getrocknet und anschließend direkt für das Auftragen der PNA-Moleküle verwendet.

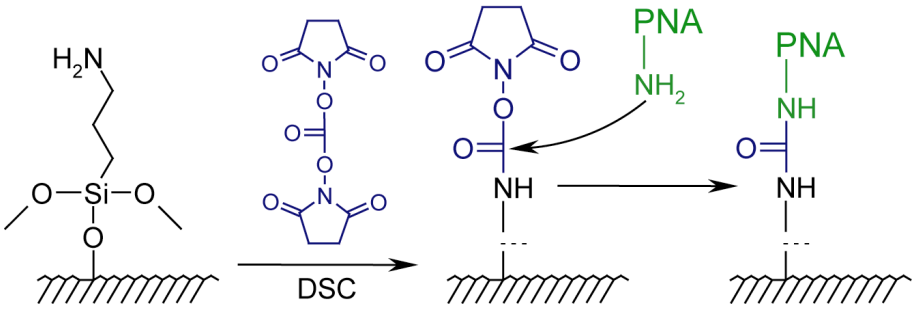

Abb. 17: Aktivierung der silanisierten Oberflächen mit Di-(N,N'-succinimidyl)-carbonat (DSC, blau), über das PNAs mit Aminogruppe (grün) binden können.

2.3.2.2 Aktivierung mit 6-Maleinimidohexansäure-N-succinimidylester

Eine 200 mM Stammlösung des 6-Maleinimidohexansäure-N-succinimidylester (81 mg EMCS in 1,314 ml DMF) wurde bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Auf jeweils 2 × 2 cm einer silanisierten Oberfläche wurden 40 µl Aktivierungslösung (20 mM EMCS in einer 10%igen DIPEA-Lösung in wasserfreiem DMF) gegeben und das Ganze mit einem Objektgläschen bedeckt. Nach der Aktivierung für drei Stunden wurde das Objektgläschen entfernt und die Oberfläche zweimal mit DMF und zweimal mit Ethanol gewaschen. Die getrockneten Oberflächen wurden direkt für das Auftragen der PNA-Moleküle verwendet.

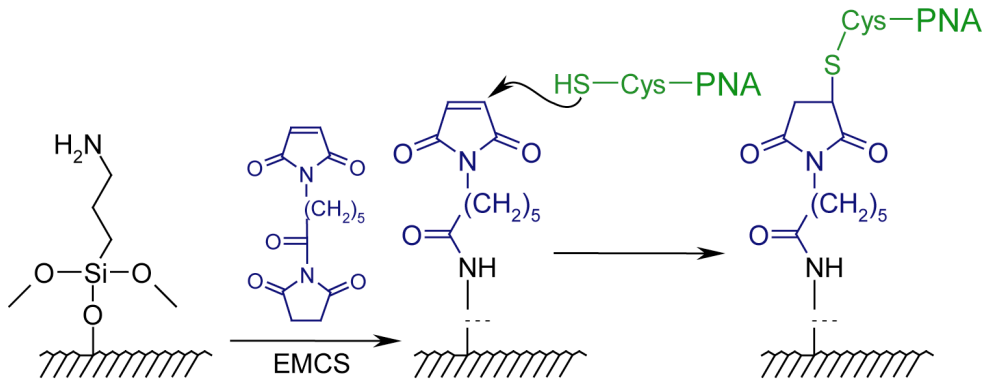

Abb. 18: Aktivierung der silanisierten Oberflächen mit 6-Maleinimidohexansäure-N-succinimidylester (EMCS, blau), über das PNAs mit Thiolgruppe (grün) binden können.

2.3.2.3 Streptavidin-Beschichtung

Die mit DSC aktivierten Oberflächen wurden über Nacht in einer Feuchtekammer mit 60 µl Streptavidin-Lösung (1 mg/ml Streptavidin in 3× PBS) inkubiert. Hierzu wurde eine Stammlösung (5 mg Streptavidin in 250 µl Wasser) 1:1 mit 6× PBS gemischt und diese nochmals 1:10 mit 3× PBS verdünnt. Nach dem Beschichten mit Streptavidin wurden die Oberflächen in 1× BW-Puffer gewaschen und in diesem bis zu einer Woche bei 4°C gelagert. Vor dem Auftragen der biotinylierten PNAs wurden die so beschichteten Glas- bzw. Silizium-Träger kurz mit Wasser gespült und mit Stickstoff getrocknet.

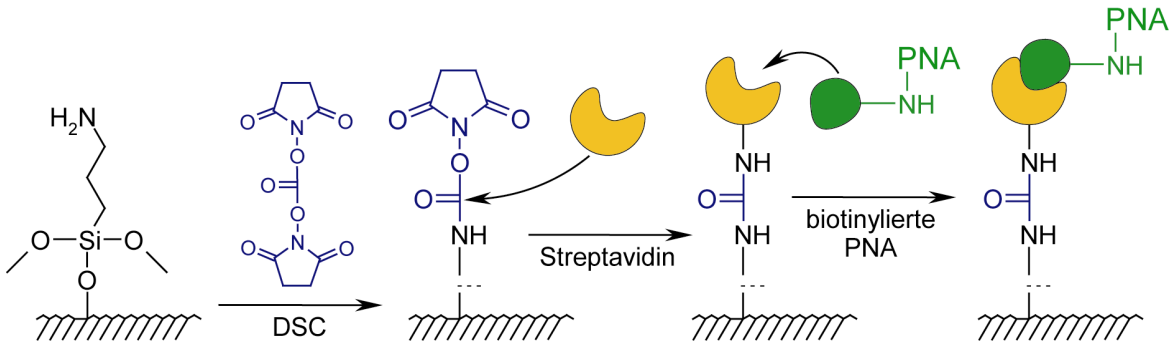

Abb. 19: Aktivierung der silanisierten Oberflächen mit DSC (blau) und anschließende Beschichtung mit Streptavidin (gelb). Die so modifizierten Oberflächen können biotinylierte PNAs (grün) binden.

2.3.2.4 Modifikation der Oberflächen mit Fmoc-Rink-Linker

Auf die silanisierten Silizium-Wafer wurden Fmoc-Rink-Linker für vier Stunden wie folgt gekoppelt. Ein Gemisch (1:1:1) aus 0,4 M DIC, 0,3 M HOAt und 0,3 M Fmoc-Rink-Linker in NMP wurde für 3 min voraktiviert. Anschließend wurden 20 µl bzw. 60 µl dieses Gemisches auf einen 5 × 5 mm bzw. 2 × 2 cm silanisierten Silizium-Wafer gegeben und für vier Stunden bei Raumtemperatur gekoppelt. Nach zwei Waschschritten mit DMF wurden die noch freien Aminogruppen auf der Oberfläche acetyliert. Hierzu wurden die Ober-

flächen zweimal (3 min und 5 min) in einer Lösung, bestehend aus 240 µl Essigsäureanhydrid und 240 µl Pyridin in 20 ml DMF, inkubiert. Nach einem Waschschritt mit DMF wurden die Fmoc-Gruppen von den gekoppelten Fmoc-Rink-Linkern durch zwei Inkubationen (3 min und 5 min) in 20% Piperidin in DMF abgespalten. Um auf die mit Rink-Linker modifizierten Oberflächen noch einen AEEA-OH-Linker zu koppeln, wurde der gerade beschriebene Syntheseschritt nochmals wiederholt. Anstelle des Fmoc-Rink-Linkers wurde nun der Fmoc-AEEA-OH-Linker 0,3 M in NMP eingesetzt. Die Silizium-Wafer wurden zum Schluss gründlich mit DMF und Ethanol gewaschen, mit Stickstoff getrocknet und bei 4°C aufbewahrt oder direkt für die Aktivierung mit DSC oder EMCS verwendet.

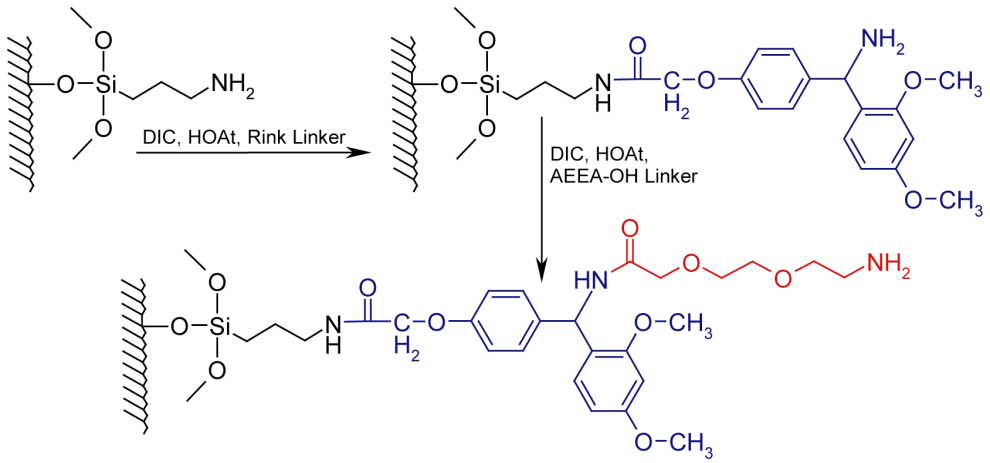

Abb. 20: Kopplung des Rink-Linkers (blau) und des AEEA-OH-Linkers (rot) an eine silanisierte Oberfläche.

2.3.2.5 *Jeffamine ED-600® Oberflächen*

Für die Hybridisierung von längeren DNA-Molekülen an kurze komplementäre PNA- oder DNA-Probenmoleküle auf Oberflächen kann es von Vorteil sein, wenn diese nicht direkt auf der Oberfläche gebunden sind sondern einen größeren Abstand von dieser haben. Der vergrößerte Abstand in Kombination mit den hydrophilen PEG-Linker minimiert evtl. sterische Hinderungen bei der Hybridisierung von DNAs an komplementäre PNA-Moleküle. Durch die Derivatisierung von Oberflächen mit dem Bisamin Jeffamine ED-600® wird eine mit Aminogruppen funktionalisierte Oberfläche hergestellt. Der Abstand der Aminogruppen von der Oberfläche ist hierbei größer als bei den Oberflächen, die einfach mit 3-Aminopropyl-triethoxysilan bzw. 3-[Bis-(2-hydroxyethyl)-amino]-propyltriethoxysilan silanisiert sind.

Die unmodifizierten oder mit APTES bzw. BSIL silanisierten Silizium- oder Glasoberflächen wurden für zwei Stunden bei Raumtemperatur in einer Aktivierungslösung (1 g CDI in 100 ml DMF) geschwenkt. Anschließend wurden die Oberflächen gründlich mit

DMF gewaschen (3 × 5 min) und in einer Jeffamine ED-600® Lösung (10 ml Jeffamine ED-600® in 190 ml DMF) über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Silizium-Wafer oder Glasobjektträger in DMF, Wasser und Ethanol gewaschen (jeweils 2 × 5 min). Nach dem Trocknen mit Stickstoff wurden die Wafer bzw. Objektträger bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

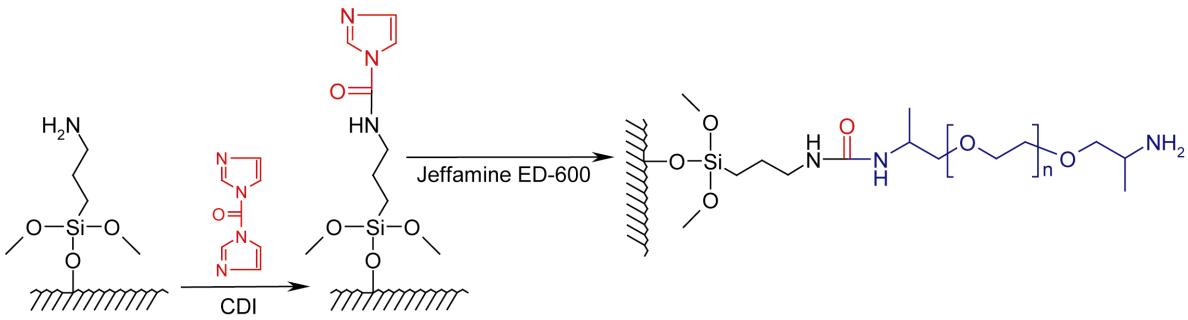

Abb. 21: Kopplung von Jeffamine ED-600® (blau) nach der Aktivierung von unbehandelten Silizium- oder Glasoberflächen mit CDI (1,1'-Carbonyldiimidazol, rot). n = 11-13 PEG (Polyethylenglykol-Einheiten).

2.4 Auftragen der PNA-Moleküle (Spotting)

Zum Aufbringen der PNAs auf die aktivierten Oberflächen (Silizium und Glas) wurde der SDDC-2 Micro-Arrayer (ESI) verwendet (Abb. 22). Die PNAs wurden hierzu in der jeweils verwendeten Spotting-Lösung verdünnt und in 384-well Mikrotiterplatten verteilt. Aus diesen Platten wurden die PNAs mit speziellen eingeschlitzten Nadeln, so genannten Pins (SMP3 oder SMP10B, Telechem), auf den Oberflächen abgegeben. Die SMP3 Pins geben ca. 0,7 nl und die SMP10B Pins ca. 5,2 nl als kleine Tropfen mit einem Durchmesser von ca. 100 µm (SMP3) bzw. 360 µm (SMP10B) auf der Oberfläche ab. Das „B“ hinter der Bezeichnung der Pins steht für ein größeres Reservoir, welches durch eine zusätzliche Ausbuchtung in den Pins gebildet wird (Abb. 22). Der Abstand der abgegebenen Tröpfchen von Mittelpunkt zu Mittelpunkt wurde auf 170 µm für die SMP3 Pins und auf 600 µm für die SMP10B Pins eingestellt. Die Luftfeuchtigkeit im Spotter wurde bei ca. 50% und die Temperatur bei 23 - 26°C konstant gehalten.

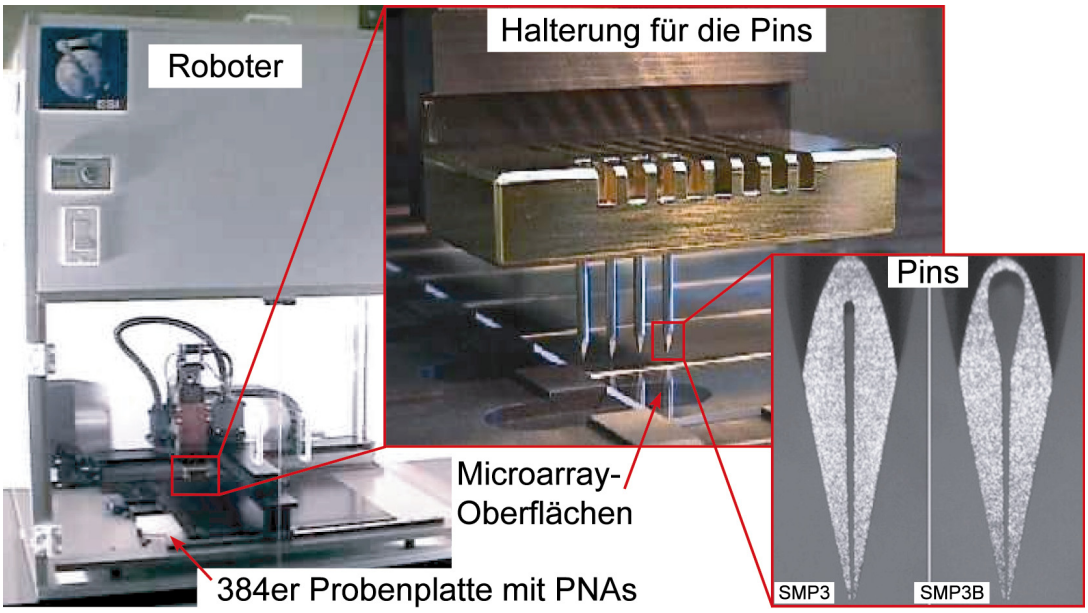

Abb. 22: SDDC-2 Roboter mit Halterung für die Pins zum Auftragen der PNA-Moleküle auf die aktivierten Oberflächen. Rechts sind zwei unterschiedliche Pin-Spitzen dargestellt.

Für das Spotten der PNAs auf EMCS-aktivierte oder Gold-Oberflächen wurden die PNAs in Betain-Lösung (1 M Betain in Wasser, pH = 7,0) verdünnt und auf die Oberflächen aufgebracht. Die gleiche Betain-Lösung mit einem pH-Wert von 7 - 8 wurde für die DSC-aktivierten Oberflächen verwendet. Nach dem Spotten wurden die unterschiedlichen Oberflächen über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die DSC-aktivierten Oberflächen wurden anschließend in einer Lösung, bestehend aus 50 mM Bernsteinsäureanhydrid und 150 mM 1-Methylimidazol in Dichlorethan, für zwei Stunden deaktiviert. Anschließend wurden sie zweimal mit Dichlorethan gewaschen. Die EMCS-aktivierten- und Gold-Oberflächen wurden 30 min in einer Lösung aus 1 mM 3-Mercaptopropionsäure in Ethanol abgesättigt und anschließend zweimal mit Ethanol, zweimal mit DMF und nochmals mit Ethanol gewaschen. Vor dem Hybridisieren wurden die Oberflächen folgender Waschreihe unterzogen: Zweimal in einer Lösung aus 5 mM Natriumphosphat und 0,1% SDS bei 90°C, 10 min in Wasser (90°C) und einem abschließendem Spülen mit 1 M NaCl in 0,1% wässriger TFA, gefolgt von Wasser. Nach dem Trocknen mit Stickstoff wurden die Silizium- bzw. Glasträger für Hybridisierungen verwendet.

Für das Auftragen auf die mit Streptavidin beschichteten Oberflächen wurden die biotinylierten PNAs in 1× BW-Puffer verdünnt. Nach dem Spotten der PNAs wurden die Streptavidin-Oberflächen direkt für 45 min in einer Feuchtekammer inkubiert und anschließend mit 1 mM Biotin in 1× BW-Puffer für 20 min abgesättigt. Nach gründlichem Waschen mit 1× BW-Puffer (3 × Schütteln und 1 × für 15 min im Ultraschallbad) wurden

die Streptavidin-Oberflächen bis zur Verwendung in 1× BW-Puffer gelagert. Direkt vor der Hybridisierung wurden sie nochmals kurz mit Wasser und Hybridisierungspuffer (0,1× SSarc) gewaschen.

2.5 Abspalten der PNAs von modifizierten Oberflächen

Zum Überprüfen der Bindungsselektivität von PNA-Molekülen mit unterschiedlichen N-Termini wurden Oberflächen vor dem Auftragen der PNAs mit einem zusätzlichen säurelabilen Rink-Linker modifiziert (siehe 2.3.2.4). Nach dem Anbinden konnten so die PNAs vom Rink-Linker unter sauren Bedingungen wieder abgespalten und mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert werden. Von den Streptavidin-Oberflächen wurden die gebundenen biotinylierten PNAs mit 25% wässrigem NH_3 (Suprapur) wieder getrennt.

Die mit Rink-Linker modifizierten und anschließend mit DSC oder EMCS aktivierten Silizium-Oberflächen, sowie die mit Streptavidin beschichteten Silizium-Oberflächen (jeweils 5 × 5 mm) wurden mit 15 µl der entsprechenden PNA-Lösung (50 µM) bedeckt. Die Oberflächen wurden wie unter 2.4 beschrieben inkubiert, deaktiviert und gewaschen. Zum Abspalten der PNAs wurden die Oberflächen mit Rink-Linker in 1,5 ml Eppendorfgefäßen für 40 min in 95% TFA mit 5% TIPS inkubiert. Die mit Streptavidin beschichteten Oberflächen wurden in 1,5 ml Eppendorfgefäßen für 20 min bei 70°C in Suprapur-Lösung (25% NH_3 in Wasser) inkubiert. Die so abgespaltenen Moleküle wurden in den Eppendorfgefäßen nach dem Entfernen der Silizium-Oberflächen im Vakuum-Konzentrator lyophilisiert, in 8 µl 0,1% TFA in Wasser wieder gelöst und mit ZipTip-Pipettenspitzen aufkonzentriert. Hierzu wurde die ZipTip-Spitze 3 × mit Acetonitril und 6 × mit 0,1% TFA gespült, anschließend die Probe aufgezogen (2 - 3 ×) und das ganze 4 × mit jeweils 10 µl 0,1% TFA gewaschen. Zum Eluieren auf das MALDI-Target wurden 2 µl Matrix (3-HPA) aufgezogen und die Probe direkt auf das Target pipettiert. Neben den abgespaltenen PNAs wurden auch die normal synthetisierten PNAs auf diese Weise aufkonzentriert, um sicher zu gehen, dass keine Aufreinigung in der ZipTip-Pipettenspitze stattfand. Die Analyse im MALDI-TOF-Massenspektrometer wurde wie unter 2.2.6 beschrieben durchgeführt.

Alternativ wurden die PNAs direkt auf den EMCS- und DSC-aktivierten Rink-Linker Oberflächen abgespalten. Hierzu wurde über 40 min mehrfach eine Lösung aus 95% TFA und 5% TIPS auf 5 × 5 mm Silizium-Oberflächen gegeben (1 × 20 µl und anschließend alle 10 min 5 - 10 µl). Die TFA-Lösung zog sich während des Verdampfens auf der Oberfläche

in einem Punkt zusammen, so dass hier die von der Oberfläche abgespaltenen PNAs, welche sich gut in TFA lösen, aufkonzentriert wurden. Auf diese Stelle wurde nach dem kompletten Eintrocknen der zuletzt aufgetragenen TFA-Lösung 3-HPA-Matrix gegeben, die 5 × 5 mm Silizium-Oberfläche mit doppelseitigem leitenden Klebeband auf einem MALDI-Target befestigt und direkt im MALDI-TOF-Massenspektrometer analysiert.

2.6 Hybridisierung der PNA-Microarrays

Für die Hybridisierungen der PNA-Microarrays wurden Cy5-, Cy3- und unmarkierte DNA-Oligonukleotide oder PCR-Produkte verwendet. Die unmarkierten DNA-Oligonukleotide wurden für die Analyse mit TOF-SIMS und die fluoreszenzmarkierten DNA-Oligonukleotide für die Analyse mit einem Fluoreszenz-Scanner verwendet.

Hierzu wurden die DNA-Oligonukleotide bis zu einer Endkonzentration von 0,2 µM pro Oligonukleotid in 0,1× SSarc-Puffer verdünnt. Von dieser Lösung wurden 20 µl auf eine Fläche von 2 × 2 cm auf die PNA-Microarrays gegeben und mit einem Deckgläschen bedeckt. Anschließend wurden die mit Deckgläschen versehenen Silizium- und Glasoberflächen in Hybridisierungskammern verschlossen. Die Hybridisierungen für die Detektion von Einzelbasenfehlpaarungen wurden im Wasserbad in Temperaturbereichen leicht unterhalb der berechneten Schmelztemperaturen der PNAs auf dem Microarray durchgeführt. Alle anderen PNA-Microarrays wurden bei Raumtemperatur hybridisiert. Nach zwei bis vier Stunden wurden die Oberflächen aus den Hybridisierungskammern entnommen und mit 0,1× SSarc-Puffer, der auf die zuvor verwendete Hybridisierungstemperatur vorgewärmt wurde, zweimal gewaschen. Nach sehr kurzem Spülen mit Wasser wurden die Microarrays mit Stickstoff getrocknet und mittels Fluoreszenz-Scanner oder TOF-SIMS analysiert.

2.7 „Strippen“ der hybridisierten PNA-Microarrays

Die hybridisierten DNA-Oligonukleotide konnten von den PNA-Microarrays durch intensives Waschen in kochendem Puffer und Wasser wieder entfernt werden, so dass die Microarrays für erneute Hybridisierungen zur Verfügung standen. Hierzu wurden die Microarrays nach einer Hybridisierung und anschließender Fluoreszenz-Analyse abwechselnd in kochendem 0,1× SSarc-Puffer und kochendem Wasser jeweils 3 × für 10 min geschwenkt. Zur Kontrolle wurden die Microarrays erneut mittels Fluoreszenzscanner bei maximaler Laser- und Photomultiplier-Intensität analysiert.

2.8 Analyse der Microarrays

Die hybridisierten PNA-Microarrays wurden entweder mit einem Fluoreszenzscanner, ein konfokales Lasermikroskop mit einem x-y-z-Rastertisch für die Microarrays, oder mittels TOF-SIMS analysiert. Dabei konnten im Fluoreszenzscanner nur PNA-Microarrays, die zuvor mit Cy5- oder Cy3-markierten DNAs hybridisiert wurden, analysiert werden. Im TOF-SIMS konnten sowohl markierte als auch unmarkierte DNAs anhand der Phosphat-spezifischen Signale detektiert werden.

2.8.1 Fluoreszenz-Analyse

Die fluoreszenzmarkierten DNAs wurden entweder mit einem ScanArray 3000 oder ScanArray 5000 detektiert. Dabei wurde zunächst das Cy5-Signal bei einer Anregungswellenlänge von 633 nm und einem maximalen Emissionssignal von 670 nm detektiert. Anschließend wurde das Cy3-Signal bei 543 nm angeregt und bei einem Emissionsmaximum von 570 nm auf der Microarray-Fläche analysiert. Die Laserintensität und die Signalverstärkung des Photomultipliers wurden zuvor auf den jeweiligen Microarray angepasst. Die Bilder wurden jeweils mit einer Auflösung von 10 × 10 µm pro Pixel aufgenommen und anschließend im 16 bit Graustufen TIFF-Format gespeichert, so dass die Skala der Signalintensitäten von 0 bis 65536 (2^{16}) reichte.

2.8.2 TOF-SIMS-Analyse

Die TOF-SIMS-Analysen wurden im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Ahrlinghaus an der Universität Münster durchgeführt. Hierzu wurden die hybridisierten PNA-Microarrays mit einem modifizierten TOF-SIMS Typ IV der Firma ION-TOF analysiert. Als Primärionen wurden Ar^+- und Xe^{2+}-Ionen aus einer Gasionenquelle aber auch Au_3^+-Ionen aus einer Flüssigmetall-Ionenquelle verwendet. Die Oberflächen wurden entsprechend der benötigten Auflösung jeweils mit 65536 Pixeln auf einer Fläche von entweder 18,5 × 18,5 cm^2 oder 10 × 10 cm^2 automatisch abgerastert. Der PNA-Microarray wurde dabei auf einem in x-y-Richtung verstellbaren Probentisch in Zickzack-Linien unter dem Flugrohr bewegt. Der gepluste Primärionenstrahl wurde mit einer Wiederholungsrate von 5 kHz und einer Energie von 10 keV auf die Oberfläche geschossen. Die absolute Dichte der Primärionen betrug dabei ca. 10^{12} cm^{-2}. Die Messungen erfolgten alle im Negativionen-Modus – es wurden nur die negativ geladenen Ionen in das Flugrohr beschleunigt und detektiert.

2.8.3 Auswertung der Signalintensitäten mit GenePix

Die Quantifizierung der Signalintensitäten erfolgte mit der GenePix™ Software. Die beiden aufgenommenen Bilder für die Cy5- und die Cy3-Signale wurden dazu zunächst in das Programm geladen, wo sie deckungsgleich übereinander gelegt wurden. Zusätzlich wurde dem Cy5-Kanal Rot und dem Cy3-Kanal Grün als Falschfarbe zugeordnet. Haben an einem Spot auf dem Microarray sowohl Cy5- als auch Cy3-markierte DNA-Moleküle an die PNAs hybridisiert, so ergeben sich für diesen Spot Mischfarben aus Grün und Rot.

Für die Quantifizierung der Signalintensitäten wurde ein Raster über die Microarrays gelegt, dessen Punkte automatisch und auch manuell an die jeweiligen Spots angepasst wurden. Nach dem Anpassen dieses Rasters wurden die Signalintensitäten eines jeden Spots von der Software ausgewertet und in einer Tabelle wiedergegeben. Neben den Signalintensitäten und den Verhältnissen der Cy5- zu Cy3-Signalen wurden unter anderem auch die Werte der Hintergrund-Signalintensitäten in der Ergebnistabelle ausgegeben.

3 Ergebnisse

Das Ziel war eine kostengünstige Herstellung hochreiner PNA-Microarrays für die selektive Hybridisierung von unmarkierten DNA-Molekülen, die anschließend mittels TOF-SIMS analysiert werden können. Hierzu wurde zunächst die Synthese der PNAs in Multiwell-Platten optimiert. Im Anschluss wurden unterschiedliche Kopplungsmechanismen zwischen dem N-Terminus der PNAs und den aktivierten Oberflächen getestet, um durch die Anbindung gleichzeitig eine Aufreinigung der vollständig synthetisierten PNAs von den acetylierten Abbruchsequenzen zu erreichen. Zum Schluss wurden Hybridisierungen der PNA-Microarrays sowie Analysen mittels Fluoreszenzscanner und TOF-SIMS durchgeführt.

Zusätzlich wurde ein kurzer Abstecher zur Peptidsynthese gemacht und gezeigt, dass es mit dem optimierten System auch möglich war, Peptide mit und ohne Seitenschutzgruppen zu synthetisieren.

3.1 PNA-Synthese

Die automatisierte Synthese in 96er und 384er Mikrotiterplatten wurde mit Fmoc-geschützten PNA-Monomeren etabliert. Dafür wurde ein Robotersystem der Firma Abimed, welches später von der Firma INTAVIS AG weiterentwickelt wurde, so verändert, dass die Synthese kleiner PNA-Mengen möglich war. Zusätzlich wurde die Synthese für den minimalen Verbrauch an PNA-Monomeren optimiert, ohne die Ausbeuten an PNA drastisch zu senken. Dabei wurden Harze mit unterschiedlichen Linkern und Beladungsgraden für die Festphasensynthese der PNA-Moleküle getestet. Besonders Harze mit niedrigem Beladungsgrad zeigten deutliche Vorteile gegenüber solchen mit höherem Beladungsgrad. Gleichzeitig wurden Synthesebedingungen wie Waschschritte, Reaktionszeiten und eingesetzte Moläquivalente der einzelnen Reagenzien auf den Beladungsgrad der Harze angepasst.

3.1.1 Vergleich unterschiedlicher Syntheseharze

Bei den verwendeten Harzen ist der Beladungsgrad für die Synthese von PNAs in Mikrotiterplatten entscheidend. Vor allem bei Harzen mit einem hohen Beladungsgrad entstanden während der Synthese viele Abbruchsequenzen. Auch bei einer, dem Beladungsgrad der Harze entsprechenden Erhöhung der eingesetzten Moläquivalente an PNA-Monomeren, Aktivierungsreagenzien und restlichen Lösungen, verringerte sich der

Anteil der Abbruchsequenzen nicht deutlich. Die Abbildung 23 zeigt resultierende MALDI-TOF-Massenspektren, welche direkt nach der Synthese der PNA-Moleküle ohne vorherige Aufreinigung aufgenommen wurden.

Beim Trityl-Harz mit einem sehr hohem Beladungsgrad von 2,3 mmol/g sind die Peaks der Abbruchsequenzen deutlich im Massenspektrum zu sehen. Das „Wang amide resin“ mit einer mehr als dreifach niedrigeren Beladung von 0,7mmol/g lieferte schon wesentlich bessere Resultate als das Trityl-Harz. Die besten Ergebnisse wurden jedoch bei Harzen mit einem noch niedrigeren Beladungsgrad im Bereich von 0,16 - 0,3 mmol/g erzielt. Bei diesen Harzen liefen die Synthesen reproduzierbar gut. Die Peaks der Abbruchsequenzen sind beim TentaGel®-S RAM Fmoc-, NovaSyn® TG Sieber- und Rink-Harz im Vergleich zum Peak des Hauptproduktes ($[M+H]^+$, m/z = 3544,4 Da) sehr klein oder gar nicht zu sehen. Dieses Ergebnis, wenn gleich die Intensitäten der bei der MALDI-TOF-Analyse erhaltenen Peaks nicht absolut quantitativ sind, sprach für eine Synthese mit ausreichend guten Kopplungsraten. Dieses konnte auch durch die UV-Messungen des Dibenzofulven-Piperidin-Adduktes bestätigt werden (siehe 2.2.5), bei denen, Abhängig von der Sequenz und von kleinen Schwankungen der vom Roboter abgegebenen Lösungsmengen, Kopplungsraten zwischen 0,94 und 0,99 ermittelt wurden.

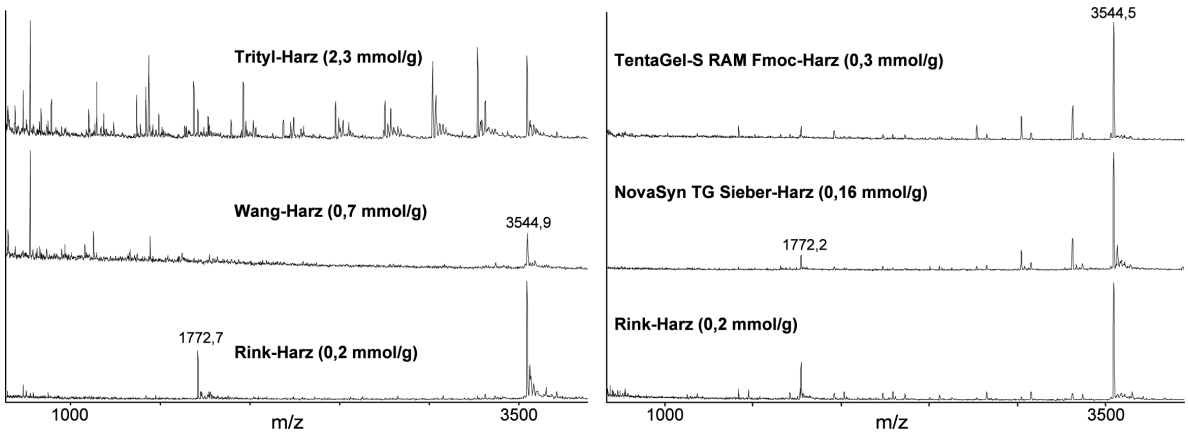

Abb. 23: Festphasensynthese einer PNA (H_2N-AGCTTACGGATCA-$CONH_2$, $[M+H]^+$, m/z = 3545,4 Da) an Harzen mit unterschiedlichen Beladungsgraden (jeweils in Klammern angegeben) und funktionellen Linkern. Die Peaks bei m/z = 1772,7 Da auf der linken und bei m/z = 1772,2 Da auf der rechten Seite stellen die Peaks des jeweils doppelt geladenen Hauptproduktes $[M+2H]^{2+}$ dar.

Alle Synthesen zu den in Abbildung 23 gezeigten Spektren wurden mit den optimierten Syntheseparametern (siehe 3.1.2) durchgeführt. Die eingesetzten Moläquivalente der PNA-Monomere und Aktivierungsreagenzien wurden dabei auf die Beladung der Harze angepasst.

Für alle weiteren PNA-Synthesen wurde das Rink-Harz verwendet, da dieses von den

Harzen mit geringer Beladung am preiswertesten war und die Spektren keine großen Unterschiede zum TentaGel®-S RAM Fmoc- oder NovaSyn® TG Sieber-Harz zeigten. Bei den Harzen mit zusätzlichem PEG-Linker (TentaGel® und NovaSyn®) waren tendenziell sogar höhere Peaks bei längeren Abbruchsequenzen in den Massenspektren zu sehen.

3.1.2 Optimierung der Syntheseparameter

Die Optimierung der Syntheseparameter wurde parallel zum Testen der unterschiedlichen Harze durchgeführt. Da in den Mikrotiterplatten mit integrierter Fritte bzw. Membran kein Durchmischen der Harzkügelchen in den zugegebenen Lösungen möglich war, mussten die Mengen der Lösungen, die Reaktionszeiten und die Anzahl der einzelnen Reaktions- und Waschschritte angepasst werden. Es wurde festgestellt, dass besonders die Anzahl der Waschschritte und die Kopplungszeiten entscheidend für die Qualität der Synthese in Mikrotiterplatten sind. Bei gleich bleibender Kopplungszeit, wurde bei der Erhöhung der Waschschritte zwischen Entschützung, Kopplung der Monomere und Acetylierungsschritt eine deutliche Verbesserung der PNA-Synthese festgestellt. Auch eine Verdopplung der Kopplungsschritte führte zu kleineren Peaks der Abbruchsequenzen in den MALDI-TOF-Spektren.

Die Waschschritte bestanden jeweils aus der Zugabe von 80 µl DMF pro „well“ und dem anschließenden Absaugen der Lösung mit Hilfe der Vakuumstation. Es wurde zudem festgestellt, dass sich mehrmaliges Waschen positiver auswirkt, als einmaliges Waschen mit einem größeren Lösungsmittelvolumen. In Abbildung 24 sind drei Spektren für die Synthese eines PNA 9mers mit unterschiedlichen Kopplungszeiten und variierender Anzahl an Waschschritten dargestellt. Es kann deutlich gesehen werden, dass bei einer Erhöhung der Waschschritte eines Synthesezyklus, das Verhältnis des Hauptprodukt-Peaks (9mer) zu den Peaks der Abbruchsequenzen ($7mer_{Ac}$, $6mer_{Ac}$, ...) abnimmt.

Für die optimierte Synthese wurden 2 mg Rink-Harz pro „well“ eingesetzt, die mit 8 µl Kopplungslösung ausreichend bedeckt waren. Die Konzentrationsbestimmungen nach der Synthese an 2 mg Rink-Harz ergaben durchschnittlich absolute PNA-Mengen von 100 - 200 nmol. Dieses entsprach etwa 25 - 50% der ursprünglichen Beladung des Rink-Harzes mit funktionellen Aminogruppen. Bei der Kopplung des ersten Monomers wurden also nur etwa die Hälfte aller Aminogruppen des Harzes umgesetzt. Die restlichen Amino-gruppen wurden während des folgenden Acetylierungsschrittes für die weitere Synthese blockiert, um im nächsten Kopplungsschritt die Verlängerung zu falschen Sequenzen zu verhindern.

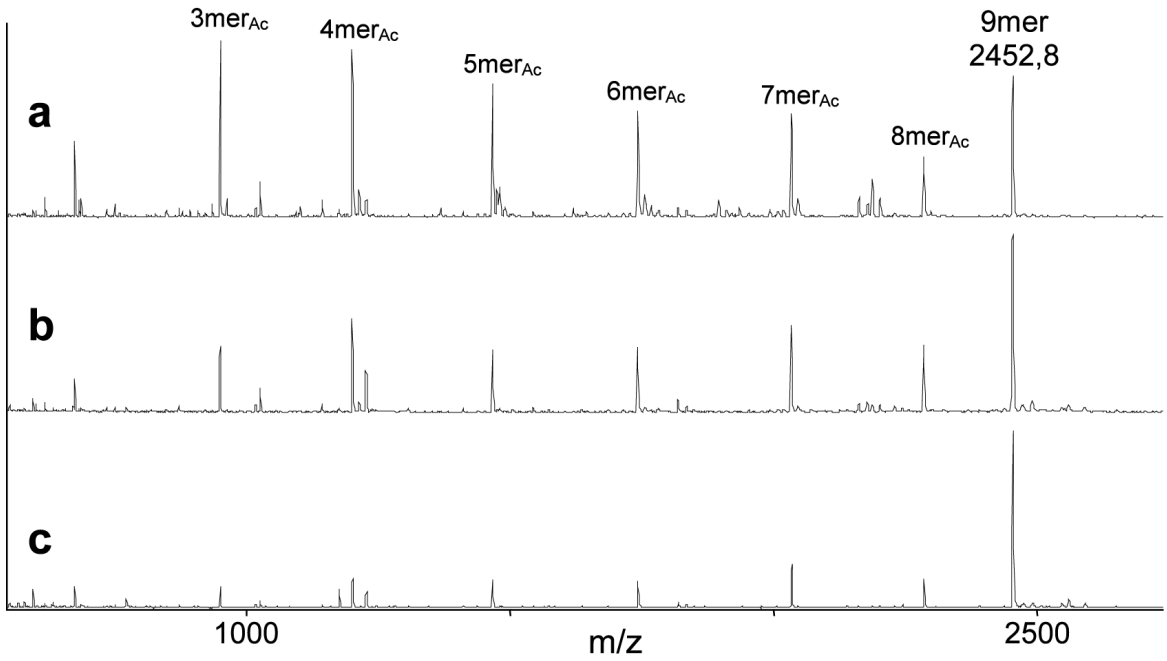

Abb. 24: Einfluss unterschiedlicher Syntheseparameter auf die Qualität der PNA-Synthese am Beispiel eines 9mers (H_2N-TCGATCAGT-$CONH_2$, $[M+H]^+$, m/z = 2452,3 Da). (a) Jeweils ein Waschschritt nach dem Entschützen und der Kopplung (2 × 10 min) und zwei nach der Acetylierung. (b) Drei Waschschritte nach dem Entschützen, einer nach der Kopplung (2 × 15 min) und drei nach der Acetylierung. (c) Fünf Waschschritte nach dem Entschützen, drei nach der Kopplung (2 × 15 min) und sechs nach der Acetylierung.

Für die Festphasensynthese am Rink-Harz mit einem Beladungsgrad von 0,2 mmol/g wurde die Kopplungszeit nochmals von 2 × 15 min auf 2 × 20 min erhöht. Die schließlich optimierte Synthese wurde mit folgenden Parameter durchgeführt:

Schritt	Anzahl	Reagenzien und Mengen	Zeiten
Entschützen	2 ×	jeweils 30 µl 20% Piperidin in DMF	1 × 1 min / 1 × 5 min
Waschen	5 ×	jeweils 80 µl mit DMF	-
Kopplung	1 ×	4 µl 0,3 M PNA-Monomer 2 µl 0,6 M HATU in DMF 2 µl 0,6 M DIPEA und 0,9 M Lutidin in DMF	Zyklus 1-10: 18 min Zyklus 11-15: 21 min Zyklus ≥16: 24 min
Waschen	1 ×	jeweils 80 µl mit DMF	-
Kopplung	1 ×	4 µl 0,3 M PNA-Monomer 2 µl 0,6 M HATU in DMF 2 µl 0,6 M DIPEA und 0,9 M Lutidin in DMF	Zyklus 1-10: 18 min Zyklus 11-15: 21 min Zyklus ≥16: 24 min
Waschen	3 ×	jeweils 80 µl mit DMF	-
Acetylierung	1 ×	30 µl 5% Ac_2O und 6% Lutidin in DMF	1 × 5 min
Waschen	5 ×	jeweils 80 µl mit DMF	-

Tab. 1: Optimierte Syntheseparameter für die Synthese von PNA-Molekülen in 96er Mikrotiterplatten.

Mit diesen Syntheseparametern war es möglich, PNAs in ausreichender Qualität für das

Spotten auf tausende Microarrays in verschiedenen Längen sowie mit diversen Modifikationen am N-Terminus zu synthetisieren. So wurden neben den Standard-PNAs mit H_2N-Gruppe als N-Terminus auch solche mit Cystein (Cys), Lysin (Lys), Biotin, AEEA-OH-Linker und Fluoreszenzfarbstoffen (z.B. Alexa-488) am N-Terminus synthetisiert (siehe Abb. 25). Cystein-PNAs wurden dabei zur Anbindung an Maleinimid- und biotinylierte PNAs zur Anbindung an Streptavidin-Oberflächen verwendet. Der AEEA-OH-Linker kam als Spacer zum Einsatz, durch den der Abstand der angebundenen PNAs zur Oberfläche erhöht wurde. Lysine konnten zur Verbesserung der Löslichkeit von PNAs eingesetzt werden. Hierzu wurde schon zuvor gezeigt, dass die terminale Modifikation mit einigen Lysinen die Löslichkeit von PNA-Molekülen erhöht (Egholm et al., 1992). Dieses kann für einige Anwendungen und / oder bestimmte PNA-Sequenzen wichtig sein, da lange PNAs und solche mit einem hohen Purin:Pyrimidin-Verhältnis zur Selbstaggregation neigen (Hyrup & Nielsen, 1996).

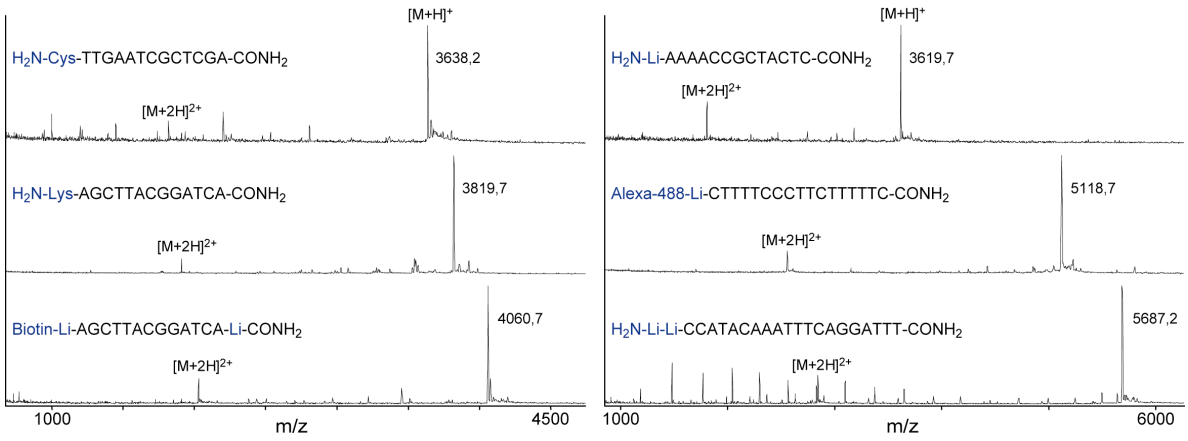

Abb. 25: Festphasensynthese unterschiedlicher PNAs mit diversen N-terminalen Modifikationen. In den MALDI-TOF-Spektren sind die Peaks der Hauptprodukte ($[M+H]^+$) mit den entsprechenden m/z-Werten, die kleineren Peaks der Abbruchsequenzen und die zum Hauptprodukt gehörenden Peaks der doppelt geladenen Moleküle ($[M+2H]^{2+}$) zu sehen. Die Spektren wurden direkt nach der Synthese mit den optimierten Parametern (Tab. 1) ohne vorherige Aufreinigung der PNAs aufgenommen. Cys = Cystein, Lys = Lysin, Li = AEEA-OH-Linker und Alexa-488 = Fluoreszenzfarbstoff Alexa-488.

3.2 Synthese an 0,5 mg Harz und in 384er Platten

Nachdem die Synthese in den 96er Platten an 2 mg Harz optimiert war, wurde eine weitere Reduzierung des eingesetzten Syntheseharzes auf 0,5 mg getestet. Hierzu wurden auch die Mengen der verwendeten Monomere sowie der Aktivierungsreagenzien (HATU, DIPEA und 2,6-Lutidin) auf ein Viertel reduziert. Da das Lösungsvolumen, das der Roboter reproduzierbar mit der Kanüle abgeben kann bei ca. 8 µl liegt, wurden die Monomer-, HATU- und DIEPA / 2,6-Lutidin-Lösungen noch zusätzlich verdünnt. Das absolute Volumen von 8 µl je Kopplungsschritt wurde so beibehalten. Neben der Reduzierung des

Maßstabs wurde auch die Synthese von PNAs in 384er Platten getestet. Die Synthese wurde dabei zunächst an 2 mg Harz mit den gleichen Bedingungen wie zuvor in den 96er Platten durchgeführt.

Die Synthese an 0,5 mg lieferte bei kurzen PNAs recht gute Ergebnisse. Bei längeren PNAs waren die Peaks der Abbruchsequenzen im Massenspektrum sehr viel intensiver als bei der zuvor optimierten Synthese an 2 mg Harz. Dieses korreliert auch mit den ermittelten Gesamtausbeuten an PNA, die generell niedriger als ein Viertel des 2 mg - Maßstabs waren. So wurden zu den in Abbildung 26 gezeigten Massenspektren absolute Mengen der zugehörigen PNAs von etwa 14, 15 und 8 nmol ermittelt (von oben nach unten). Die Werte für ein Viertel der Ausbeuten des 2 mg - Maßstabs hätte für das „Rink resin LS“ eigentlich zwischen 50 und 25 nmol liegen müssen. Zusätzlich fällt auch die geringere Ausbeute des 20mers im Vergleich zum 16mer bzw. 14mer auf.

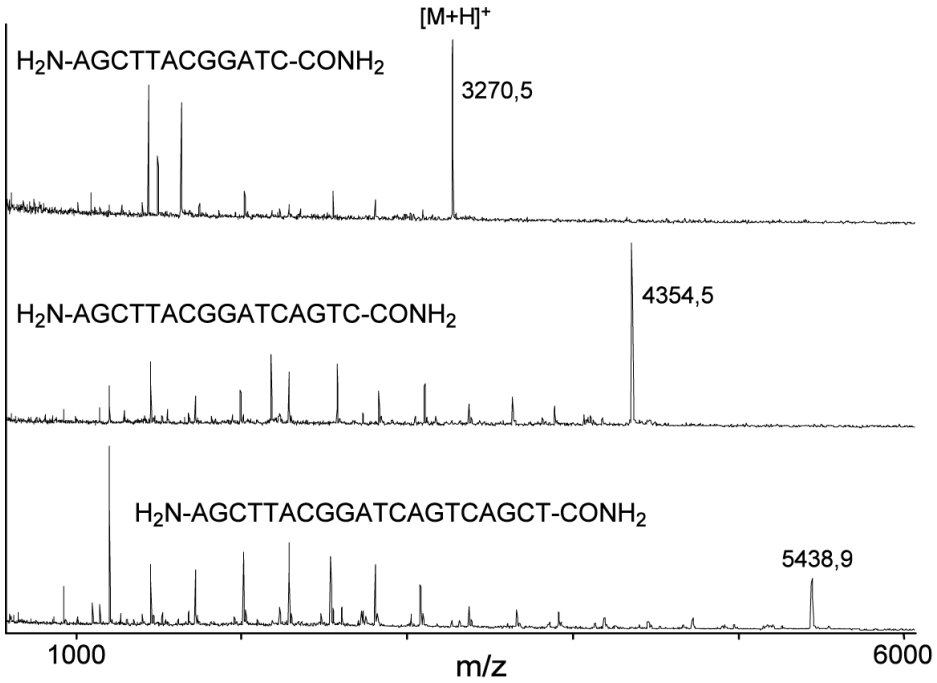

Abb. 26: Festphasensynthese unterschiedlich langer PNAs (12, 16 und 20mer) an 0,5 mg „Rink resin LS“. In den MALDI-TOF-Spektren sind die Peaks der Hauptprodukte ($[M+H]^+$) mit den entsprechenden m/z-Werten und die kleineren Peaks der Abbruchsequenzen zu sehen. Die Spektren wurden direkt nach der Synthese ohne vorherige Aufreinigung der PNAs aufgenommen.

Die Synthese an 2 mg Harz in den 384er Platten lieferte ebenfalls bei kürzeren PNAs gute Ergebnisse. Bei längeren PNAs fallen wieder die höheren Peaks der Abbruchsequenzen auf. Hier müssten für bessere Kopplungsraten der einzelnen Zyklen evtl. die Waschbedingungen an die Synthese in den kleineren „wells“ angepasst werden. Die Waschschritte wurden aufgrund des geringeren Fassungsvermögens der „wells“ nur mit

30 µl im Gegensatz zu den 80 µl, die für die größeren 96er Platten verwendet wurden, durchgeführt. Wie aber schon zuvor gezeigt wurde, verbessert eine Erhöhung der Waschschritte die Synthese von PNAs deutlich (3.1.2). Abbildung 27 zeigt zwei exemplarische MALDI-TOF-Spektren einer 8mer PNA und einer 12mer PNA, jeweils mit AEEA-OH-Linker am N-Terminus.

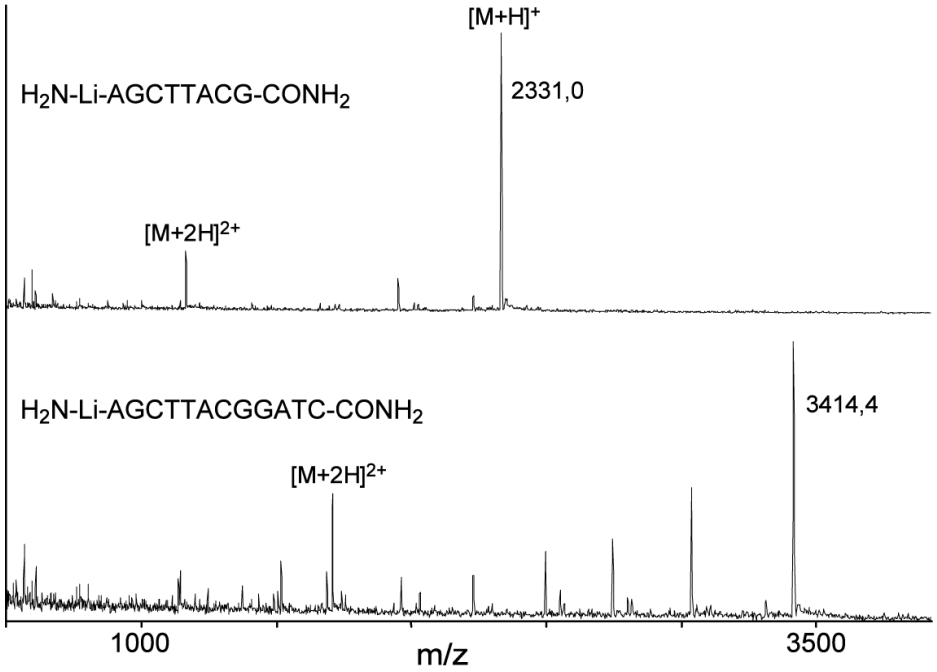

Abb. 27: Festphasensynthese unterschiedlich langer PNAs (8 und 12mer) an 2 mg „Rink resin LS“ in einer 384er Platte. In den MALDI-TOF-Spektren sind die Peaks der Hauptprodukte ($[M+H]^+$) mit den entsprechenden m/z-Werten, die kleineren Peaks der Abbruchsequenzen und die zum Hauptprodukt gehörenden Peaks der doppelt geladenen Moleküle ($[M+2H]^{2+}$) zu sehen. Die Spektren wurden direkt nach der Synthese ohne vorherige Aufreinigung der PNAs aufgenommen. Li = AEEA-OH-Linker.

Generell war es möglich, die Synthese sowohl in 384er Platten als auch im kleineren Maßstab an 0,5 mg Harz durchzuführen. Für noch kostengünstigere Synthesen an geringeren Harz-Mengen wäre ein anderes Robotersystem sinnvoll, welches reproduzierbar Mengen im Bereich von 2 - 5 µl abgeben kann, wodurch ein zusätzliches Verdünnen der Monomere und Aktivierungsreagenzien nicht nötig wäre.

3.3 Peptidsynthese an unterschiedlichen Harzen

Die Synthese von Peptiden kann für unterschiedlichste Anwendungen wie z.B. das Wirkstoffsreening, das Epitopmapping oder das Aufreinigen von Phagen aus einer „phage display“-Bibliothek (Bialek et al., 2003) interessant sein. Besonders die schnelle und

kostengünstige Herstellung von Peptid-Microarrays kann für diese Anwendungen eine wichtige Rolle spielen.

Es wurde gezeigt, dass vollständig entschützte Peptide sowohl am „Rink resin LS“ als auch am „NovaSyn® TG Sieber resin“ mit leicht abgeänderten Bedingungen der PNA-Synthese synthetisiert werden können. Am Harz mit dem Sieber-Linker, welcher wesentlich säurelabiler als der Rink-Linker ist, war es zusätzlich möglich, Peptide mit geschützten Seitengruppen abzuspalten. Vollständig geschützte Peptide eignen sich für das Anbinden an aktivierte Oberflächen über N-terminale Thiol- oder Aminogruppen, da die funktionellen Seitengruppen der Aminosäuren wie zum Beispiel die Aminogruppe von Lysin, die Hydroxylgruppe von Serin, die Thiolgruppe von Cystein oder die Carboxylgruppe von Glutamin- und Asparaginsäure geschützt bleiben und so nicht für eine Anbindung zur Verfügung stehen. Es können folglich Oberflächen mit DSC oder EMCS aktiviert, die geschützten Peptide aufgebracht und die nicht angebundenen Abbruchsequenzen anschließend abgewaschen werden. So ist es möglich, ähnlich wie bei der parallelen Aufreinigung von PNAs (siehe 3.4.4), auch Peptide direkt nach der Synthese während der Anbindung an aktivierte Oberflächen aufzureinigen.

Abbildung 28 zeigt auf der linken Seite MALDI-TOF-Massenspektren eines Peptids, welches an zwei unterschiedlichen Harzen synthetisiert wurde. Auf der Rechten Seite sind die Spektren von zwei Peptiden dargestellt, die mit Seitenschutzgruppen vom „NovaSyn® TG Sieber resin“ abgespalten wurden. Da die Peptide vor der MALDI-TOF-Analyse nicht aufgereinigt oder entsalzt wurden, sind neben den Hauptprodukt-Peaks ($[M+H]^+$) auch die Peaks der Natrium-Addukte zu sehen ($[M+Na]^+$, $[M-H+2Na]^+$, $[M-2H+3Na]^+$), wobei pro zusätzlichem Natrium eine Verschiebung um +22 Da auftritt.

Bei beiden Massenspektren der abgespaltenen Peptide mit Seitenschutzgruppen ist jeweils ein Peak mit einer Verschiebung um -242 Da, mit dem dazugehörigen Na-Addukt (+22 Da), zu sehen. Dieser Peak entspricht exakt der Masse des entsprechenden vollständig geschützten Peptids mit einer abgespaltenen Trityl-Schutzgruppe. Unter den verwendeten Abspaltungsbedingungen vom Harz oder bei der MALDI-TOF-Analyse wird also eine Trityl-Gruppe vom Peptid entfernt, die während der Synthese zum Schutz der Aminosäure-Monomere Asparagin (Asn, N), Glutamin (Gln, Q) und Histidin (His, H) zum Einsatz kommt. Da in beiden Peptiden jeweils ein Histidin, ein Glutamin und ein Asparagin vorkommt, ist es wahrscheinlich, dass die Trityl-Gruppe vom Histidin abgespalten wird. Bei Asparagin und Glutamin wird jeweils die Carbamid-Gruppe geschützt. Würde die Trityl-Gruppe hier mit abgespalten, so müsste eine Verschiebung um -484 Da (zwei Trityl-

Gruppen) oder zumindest zwei Peaks bei -242 Da und -484 Da im Massenspektrum zu finden sein. Da aber reproduzierbar nur ein Peak bei -242 Da zu sehen ist, handelt es sich wahrscheinlich um das Histidin, von dem die Trityl-Gruppe abgespalten wird.

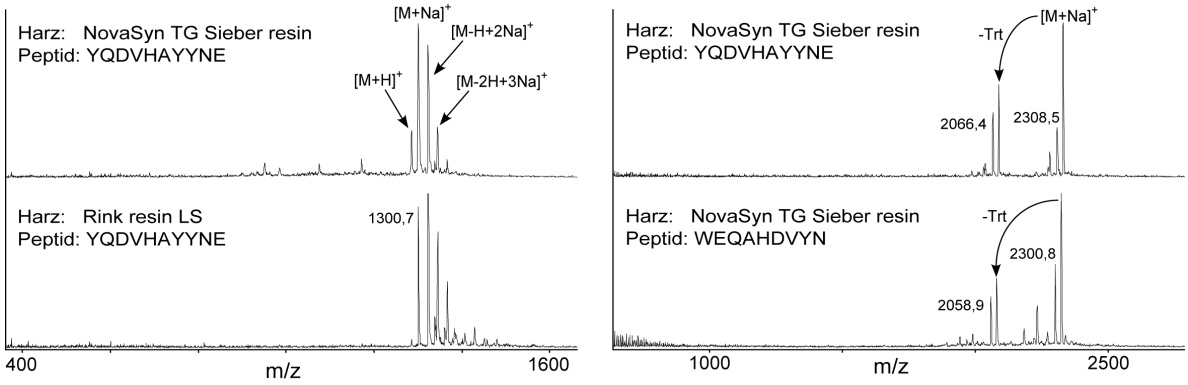

Abb. 28: Festphasensynthese von Peptiden mit und ohne Seitenschutzgruppen. Auf der linken Seite wurde gleiche Peptid (H_2N-YQDVGAYYNE-$CONH_2$) an zwei unterschiedlichen Harzen synthetisiert. Die Peaks hinter dem Hauptpeak ($[M+H]^+$, m/z = 1300,7 Da) sind die Peaks der Natrium-Addukte mit einem, zwei und drei Natrium-Ionen (Na^+, m/z = 22 Da). Auf der rechten Seite sind zwei unterschiedliche, geschützte Peptide gezeigt. Zusätzlich zu den Peaks der vollständig geschützten Peptide (m/z = 2308,5 Da bzw. 2300,8 Da), sind die Peaks der Peptide weniger eine Trityl-Schutzgruppe (Trt) und die zu den jeweiligen Molekülen gehörenden Peaks der Natrium-Addukte (+22 Da) zu sehen.

Mit den hier verwendeten Synthesebedingungen konnten Peptide bis zu einer Länge von 21 Aminosäuren einfach hergestellt werden. Die Synthese von noch längeren Peptide wurden nicht getestet, ist aber durchaus möglich, da beim 21mer kaum Abbruchsequenzen zu sehen sind (siehe Abb. 29), die Kopplung der einzelnen Monomere also sehr effektiv war.
Abbildung 29 zeigt ein Peptid (21mer), welches mit terminaler Fmoc-Gruppe vom Harz abgespalten wurde:

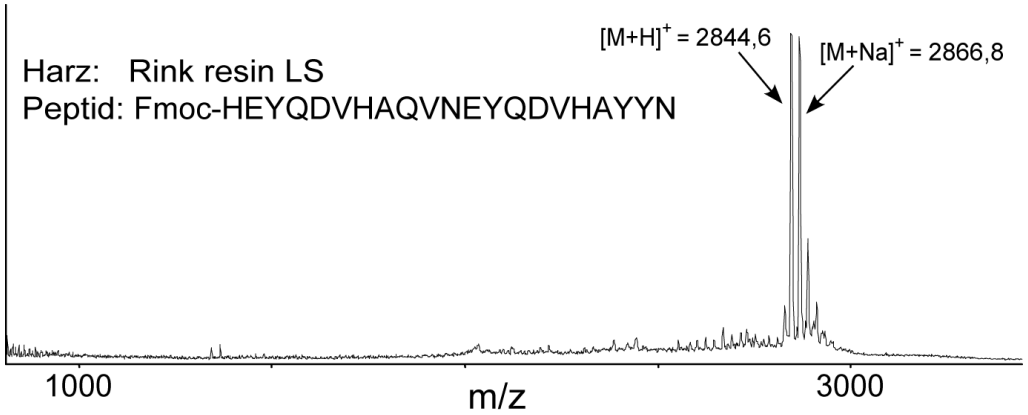

Abb. 29: Massenspektrum eines längeren Peptids mit 21 Aminosäuren und terminaler Fmoc-Schutzgruppe, welche nach der Synthese nicht abgespalten wurde. Der Molekül-Peak ($[M+H]^+$, m/z = 2844,6 Da) und die Peaks der Natrium-Addukte (m/z = 2866,8 Da und m/z = 2888,8 Da) sind zu sehen.

3.4 Selektives Anbinden der PNAs an Oberflächen

Für das Anbinden der PNAs an Oberflächen wurden zunächst die unterschiedlichen Aktivierungen der Oberflächen untersucht und optimiert. Anschließend wurden die Lösungen zum Spotten der PNAs auf den jeweiligen Oberflächentyp abgestimmt. Die Puffer für die Hybridisierung von DNA-Oligonukleotiden an PNAs wurden ähnlich wie schon zuvor beschrieben verwendet (Weiler et al., 1997).

Um das zeitaufwendige und kostenintensive Aufreinigen der PNAs nach der Synthese mittels HPLC zu umgehen, wurden Versuche zur parallelen Aufreinigung der PNAs durch selektives Anbinden an Oberflächen durchgeführt. Hierfür wurde das selektive Anbinden für drei mögliche N-Termini von PNAs in Kombination mit entsprechenden Aktivierungsreagenzien und passenden Oberflächen untersucht. PNAs mit N-terminaler Aminogruppe wurden für das chemische Koppeln an DSC-aktivierte Aminosilanoberflächen verwendet, PNAs mit Thiolfunktion am N-Terminus wurden für das Anbinden auf Gold-Oberflächen oder EMCS-aktivierte Aminosilanoberflächen eingesetzt, und PNAs mit N-terminalem Biotin wurden auf Oberflächen, die mit Streptavidin beschichtet wurden, gebunden.

Die Effizienz dieser „On-Chip"-Aufreinigung wurde anhand von zwei verschiedenen Methoden gezeigt. Als erstes wurden für alle N-Termini entsprechende PNAs mit den gleichen, am N-Terminus acetylierten PNAs als Negativkontrollen auf aktivierte Oberflächen gespottet, anschließend mit komplementären fluoreszenzmarkierten DNA-Oligonukleotiden hybridisiert und die Signale ausgewertet. Die Gold-Oberflächen wurden für diese Versuche nicht verwendet, da das Hintergrundsignal der Gold-Oberflächen für eine sinnvolle Auswertung zu stark war.

Zusätzlich zu den Hybridisierungsversuchen wurden die Oberflächen mit einem säurelabilen Linker versehen, der ein Abspalten der PNAs nach dem Anbinden und einigen Waschschritten von den Oberflächen ermöglichte. So konnten die Massenspektren der angebundenen und wieder abgespaltenen Moleküle mit den Spektren der zum Spotten verwendeten PNA-Ausgangslösungen verglichen werden.

Zu den Hybridisierungsversuchen wurden die Signalintensitäten ausgewertet und die Verhältnisse der PNAs mit N-terminaler reaktiver Gruppe zu den vollständig acetylierten Kontrollsequenzen miteinander verglichen.

Abbildung 30 zeigt schematisch den Ablauf der beiden eingesetzten Methoden vom selektiven Anbinden an die Oberfläche bis zum Hybridisieren und der massenspektrometrischen Analyse:

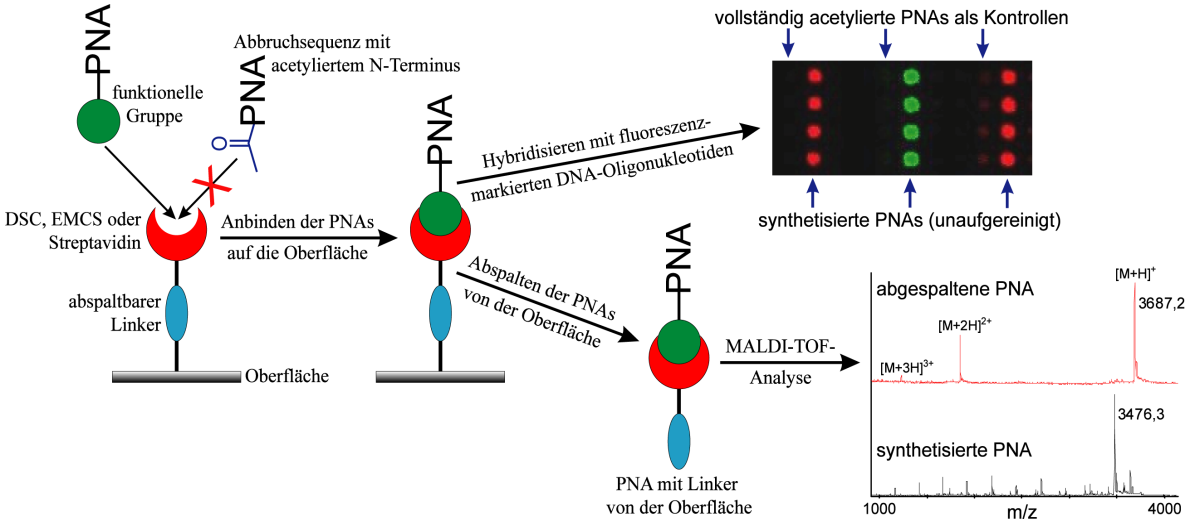

Abb. 30: Schematische Abbildung zur selektiven Anbindung von PNA-Molekülen mit unterschiedlichem N-Terminus (grün) an entsprechende Oberflächen. Die Effektivität der parallelen Aufreinigung von PNAs durch selektives Anbinden wurde durch Hybridisierungsversuche als auch MALDI-TOF-Analysen gezeigt.

3.4.1 Aktivierung der silanisierten Oberflächen

Die Effizienz des Anbindens der PNA-Moleküle an die unterschiedlichen Oberflächen hing zum einen von der Löslichkeit der PNAs in dem jeweils verwendeten Spotting-Puffer und zum anderen vom Lösungsmittel ab, welches zur Aktivierung der Oberflächen verwendet wurde. Für die Aktivierung der Oberflächen mit DSC oder EMCS wurden organische Lösungsmittel verwendet, die möglichst wasserfrei waren, da hier ansonsten die Gefahr des Hydrolysierens der funktionellen Succinimidyl-Gruppen, welche an die Aminogruppen der silanisierten Oberfläche binden, bestand. Versuche zur DSC-Aktivierung von Aminosilan-Oberflächen zeigten, dass Aceton als Lösungsmittel für die DSC-Aktivierung bessere Signalintensitäten lieferte als Acetonitril und DMSO.

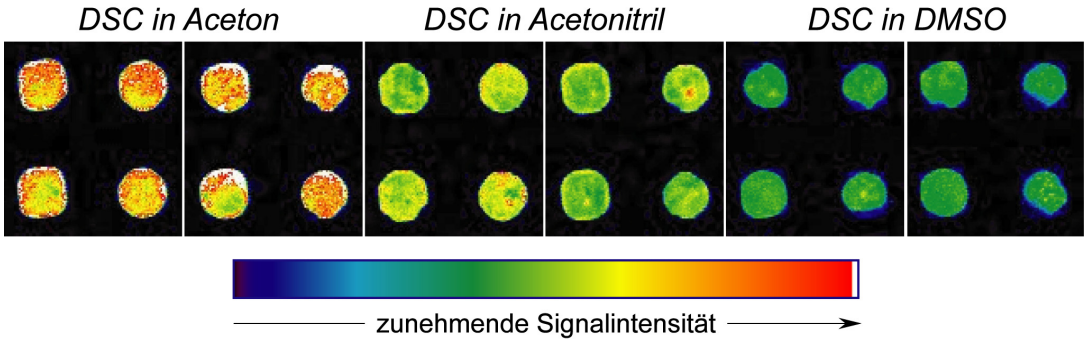

Abb. 31: DSC-Aktivierung in unterschiedlichen Lösungsmitteln. Je Lösungsmittel wurden zwei Wiederholungen, die hier nebeneinander dargestellt sind, durchgeführt. Die Signalintensitäten nehmen von Aceton über Acetonitril bis zum DMSO ab. Weiße Signale sind übersättigte Bereiche, bei denen die Signalintensität über dem auswertbaren Maximalwert liegt.

Nach dem Aktivieren der Oberflächen mit DSC in den unterschiedlichen Lösungsmitteln

wurden 13mer *TC-PNAs* auf diese Oberflächen gespottet. Anschließend wurden die PNA-Microarrays mit komplementären Cy5-markierten DNA-Oligonukleotiden hybridisiert und im Fluoreszenzscanner analysiert. Für jedes Lösungsmittel wurden zwei Oberflächen aktiviert. Die eingescannten hybridisierten Microarrays sowie die Intensitätsskala sind in Abbildung 31 dargestellt. Für alle sechs Microarrays wurden die gleichen Einstellungen des Fluoreszenzscanners verwendet, so dass die Signalintensitäten direkt miteinander vergleichbar waren.
Die Intensitätsskala behält ihre Gültigkeit für alle Versuche der folgenden Kapitel 3.4.2 und 3.4.3, bei denen PNA-Microarrays mittels Fluoreszenzscanner analysiert wurden.

3.4.2 Anbinden von PNAs an aktivierte Oberflächen

Das Anbinden von PNAs wurde zunächst mit unterschiedlich konzentriertem SSC-Puffer, dem Betain oder Glycerin zugesetzt wurde, getestet. Das Glycerin wurde jedoch schnell wieder verworfen, da es bei den DSC-aktivierten Oberflächen sehr schlechte Ergebnisse lieferte. Wahrscheinlich reagiert das Glycerin mit der DSC-aktivierten Oberfläche, so dass die PNA-Anbindung nicht mehr effektiv stattfinden kann. Anschließend wurde allen Lösungen zum Spotten nur noch Betain zugesetzt.

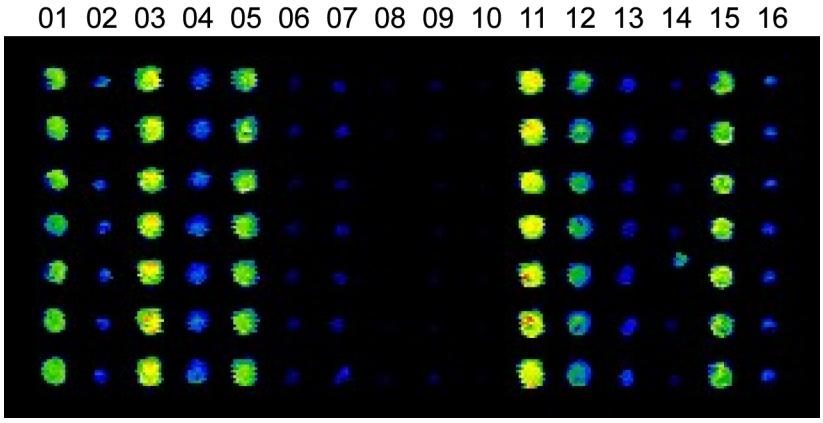

Abb. 32: Vergleich von 3× und 6× SSC-Puffer mit unterschiedlichen Konzentrationen an Betain und Glycerin. Von links nach rechts wurde die *TC-PNA* abwechselnd in Konzentrationen von 20 µM und 2 µM, beginnend mit 20 µM, in folgenden Puffern auf eine DSC-aktivierte Oberfläche gespottet:
01/02: 3× SSC; 03/04: 3× SSC + 2 M Betain; 05/06: 3× SSC + 4 M Betain; 07/08: 3× SSC + 2 M Glycerin; 09/10: 3× SSC + 4 M Glycerin; 11/12: 6× SSC + 2 M Betain; 13/14: 6× SSC + 4 M Betain; 15/16: 3× SSC.

Die Signale der Reihen, in denen Glycerin als Zusatz zum Spotten verwendet wurde, sind deutlich schwächer als die Reihen, in denen Betain zugesetzt wurde. Der Zusatz von Betain wirkte sich bei einer Konzentration von 2 M positiv auf die Signalintensitäten nach der

Hybridisierung mit einem komplementären DNA-Oligonukleotid aus. Bei einer weiteren Erhöhung der Betain-Konzentration auf 4 M nahmen die Signalintensitäten wieder ab.

Das Betain wurde zugesetzt, um das Wasser aus dem Puffer besser zu binden, wodurch die PNA-Lösungen in den 384er Mikrotiterplatten, aus denen gespottet wurde, und die Tröpfchen auf den Oberflächen langsamer evaporierten (Diehl et al., 2001). Dieses langsamere Verdampfen des Wassers wirkt sich sowohl auf die gleichbleibende Konzentration der PNA-Lösungen in der Spotting-Platte als auch auf das Anbinden der PNA-Moleküle positiv aus. Für SSC-Puffer und andere Puffer mit ähnlich hoher Salzkonzentration wurde festgestellt, dass PNAs mit einem großen Anteil an Purinen schlecht löslich waren und bei höheren Konzentrationen teilweise ausfielen, was sich in den späteren Hybridisierungsversuchen anhand schlechterer Signalintensitäten bemerkbar machte. Höhere PNA-Konzentrationen von 50 - 200 µM sind aber für das Spotten auf aktivierte Oberflächen erforderlich, um eine ausreichende Anzahl an PNA-Molekülen für Hybridisierunge gewährleisten zu können.

In einer Lösung aus 1 M Betain in Wasser ließen sich alle verwendeten PNAs gut lösen, weshalb weitere Versuche mit dieser Lösung und unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt wurden. Es zeigte sich, dass ein pH-Wert von 7 - 8 auch für PNAs mit einem höheren Anteil an Purinen geeignet war. In Abbildung 33 sind Hybridisierungsexperimente mit Cy5-markierten, zu den zuvor gespotteten *TC*- und *Seq1-PNAs* komplementären DNA-Oligonukleotiden dargestellt. Die Signalintensitäten sind bei einem pH-Wert von 7 - 8 sowohl für die Homopurin-Sequenz (*TC-PNA*) als auch für die gemischte Sequenz *Seq1-PNA* (Purin:Pyrimidin = 7:6) am gleichmäßigsten. Bei höheren pH-Werten nehmen die Signale der *Seq1-PNA*-Spots stark ab. *Seq2-PNA* wurde als Negativkontrolle gespottet. Es kann deutlich gesehen werden, dass *Seq2-PNA* mit keinem der beiden DNA-Oligonukleotide hybridisierte.

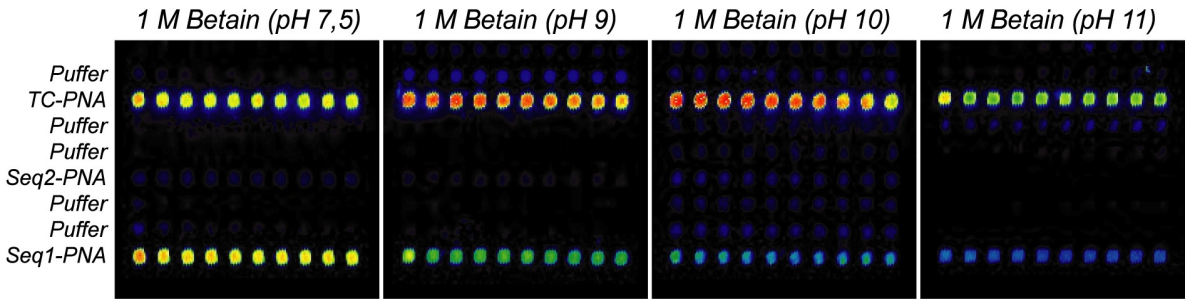

Abb. 33: Spotten von PNAs mit Konzentrationen von 50 mM in 1 M Betain Lösungen mit unterschiedlichen pH-Werten. Die Spots der *Seq2-PNA*, zu der kein komplementäres DNA-Oligonukleotid für die Hybridisierung verwendet wurde, zeigen auch keine Signale.

Für die mit EMCS aktivierten Oberflächen zeigte sich, dass eine 1 M Betain-Lösung mit einem pH-Wert um 7 für alle verwendeten PNAs gute Signale nach entsprechenden Hybridisierungsexperimenten lieferte. Für die Streptavidin-Oberflächen wurden die PNAs in 1× BW-Puffer für das Spotten aufgenommen, da sowohl 3× SSC-Puffer als auch 1 M Betain-Lösung schlechtere Signale nach Hybridisierungsversuchen lieferten.

3.4.3 Vergleich von APTES- und BSIL-Oberflächen

Aminosilan- (APTES) und Bishydroxysilan-Oberflächen (BSIL) wurden mit Di-(N,N'-succinimidyl)-carbonat (DSC) aktiviert und mit PNAs (*TC-PNA*) in Verdünnungen von 100 - 0,25 µM bespottet. Anschließend wurden die so hergestellten PNA-Microarrays mit Cy5-markierten komplementären DNA-Oligonukleotide (*DNA-TC-Cy5*) hybridisiert und die Signale im Fluoreszenzscanner detektiert. Dabei wurden die Einstellungen des Scanners wie die Höheneinstellung der Optik, die Laserintensität und die Verstärkung des Photomultipliers nicht verändert um eine direkte Vergleichbarkeit der Signalintensitäten der APTES- und BSIL-Oberflächen zu gewährleisten. Abbildung 34 zeigt das Ergebnis jeweils eines hybridisierten PNA-Microarray für eine APTES- und eine BSIL-Oberfläche:

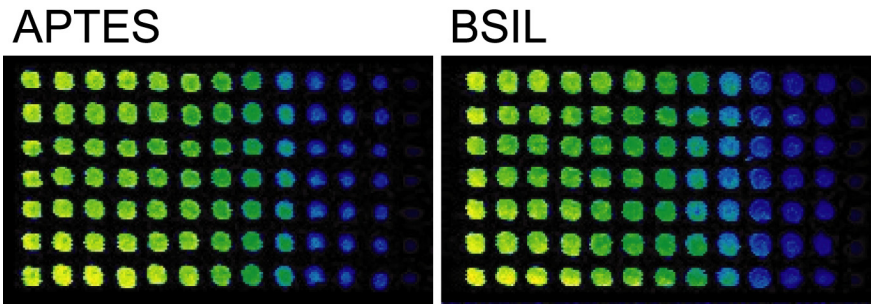

Abb. 34: Vergleich von APTES- und BSIL-Oberflächen. Von links nach rechts wurden *TC-PNAs* in Konzentrationen von 100 - 0,25 µM (100; 90; 80; 70; 60; 50; 40; 30; 20; 10; 5; 2,5; 0,25 µM) gespottet und anschließend mit komplementären Cy5-markierten DNA-Oligonukleotiden hybridisiert. Dargestellt sind die Intensitäten der Hybridisierungssignale.

Obwohl die BSIL- im Gegensatz zu den APTES-Oberflächen pro aufgebrachtem Silan zwei funktionelle Gruppen haben, ist die Signalintensität vergleichbar. Wahrscheinlich ist die Anzahl der Funktionellen Gruppen sowohl bei den APTES- als auch bei den BSIL-Oberflächen kein limitierender Faktor, da die PNA-Moleküle im Vergleich zu den APTES- und BSIL-Molekülen wesentlich größer sind. Zusätzlich ist aber auch die schlechtere Aktivierung der BSIL-Oberflächen mit DSC denkbar. Es fiel zusätzlich auf, dass bei den BSIL-Microarrays die Spots etwas größer als bei den APTES-Microarrays wurden, obwohl

mit den gleichen Pins und in einem Lauf gespottet wurde.

3.4.4 Parallele Aufreinigung der PNAs durch selektives Anbinden

Mit den für das Spotten von PNA-Molekülen mit den zuvor optimierten Bedingungen, wurde die Möglichkeit der parallelen Aufreinigung durch selektives Anbinden der PNAs an entsprechende Oberflächen getestet. Hierzu sollten möglichst nur PNAs, die bis zum Endprodukt synthetisiert wurden und somit die N-terminale Amino-, Thiol- oder Biotin-Gruppe trugen, an entsprechend aktivierte Oberflächen binden. Alle kürzeren acetylierten Abbruchsequenzen sollten nicht kovalent an die Oberflächen binden. Es sollte somit möglich sein, die acetylierten ungebundenen Abbruchsequenzen vor den Hybridisierungen durch Waschschritte von den Oberflächen zu entfernen, während die angebunden Endprodukte auf den Oberflächen verbleiben. In Abbildung 35 ist der Vorgang der selektiven Anbindung und dem damit verbundenen Aufreinigen schematisch für die drei verwendeten Oberflächen / N-Terminus-Kombinationen dargestellt:

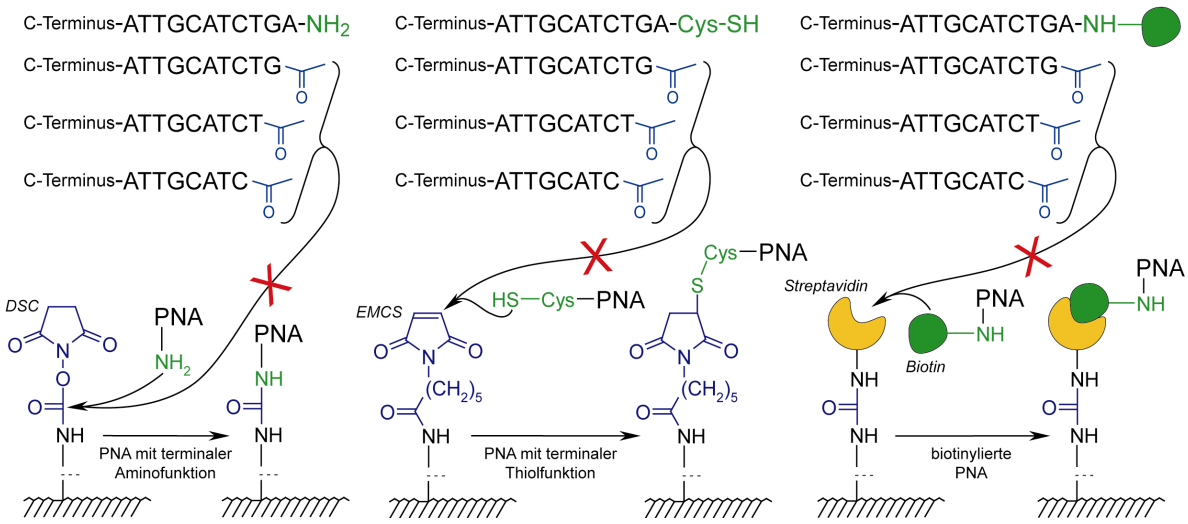

Abb. 35: Schema der selektiven Anbindung von PNAs mit verschiedenen N-Termini an unterschiedlich aktivierte Oberflächen. Die Endprodukte der PNA-Synthese mit den funktionellen Gruppen am N-Terminus (H_2N-, HS- und Biotin-) sollten an die entsprechende Oberfläche binden, während die acetylierten Abbruchsequenzen, die während der Synthese entstehen, nicht binden. Von links nach rechts sind die DSC-aktivierte, die EMCS-aktivierte und die mit Streptavidin beschichtete Oberfläche dargestellt.

Neben normal synthetisierten 13mer PNAs mit entsprechenden N-Termini wurden vollständig acetylierte PNAs der gleichen Sequenz ohne Modifikation am N-Terminus als Kontrollen verwendet. Diese Kontrollen sollten PNA-Synthesen mit maximaler Menge an acetylierten Abbruchsequenzen simulieren. Hierzu wurden die Kontroll-PNAs direkt nach der Synthese und dem Abspalten der letzten Fmoc-Schutzgruppe, fünf zusätzlichen Acetylierungsschritten unterzogen. Auch mit fünf Acetylierungsschritten konnten die PNAs

nicht quantitativ am Harz acetyliert werden. Eine Erhöhung auf sechs Acetylierungsschritte und eine Verdopplung der Zeit jedes Schrittes von 5 min auf 10 min reduzierte zwar den Peak der nicht acetylierten PNA, führte aber zu zusätzlichen Acetylierungen der PNAs an deren Nukleobasen oder Rückgrat.

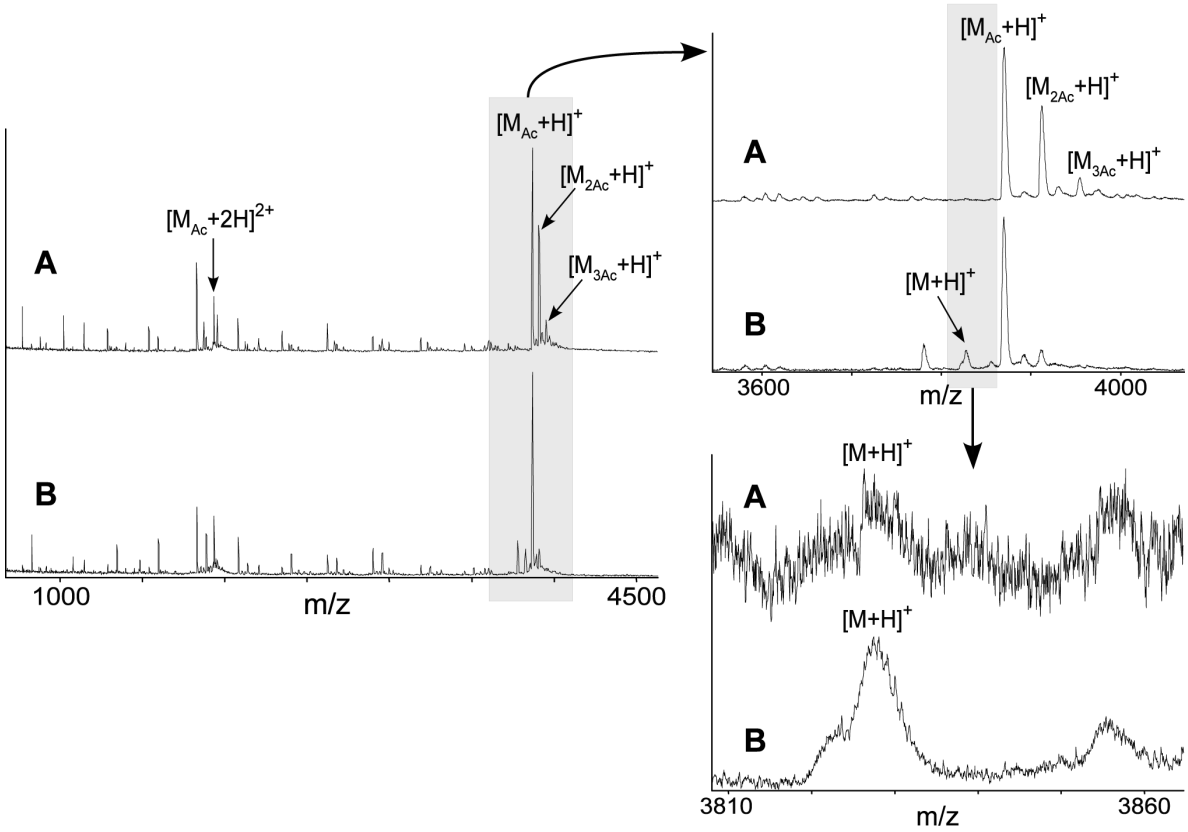

Abb. 36: Acetylierung von PNAs. Die Spektren von zwei, nach der Synthese acetylierten PNAs sind in unterschiedlichen Ausschnittsvergrößerungen gezeigt. Das obere Spektrum ist jeweils die 6 × 10 min acetylierte (**A**) und das untere Spektrum die 5 × 5 min acetylierte *Seq2C-PNA* (**B**). Bei **A** sind zusätzlich zur Masse der einfach acetylierten PNA ($[M_{Ac}+H]^+$) auch die Massen der zweifach ($[M_{2Ac}+H]^+$) und dreifach acetylierten PNA ($[M_{3Ac}+H]^+$) zu sehen. Zusätzlich ist sowohl bei der schwächer acetylierten PNA (**B**) als auch bei der stärker acetylierten PNA (**A**) ein kleiner Peak der nicht acetylierten PNA ([M+H]+) zu sehen. Bei **A** ist dieser Peak erst in der größten Ausschnittsvergrößerung erkennbar.

Zur Überprüfung der Selektivität der Anbindung durch Hybridisierungsexperimente wurden die acetylierten Kontrollen direkt vor die PNAs mit den entsprechenden N-Termini auf die drei verwendeten Oberflächen (DSC, EMCS und Streptavidin) gespottet. Nach der anschließenden Hybridisierung mit Cy5- und Cy3-markierten komplementären DNA-Oligonukleotiden wurden die Microarrays eingescannt und die Signalintensitäten ausgewertet (siehe Abb. 37).

Die Ergebnisse der Hybridisierungen zeigten, dass für alle Oberflächen eine gute Aufreinigung stattgefunden hat. Bei den DSC-Oberflächen war der Aufreinigungseffekt am geringsten. Das Verhältnis der Hybridisierungssignale der PNAs mit Aminogruppe zu den

acetylierten Kontroll-PNAs lag hier zwischen 4 - 10, während bei den EMCS- und den Streptavidin-Oberflächen Werte zwischen 20 - 60 erreicht wurden. Dieses schlechtere Verhältnis bei den DSC-Oberflächen kann zum einen daran liegen, dass die Kontroll-PNAs nicht vollständig acetyliert waren, wodurch dieser nicht-acetylierte Anteil an die DSC-Oberfläche gebunden hat, sich bei den EMCS- und Streptavidin-Oberflächen aber nicht auswirkte, da hier PNAs mit Aminogruppe kaum oder nicht anbinden können. Zum anderen können die PNAs evtl. über heterozyklische Aminogruppen der Nukleobasen Adenin, Cytosin oder Guanin anbinden, was jedoch durch die Abspaltungsversuche und die anschließenden massenspektrometrischen Analysen nicht bestätigt werden konnte (Abb. 38).

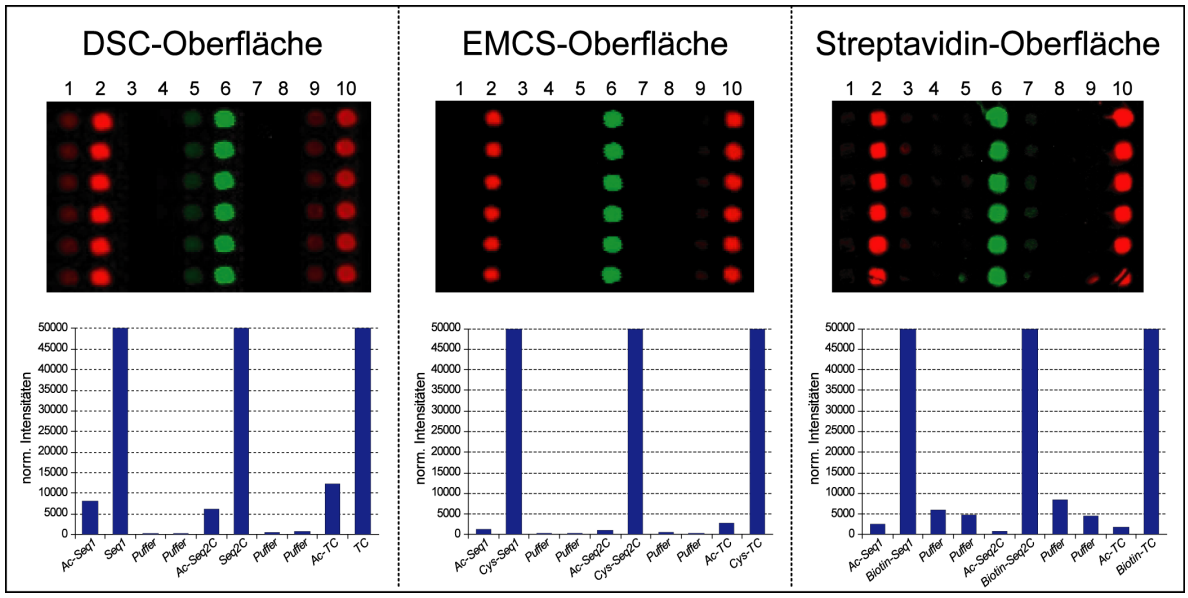

Abb. 37: Selektive Anbindung von PNAs mit unterschiedlichen N-Termini auf entsprechende Oberflächen. Von links nach rechts sind die hybridisierten DSC-, EMCS- und Streptavidin-Oberflächen mit den dazugehörigen gemittelten und skalierten Intensitätswerten gezeigt. Auf den Oberflächen wurden folgende PNAs in jeweils sechs Replikaten gespottet: (1) *Ac-Seq1-PNA*, (2) *Seq1-PNA*, (3; 4) Puffer, (5) *Ac-Seq2C-PNA*, (6) *Seq2C-PNA*, (7; 8) Puffer, (9) *Ac-TC-PNA* und (10) *TC-PNA*. Rote Signale = Cy5-Signale und grüne Signale = Cy3-Signale.

Das Spotten fand von links nach rechts statt, wobei die Pins nach jeder gespotteten Reihe mehrfach gewaschen wurden. Trotz dieser Waschzyklen, waren die Signalintensitäten der Puffer-Spots bei den Streptavidin-Oberflächen sehr hoch, was durch eine Kontamination mit den zuvor gespotteten biotinylierten PNAs, die nicht vollständig von den Pins gewaschen wurden, zu erklären ist. Diese Kontamination wird zusätzlich durch die Abnahme der Signalintensität des jeweiligen zweiten Puffer-Spots, nach erneutem Waschen der Pins, verdeutlicht. Der Aufreinigungseffekt bei der selektiven Anbindung ist bei den EMCS- und Streptavidin-Oberflächen größer als bei den DSC-Oberflächen. Ein Vorteil der EMCS- und DSC-Oberflächen gegenüber den mit Streptavidin beschichteten Oberflächen

ist das nicht vorhandene Verschleppen der PNAs durch die Pins und die bessere Handhabbarkeit. Streptavidin-Oberflächen müssen im Gegensatz zu DSC- und EMCS-Oberflächen feucht gehalten werden, um die hohe Bindungsaffinität des Streptavidins zum Biotin zu gewährleisten.

Die Abspaltungsversuche mit anschließender massenspektrometrischer Analyse bestätigten die Hybridisierungsergebnisse. Nach dem Anbinden wurden die Moleküle mittels TFA-Lösung (DSC- und EMCS-Oberflächen mit Rink-Linkern) oder mittels ammoniakalischer Lösung (Streptavidin-Oberflächen) wieder von den Oberflächen abgespalten und im Massenspektrometer analysiert. Die so generierten Spektren wurden mit den Spektren der für das Anbinden verwendeten Ausgangslösungen verglichen. Es wurden absichtlich PNAs mit vielen Abbruchsequenzen für diese Versuche ausgesucht, um die Effizienz der selektiven Anbindung auch unter möglichst schlechten Bedingungen zu testen. In Abbildung 38 sind die Ergebnisse exemplarisch für die *Seq1-PNAs* dargestellt.

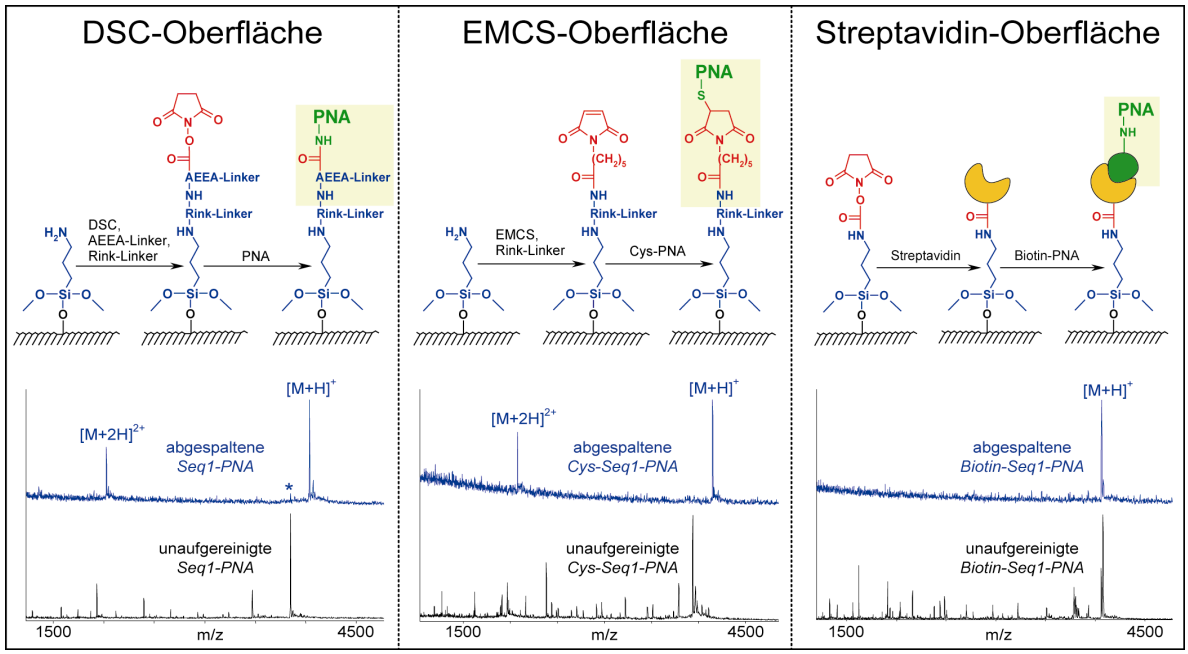

Abb. 38: Selektive Anbindung von PNAs mit unterschiedlichen N-Termini auf entsprechende Oberflächen. Von links nach rechts sind die DSC-, EMCS- und Streptavidin-Oberflächen mit den dazugehörigen MALDI-TOF-Massenspektren der Abspaltungsprodukte (blau) und der Syntheseprodukte (schwarz) gezeigt. Die Spektren der Abspaltungsexperimente sind hier exemplarisch für die *Seq1-PNAs* dargestellt. Gelb unterlegt sind die Produkte, die man durch das Abspalten von den entsprechenden Oberflächen erhält. * = nicht-kovalent angebundene *Seq1-PNA*.

Bei den DSC-Oberflächen ist im Spektrum der Abspaltung noch ein kleiner Peak der nicht angebundenen PNAs mit N-terminaler Aminogruppe zu sehen, der durch einen Asterisk markiert ist. Dieser Peak belegt, dass einige nicht-kovalent gebundene PNAs auf der Oberfläche haften blieben, welche mit den Waschschritten vor der Abspaltung nicht entfernt

werden konnten. Erst durch die saure Abspaltungslösung wurden sie mit den abgespaltenen PNAs von der Oberfläche gewaschen und anschließend im Massenspektrometer detektiert.
Die Spektren der Abspaltungsprodukte von den DSC- und den EMCS-Oberflächen weisen eine Massenverschiebung durch den AEEA-OH- bzw. die Reste des EMCS-Linkers auf, die bei der Abspaltung an den zuvor kovalent gebundenen PNAs verbleiben. Die Masse der *Seq1-PNA* (3824,7 Da) addiert zu der des vom Rink-Linker abgespaltenen AEEA-OH-Linkers (188,2 Da), ergibt eine Masse von genau 4022,9 Da. Diese Masse entspricht den beiden Peaks ($[M+H]^+$ und $[M+2H]^{2+}$), die bei der Analyse des Abspaltungsproduktes von der DSC-Oberfläche gefunden wurden. Die beiden Peaks haben ein Masse- zu Ladungsverhältnis (m/z) von 4022,9 Da ($[M+H]^+$) bzw. 2012,7 Da ($[M+2H]^{2+}$).
Gleiches trifft auch für die EMCS-Oberfläche zu, wo Peaks mit m/z-Verhältnissen von 4148,7 Da ($[M+H]^+$) bzw. 2075,4 Da ($[M+2H]^{2+}$) zu sehen sind. Diese entsprechen der Molekülmasse der *Cys-Seq1-PNA* (3937,9 Da) addiert zu der Masse des vom Rink-Linker abgespaltenen EMCS-Linker-Fragmentes (210,2 Da). Auch hier ist kein Peak mit der Masse einer angebundenen Abbruchsequenz zu sehen.
Im Massenspektrum der Abspaltungsprodukte von der Streptavidin-Oberfläche ist nur der $[M+H]^+$-Peak der *Biotin-Seq1-PNA* und kein weiterer Peak mit passendem m/z-Verhältniss einer kürzeren Abbruchsequenz zu finden.
Bei einem weiteren Versuch wurden zwei silanisierte Oberflächen mit Rink-Linker und AEEA-OH-Linker modifiziert. Nach der Aktivierung mit DSC wurde auf die eine Oberfläche PNA mit terminaler Aminogruppe (*Seq2C-PNA*) und auf die andere komplett acetylierte PNA (*Ac-Seq2C-PNA*) gegeben. Die angebundenen PNAs wurden nach einigen Waschschritten mit TFA-Lösung wieder von den Oberflächen abgespalten und im MALDI-TOF-Massenspektrometer analysiert.
Im Massenspektrum der abgespaltenen acetylierten PNA war auch nach mehrfachen Aufsummieren der Signale einzelner Laserimpulse kein Peak zu finden, so dass die acetylierten PNAs nicht – oder nur unterhalb der Nachweisgrenze der MALDI-TOF-Analyse, evtl. über die heterozyklischen Aminogruppen der Nukleobasen – angebunden haben. Beim Abspaltungsprodukt der zuvor angebundenen PNA mit terminaler Aminogruppe sind wieder zwei Peaks ($[M+H]^+$ und $[M+2H]^{2+}$) zu finden, welche der Masse der angebundenen PNA (3825,7 Da) plus dem Teil des AEEA-OH-Linkers (188,2 Da) und der gleichen, zweifach protonierten PNA entsprechen.

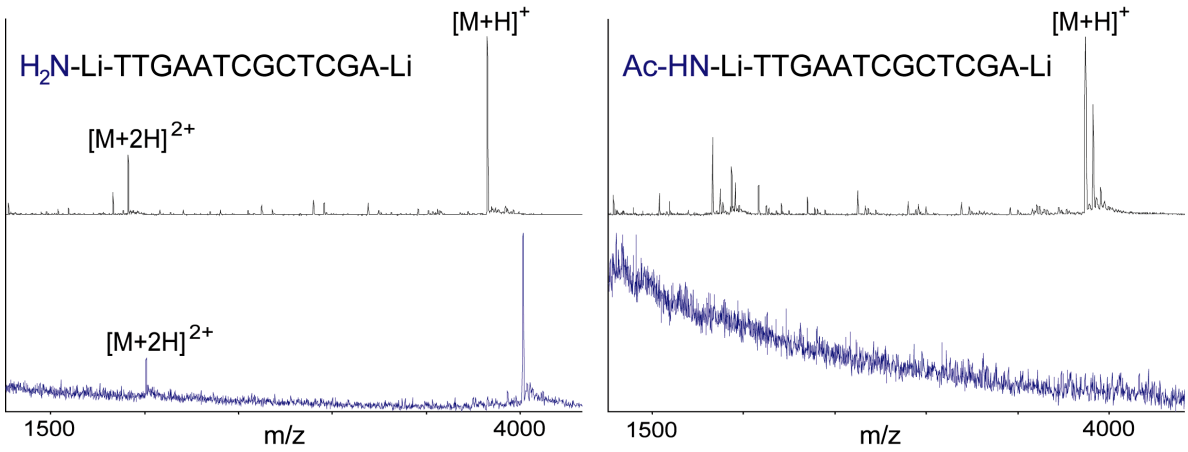

Abb. 39: Selektive Anbindung: Spektren der aufgetragenen PNA mit N-terminaler Aminogruppe und der vollständig acetylierten PNA mit den dazugehörigen Spektren der Abspaltungsprodukte. Links sind die Spektren der auf die Oberfläche aufgetragene *Seq2C-PNA* (schwarz) und das Spektrum der abgespaltenen *Seq2C-PNA* (blau) zu sehen. Rechts sind die entsprechenden Spektren der vollständig acetylierten *Ac-Seq2C-PNA* zu sehen. Ac = Acetylgruppe; Li = AEEA-OH-Linker.

3.5 Hybridisierungsversuche mit PNA-Microarrays

Nachdem die Oberflächen und Puffer für das Spotten von PNAs optimiert waren, mussten noch die Konzentrationen der zu spottenden PNAs, sowie die verwendeten Hybridisierungspuffer der DNA-Oligonukleotide angepasst werden. Hierzu wurden mehrfach Konzentrationsreihen von PNA-Molekülen mit unterschiedlichen N-Termini auf die entsprechende Oberflächen gespottet, mit komplementären DNA-Oligonukleotiden hybridisiert und die Signale ausgewertet. Es zeigte sich, dass der optimale Konzentrationsbereich der Spottinglösungen unaufgereinigter PNA-Moleküle für die DSC-Oberflächen zwischen 120 - 160 µM lag.

Für die EMCS-Oberflächen lag dieser Konzentrationsbereich etwas höher, zwischen 160 - 200 µM. Dieser höhere Wert kann an der Bildung von Disulfidbindungen zwischen den PNAs mit N-terminaler Thiolgruppe liegen, wodurch diese Moleküle nicht mehr für die Bindung an die EMCS-aktivierten Oberflächen zur Verfügung stehen. Es könnten aber auch die Succinimidylester auf der DSC-Oberfläche während und nach dem Auftragen der PNAs hydrolisieren, wodurch deren Konzentration im Vergleich zu den Maleinimid-Gruppen auf der EMCS-Oberfläche geringer würde. Die DSC-aktivierten Oberflächen wären somit eher abgesättigt als die EMCS-Oberflächen.

Die Streptavidin-Oberflächen zeigten bei Konzentrationen der biotinylierten PNAs zwischen 160 - 200 µM die besten Ergebnisse.

Bei den EMCS-Oberflächen war eine Abnahme der Signalintensitäten von den 200 µM zu den 300 µM PNA-Spots zu erkennen. Dieses kann zum einen daran liegen, dass die PNA-

Moleküle auf der Oberfläche zu dicht kovalent gebunden sind, so dass die Hybridisierung der komplementären DNA-Moleküle sterisch gehindert ist. Zum anderen kann es, wenn die Cy5-markierten DNA-Oligonukleotide zu dicht hybridisieren, zu Quenching-Effekten der Fluoreszenzmoleküle kommen. Diese äußern sich dann in einer geringeren Signalintensität.

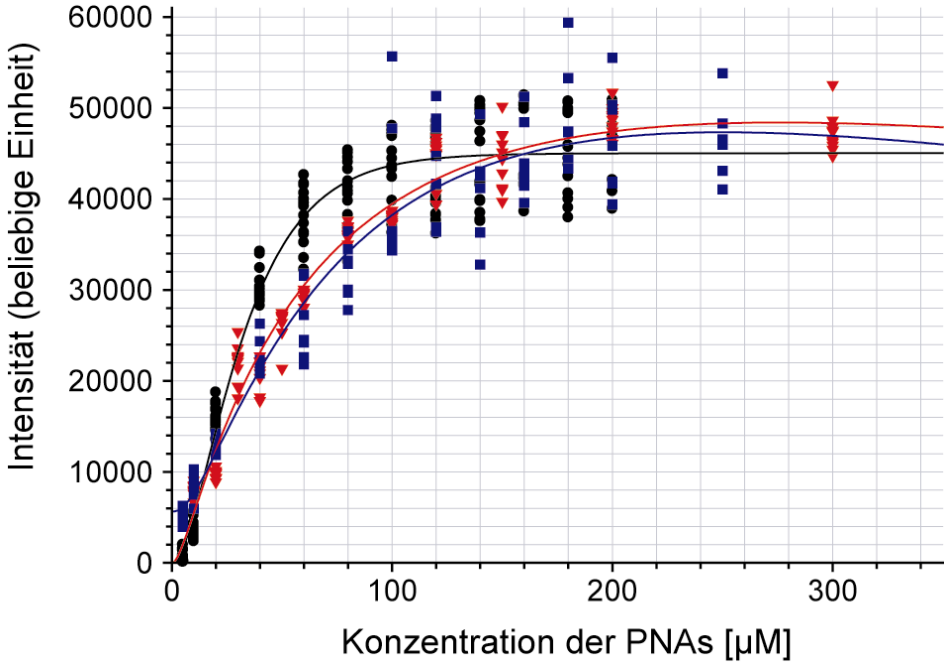

Abb. 40: Einfluss der PNA-Konzentrationen von Spotting-Lösungen auf die Hybridisierungsintensitäten. Nach dem Spotten wurden die PNA-Microarrays mit Cy5-markierten komplementären DNA-Oligonukleotiden hybridisiert und anschließend ausgewertet. Die PNAs wurden zuvor in Konzentrationen von 5 - 200 µM auf DSC-, 10 - 300 µM auf EMCS- und 5 - 250 µM auf Streptavidin-Oberflächen gespottet. Die einzelnen Punkte geben die Signalintensitäten (relative Bindungskapazität) jeweils eines hybridisierten Spots an (DSC = schwarz; EMCS = rot; Streptavidin = blau).

3.5.1 Selektivität der Hybridisierung auf PNA-Microarrays

Um die Hybridisierungsselektivität auf PNA-Microarrays zu testen wurden auf DSC-aktivierte APTES-Glasoberflächen vier PNA 13mere aufgetragen, die sich nur durch die Nukleobase in der mittleren Position unterschieden. Drei dieser PNA-Microarrays wurden mit komplementären DNA-Oligonukleotiden hybridisiert, welche ebenfalls unterschiedliche Basen in der mittleren Position enthielten. Der erste wurde mit einem Gemisch aus Cy3-markiertem DNA-Oligonukleotid *DNA-Seq2G-Cy3* und Cy5-markiertem DNA-Oligonukleotid *DNA-Seq2A-Cy5*, der zweite mit einem Gemisch aus *DNA-Seq2G-Cy3* und *DNA-Seq2C-Cy5* und der dritte mit einem Gemisch aus *DNA-Seq2G-Cy3* und *DNA-Seq2T-Cy5* hybridisiert. Hierfür wurden zuvor die theoretischen Schmelztemperaturen $T_{m_{pred}}$ der PNA-Moleküle auf dem Microarray berechnet und anschließend eine leicht niedrigere

Temperatur von 38°C für die Hybridisierungen verwendet. Die berechneten $T_{m_{pred}}$-Werte der verwendeten PNAs sind folgende: *Seq2A-PNA*: 41,0 °C, *Seq2C-PNA*: 43,2 °C, *Seq2G-PNA*: 44,3 °C und *Seq2T-PNA*: 39,8 °C. Die $T_{m_{nnDNA}}$-Werte für die entsprechenden DNA-Oligonukleotide, berechnet nach der „nearest neighbour method", sind durchschnittlich um 7,6 °C geringer: *Seq2A-DNA*: 32 °C, *Seq2C-DNA*: 37 °C, *Seq2G-DNA*: 36 °C und für die *Seq2T-DNA*: 33 °C.

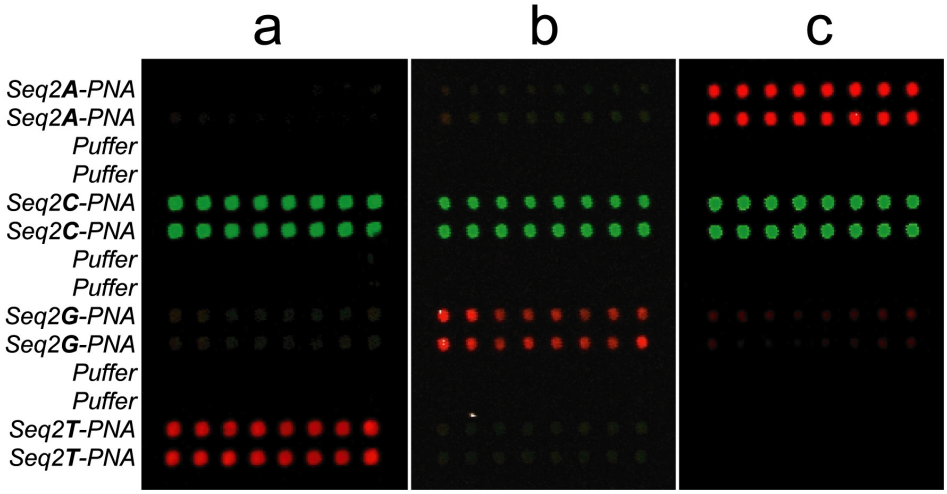

Abb. 41: Detektion von Einzelbasenfehlpaarungen. Das PNA 13mer *Seq2N-PNA*, mit variierenden Basen in der mittleren Position (*N* = *A*, *C*, *G* oder *T*), wurde in jeweils zwei Reihen, bestehend aus je 8 Replikaten, auf eine DSC-aktivierte Oberfläche gespottet. Der erste PNA-Microarray (a) wurde mit den zur *Seq2C*- und *Seq2T-PNA*, der zweite (b) mit den zur *Seq2C*- und *Seq2G-PNA* und der dritte (c) mit den zur *Seq2C*- und *Seq2A-PNA* komplementären DNA-Oligonukleotiden hybridisiert.

Die Intensitäten der einzelnen Spots wurden mit der Software GenePix™ ausgewertet. In Abbildung 42 sind die Mittelwerte der zusammengehörenden Spots dargestellt. Die höchsten Signale eines jeden Kanals (Cy3 und Cy5) wurden dabei zuvor auf eine Intensität von 20000 normiert und die restlichen Intensitätswerte desselben Kanals entsprechend mit skaliert.

Die Ergebnisse zeigen, dass es mit PNA-Microarrays möglich ist, Einzelbasenmutationen einer DNA-Sequenz nachzuweisen. Der minimale Wert von 6,5 für die Diskriminierung durch Hybridisierung ergab sich für den Mittelwert der *Seq2A-PNA*-Signale im Verhältnis zum Signal-Mittelwert der unspezifisch hybridisierten *Seq2G-PNA*-Spots auf dem dritten Microarray (Abb. 41c). Der Maximalwert von 46,5 wurde für das Verhältnis der gemittelten Intensitäten der *Seq2C-PNA*-Signale im Verhältnis zu den maximalen Cy3-Signalintensitäten der *Seq2G-PNA*-Spots ebenfalls auf dem dritten Microarray (Abb. 41c) ermittelt. Das durchschnittliche Verhältnis der spezifischen Hybridisierungssignale zu den

Signalen der unspezifischen Hybridisierungen lag bei einem Wert von 17.

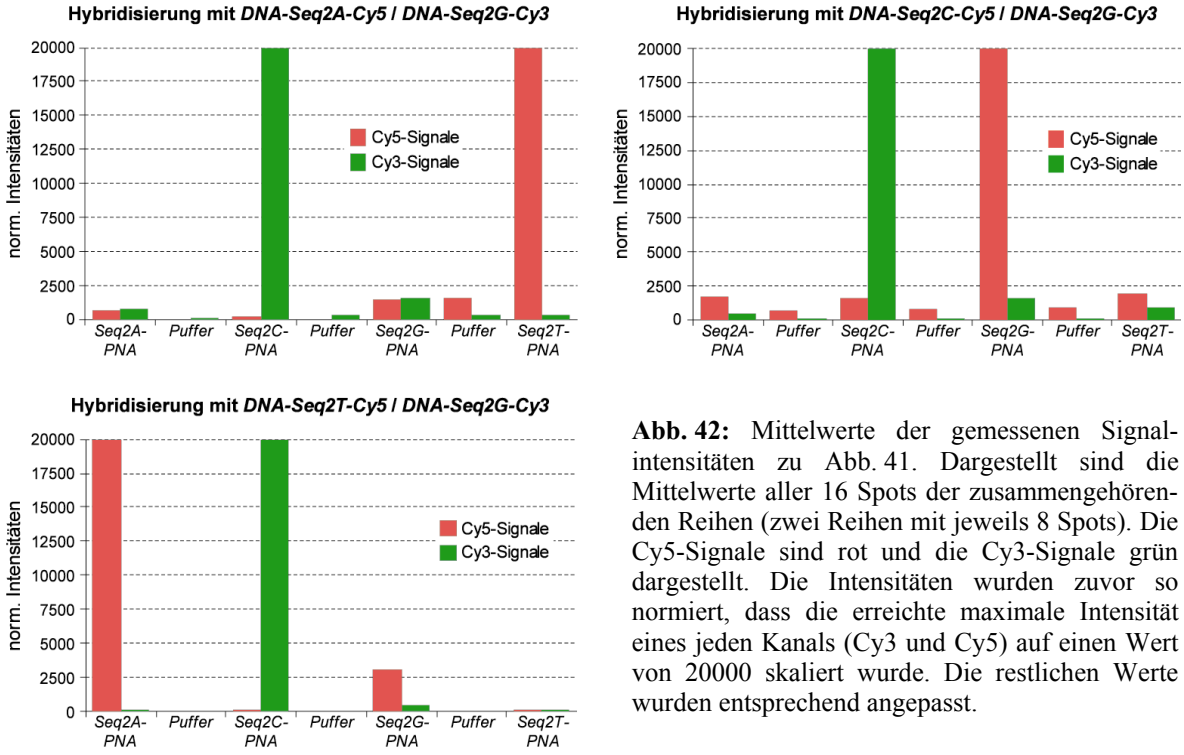

Abb. 42: Mittelwerte der gemessenen Signalintensitäten zu Abb. 41. Dargestellt sind die Mittelwerte aller 16 Spots der zusammengehörenden Reihen (zwei Reihen mit jeweils 8 Spots). Die Cy5-Signale sind rot und die Cy3-Signale grün dargestellt. Die Intensitäten wurden zuvor so normiert, dass die erreichte maximale Intensität eines jeden Kanals (Cy3 und Cy5) auf einen Wert von 20000 skaliert wurde. Die restlichen Werte wurden entsprechend angepasst.

Es fällt auf, das bei der *Seq2G-PNA* die Signale der unspezifischen Hybridisierungen jeweils mit am größten sind.

3.5.2 Wiederverwendbarkeit der PNA-Microarrays

Es wurde gezeigt, dass PNA-Microarrays mehrfach wiederverwendet werden können. Hierzu wurden die hybridisierten DNA-Moleküle von den PNAs auf der Oberfläche durch Waschen („Strippen“) in kochendem 0,1× SSarc-Puffer und Wasser wieder entfernt. Anschließend konnten die PNA-Microarrays für weitere Hybridisierungen verwendet werden. Bei einem Versuch wurden die zuvor unter 3.5.1 verwendeten Microarrays jeweils 10 min abwechselnd in kochendem Puffer und Wasser gewaschen. Die hybridisierten DNA-Moleküle sollten so von den PNAs wieder gelöst und von der Oberfläche abgewaschen werden. Nach dem „Strippen“ wurden die Microarrays mit Stickstoff getrocknet und zur Kontrolle erneut mittels Fluoreszenzscanner analysiert.

Anschließend wurden die Microarrays wiederholt mit zwei komplementären DNA-Oligonukleotiden (*DNA-Seq2G-Cy3* und *DNA-Seq2C-Cy5*) hybridisiert und wieder eingescannt. Dieser Vorgang des „Strippens“ der PNA-Microarrays und der erneuten Hybridisierung mit den gleichen DNA-Oligonukleotiden wurde mehrfach wiederholt. Für die Fluoreszenz-Analyse nach jedem Schritt wurde dabei immer die gleichen Einstellungen (Höhen-

einstellung der Optik, Intensität des Lasers und Verstärkung des Photomultipliers) beibehalten. Ebenso wurde die Konzentration der DNA-Oligonukleotide in der verwendeten Hybridisierungslösung nicht verändert. Die Ergebnisse zeigten, dass es möglich ist, PNA-Microarrays mehrfach zu verwenden, ohne einen messbaren Intensitätsverlust in Kauf nehmen zu müssen. Die Signale nach dem „Strippen“ liegen nur unwesentlich über den Signalintensitäten der benachbarten Puffer-Spots und haben nach dem Waschen nur ca. 1/100 der Intensität der hybridisierten Spots. Dieses Verhältnis änderte sich auch nach dem fünften Hybridisieren und „Strippen“ nicht.

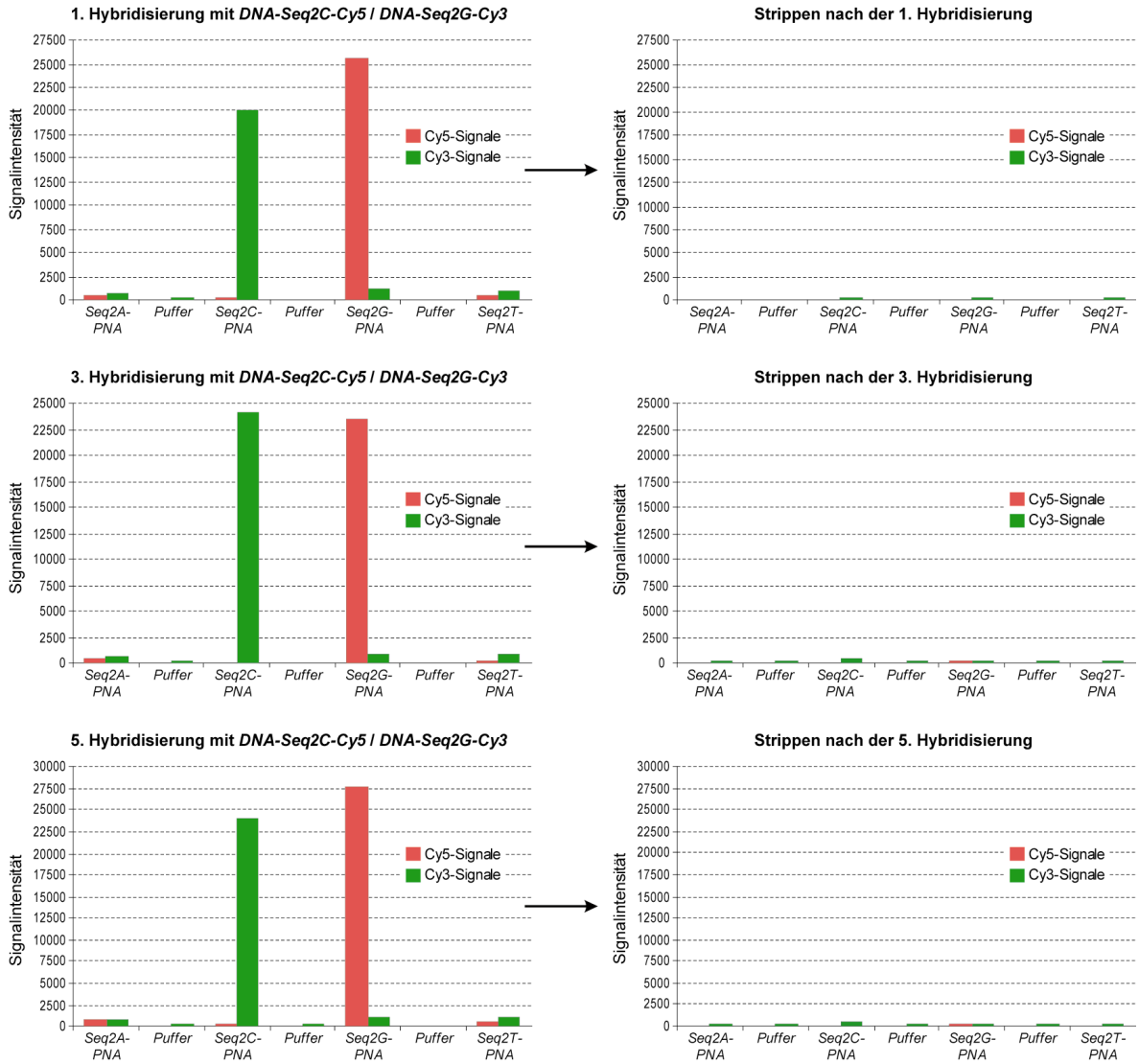

Abb. 43: „Strippen“ und Wiederverwendung von PNA-Microarrays. Von oben nach unten sind die Signalintensitäten der Hybridisierung 1, 3 und 5 mit den dazugehörigen Intensitäten der anschließend „gestrippten“ PNA-Microarrays gezeigt. Die Einstellungen des Fluoreszenzscanners wurden dabei beibehalten. Nach dem „Strippen“ wurden die Microarrays wiederholt mit den beiden DNA-Oligonukleotiden *DNA-Seq2G-Cy3* und *DNA-Seq2C-Cy5* hybridisiert. Es wurden die unter 3.5.1 beschriebenen PNA-Microarrays verwendet. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der zusammengehörenden PNA-Spots (zwei Reihen mit jeweils 8 Spots). Die Cy5-Signale sind rot und die Cy3-Signale grün dargestellt.

Die Analyse zeigte eindeutig, dass sowohl die Spezifität als auch die Signalintensitäten der Hybridisierungen auch bei der fünften Wiederholung nicht abnehmen. Die Verhältnisse der Signalintensitäten von Match- zu Mismatch-PNA-Spots auf dem Microarrays bleiben von der ersten bis zur fünften Hybridisierung nahezu konstant.

Zeigt man einen anderen Ausschnitt (Signalintensitäts-Skala von 0 bis 450) der gemittelten Signalintensitäten nach dem fünften „Strippen“, so sieht man sehr gut, dass die Signalintensitäten der zuvor hybridisierten Spots (*Seq2C-PNA* und *Seq2G-PNA*) über denen der Puffer-Spots oder der unspezifischen PNA-Spots (*Seq2A-PNA* und *Seq2T-PNA*) liegen (Abb. 44). Insgesamt macht das verbliebene durchschnittliche Cy3-Signal der *Seq2C-PNA*-Spots nach Abzug des Hintergrundsignals (gemittelte Puffer-Spots) noch 1,03 % der ursprünglichen Signalintensität der zuvor hybridisierten Spots aus. Bei den Cy5-Signalen der *Seq2G-PNA*-Spots liegt dieser Wert bei 0,47 %. Werte in dieser Größenordnung wurden nach jeder erneuten Hybridisierung und dem anschließenden „Strippen“ gemessen.

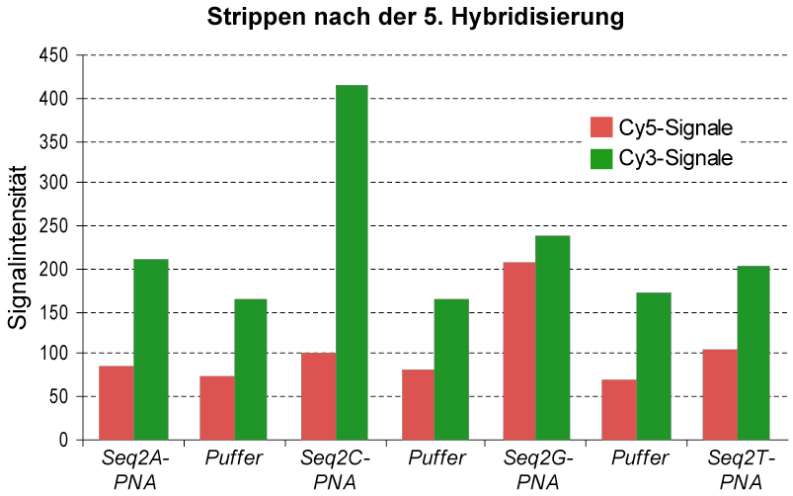

Abb. 44: Signalintensitäten nach dem fünften „Strippen“.

3.6 TOF-SIMS-Analyse von PNA-Microarrays

Mit der TOF-SIMS-Analyse von hybridisierten PNA-Microarrays ist es möglich, sensitiv Hybridisierungen von DNA-Molekülen an komplementäre PNAs zu detektieren. Hierzu müssen die DNA-Moleküle nicht zusätzlich radioaktiv oder mit Fluoreszenzmolekülen markiert werden.

3.6.1 DNA-spezifische Fragmentionen

Bei der Analyse von hybridisierten PNA-Microarrays mittels TOF-SIMS wurde festgestellt, dass neben den PO_2^-- und PO_3^--Signalen zusätzlich DNA-spezifische Peaks bei den

m/z-Verhältnissen von 159 Da und 177 Da im Massenspektrum zu sehen waren. Besonders interessant war diese Feststellung, da die Intensität des Hintergrunds für diese beiden Signale geringer war als bei den PO_2^-- und PO_3^--Signalen. Die beiden m/z-Verhältnisse entsprechen den berechneten Massen für $HP_2O_6^-$ (158,95 Da) und $H_3P_2O_7^-$ (176,97 Da).
Es fällt zusätzlich auf, dass die PO_2^--Signale besonders für geringe Konzentrationen sehr stark sind und mit zunehmender Konzentration der gespotteten PNAs abnehmen, während für alle anderen Phosphat-spezifischen Peaks die Signalintensitäten entsprechend der gespotteten Konzentrationsreihe zunehmen. Dieses kann besonders für die Analyse von geringen Konzentrationen der hybridisierten DNA-Moleküle von Interesse sein.

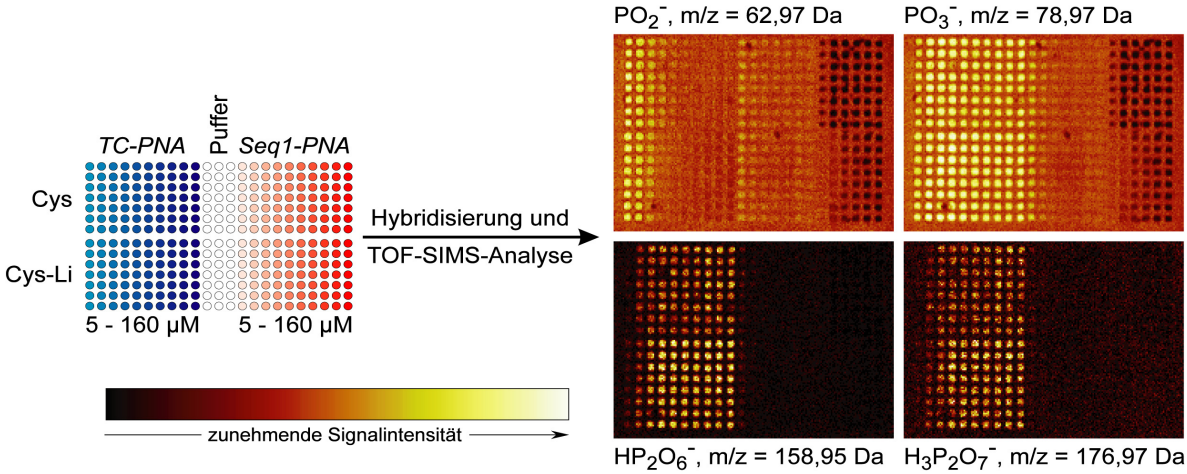

Abb. 45: TOF-SIMS-Analyse eines hybridisierten PNA-Microarrays. C*ys-(Li)-TC*- und C*ys-(Li)-Seq1-PNAs* wurden in Konzentrationsreihen von 5 - 160 µM (5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 und 160 µM) auf eine EMCS-aktivierte APTES-Oberfläche gespottet, anschließend mit dem zur C*ys-(Li)-TC-PNA* komplementären DNA-Oligonukleotid (*DNA-TC_long*) hybridisiert und im TOF-SIMS analysiert. Für den unteren Block (Cys-Li) wurden PNAs mit einem zusätzlichen AEEA-OH-Linker (Li) synthetisiert und anschließend gespottet. Cys = Cystein; Li = AEEA-OH-Linker.

Es wurde gezeigt, dass vier unterschiedliche Phosphat-spezifische Signale im TOF-SIMS zur Analyse von hybridisierter DNA bzw. RNA auf PNA-Microarrays verwendet werden können.

3.6.2 Unterschiedliche Primärionen

In TOF-SIMS-Geräten ist es möglich, unterschiedliche Ionenquellen zu verwenden. Dabei wird unter anderem die Auflösung der 2D-Oberflächenanalyse eines PNA-Microarrays durch den Durchmesser des verwendeten Primärionenstrahls direkt beeinflusst. Zusätzlich wird durch die Energien der Primärionen auch die Art und die Anzahl der Sekundärionen entscheidend mit beeinflusst.
Der Vergleich von Ar^+, Xe^{2+} und Au_3^+ als Primärionen zeigte, dass besonders bei den Gold-

Clustern die Ausbeute der Sekundärionen um ein Vielfaches ($Au_3^+/Ar^+ \approx 45$; $Au_3^+/Xe^{2+} \approx 8{,}5$) zunimmt. In Abbildung 46 sind die Intensitäten der gebildeten Sekundärionen beim Beschuss mit unterschiedlichen Primärionen dargestellt. Die zugehörigen Signal- zu Hintergrund-Verhältnisse sind zusätzlich angegeben und unterscheiden sich zwischen den Xe^{2+}- und Au_3^+-Primärionen nicht wesentlich, sind aber bei den Ar^+-Ionen deutlich schlechter.

Der Durchmesser des Gold-Cluster-Ionenstrahls, der aus einer Flüssigmetall-Ionenquelle erzeugt wird, ist deutlich kleiner als ein Ionenstrahl aus Gasionenquellen (Xe^{2+}- und Ar^+-Ionen). Somit ist bei der Verwendung der Gold-Clustern auch eine höhere Auflösung bei der Analyse von PNA-Microarrays möglich. Bei den Flüssigmetall-Ionenquellen kann der Ionenstrahldurchmesser kleiner als 1 µm sein, während er bei Gasionenquellen (Ar^+ und Xe^{2+}) im Bereich von 50 µm und größer liegt. Flüssigmetall-Ionenquellen sind somit auch für die Analyse von Microarrays mit Spotdurchmessern von wenigen µm geeignet, während Gasionenquellen hier keine ausreichende Auflösung mehr erzielen.

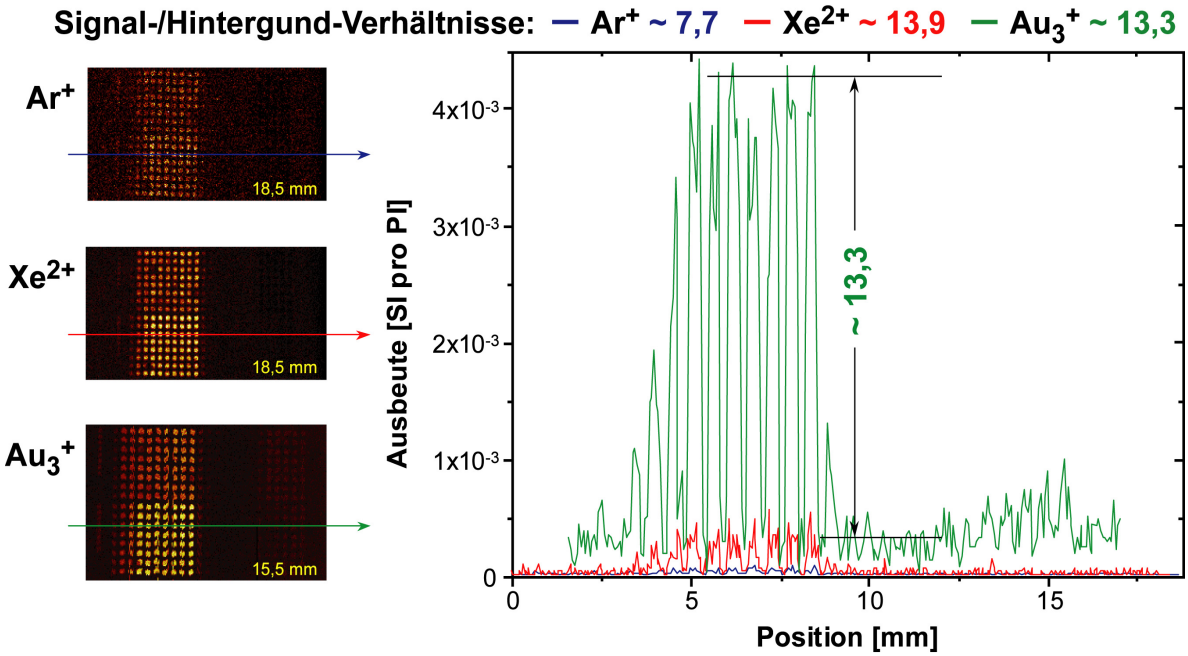

Abb. 46: Vergleich von TOF-SIMS-Primärionen. Die Auswertungen zu unterschiedlichen Primärionen wurden anhand der in Abb. 45 gezeigten PNA-Microarrays gemacht. Dargestellt sind die Ergebnisse für einen „Line-Scan“ über die 3. Reihe der Cys-Li-PNAs. Die Ausbeute der Sekundärionen und die dazugehörigen Signal- zu Hintergrund-Verhältnisse sind angegeben (Ar^+ = blau, Xe^{2+} = rot und Au_3^+ = grün). SI = Sekundärionen; PI = Primärionen.

3.6.3 Nachweisempfindlichkeit von TOF-SIMS

Nimmt man die PO_3^--Signale, so lassen sich ohne Probleme DNA-Mengen im Bereich von 12 fmol noch nachweisen. Die Empfindlichkeit der TOF-SIMS-Analyse kann jedoch durch das Addieren von PO_2^--, $HP_2O_6^-$- und $H_3P_2O_7^-$-Signalen noch weiter erhöht werden. Vor allem bei den PO_2^--Ionen ist das Detektionslimit hier noch nicht ausgereizt.

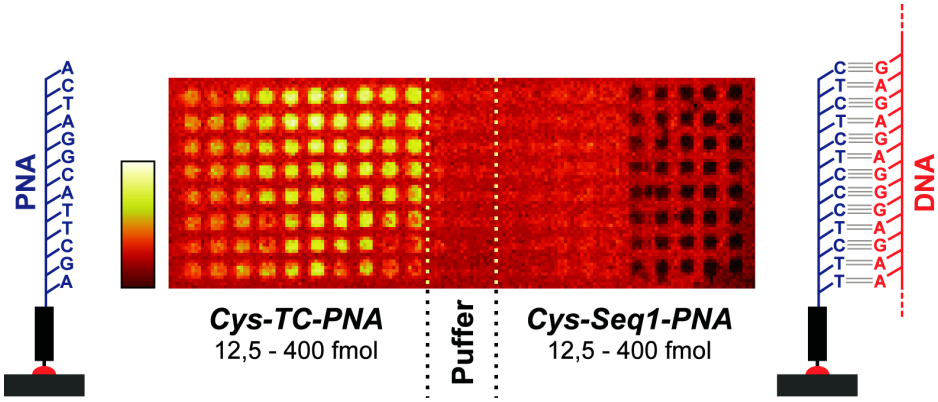

Abb. 47: Mit der TOF-SIMS-Analyse lassen sich Phosphat-spezifische Signale auf PNA-Spots von wenigen fmol anhand der PO_3^--Signale noch nachweisen.

Bei PNA-Spots mit hohen Konzentrationen (≥ 200 fmol), die nicht mit einem komplementären DNA-Oligonukleotid (*DNA-TC_long*) hybridisiert sind, sinken die Signalintensitäten noch deutlich unter die durchschnittliche Signalintensität des Hintergrunds. Dieses mach sich durch schwarze Spots in den Abbildungen 45 und 47 bemerkbar. Wahrscheinlich werden in diesem Konzentrationsbereich die Phosphat-Verunreinigungen des Hintergrunds durch die PNA-Moleküle abgeschirmt. Da bei der statischen TOF-SIMS-Analyse immer nur ein sehr kleiner Prozentsatz der obersten Monolage an Molekülen analysiert wird, werden die unter den PNAs liegenden Phopsphate nicht im Massenspektrometer detektiert. Das Ergebnis sind schwarze Spots.

3.6.4 Nachweis einer selektiven Hybridisierung mittels TOF-SIMS

Für einen Vergleich der TOF-SIMS-Analyse mit der etablierten Fluoreszenzanalyse wurden vier unterschiedliche PNA-Sequenzen auf aktivierte EMCS-Oberflächen gespottet. Hierzu wurden die SMP3-Pins, welche einen Spotdurchmesser von ca. 100 µm erzeugen, verwendet. Eine Reihe bestand aus jeweils 10 Replikaten. Die einzelnen Reihen wurden durch zwei Reihen, in denen nur Puffer gespottet wurde, voneinander getrennt. Der eine PNA-Microarray wurde mit einem Gemisch aus drei Cy3- oder Cy5-markierten DNA-Oligonukleotiden (*DNA-Seq1-Cy5*, *DNA-Seq2G-Cy3* und *DNA-TC-Cy5*) hybridisiert,

während der andere mit einem Gemisch aus drei nicht markierten DNA-Oligonukleotiden (*DNA-Seq1_long*, *DNA-Seq2_long* und *DNA-TC_long*) hybridisiert wurde. Die drei DNA-Oligonukleotide waren dabei zu drei der vier PNA-Sequenzen auf dem Microarray komplementär. Auf dem einen PNA-Microarray wurden die Signale mittels Fluoreszenzscanner detektiert. Der mit DNA-Oligonukleotiden ohne zusätzliche Markierung hybridisierte PNA-Microarray wurde mittels TOF-SIMS analysiert. Beide Experimente lieferten vergleichbare Ergebnisse. Es wurden nur Signale für die PNA-Spots, welche komplementär zu den eingesetzten DNA-Molekülen waren, detektiert. Die Spot-Reihe der *Cys-Seq3-PNA*, zu der keines der hybridisierten DNA-Moleküle komplementär war, lieferte auf beiden PNA-Microarrays keine Signale.

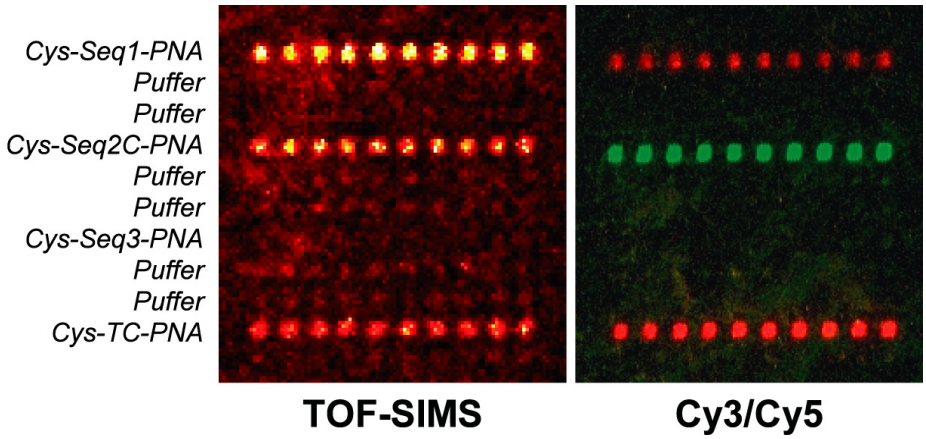

Abb. 48: Analyse von hybridisierten PNA-Microarrays. Dargestellt sind die PO_3^--Signale der TOF-SIMS-Analyse sowie die Cy3- (grün) und Cy5-Signale (rot) der Fluoreszenz-Analyse. Zur *Cys-Seq3-PNA* war keines der hybridisierten DNA-Oligonukleotide komplementär.

4 Diskussion

Die Microarray-Technologie hat sich in den letzten Jahren dank moderner Technik enorm weiterentwickelt (Stears et al., 2003). Der Entwicklungssprung von den Makroarrays auf Membranen zu den Microarrays auf Glas-, Kunststoff- oder Silizium-Oberflächen mit Spotdurchmessern von wenigen µm ermöglicht heute die parallele Analyse tausender Gene, ohne dass große Probenmengen eingesetzt werden müssen. Für die Analyse reichen oft wenige ng der Probenmoleküle, die vor der Hybridisierung gewöhnlich amplifiziert und dabei mit Fluoreszenzmolekülen markiert werden, aus. Neben der Detektion von Fluoreszenzsignalen auf hybridisierten Microarrays gibt es inzwischen mehrere Ansätze zur markierungsfreien Detektion der Probenmoleküle. Die markierungsfreie Detektion von DNA- oder RNA-Proben kann bei einer weiteren Minaturisierung der Technologie sowie bei ausreichender Sensitivität entscheidend sein, vor allem wenn die Amplifikation der Probenmoleküle überflüssig wird. Ein Amplifikations- und / oder Markierungsschritt bedeutet immer zusätzlichen Arbeitsaufwand, Fehlerquellen und Kosten. Technologien, die eine markierungsfreie Detektion von hybridisierten DNA-Molekülen ermöglichen, sind optische, elektronische und massenspektrometrische Methoden. Zu den optischen Systemen gehört unter anderem die SPR-Technologie (Surface Plasmon Resonance) (Burgener et al., 2000; Feriotto et al., 2001). Elektronisch kann man die negativ geladenen DNA- oder RNA-Moleküle auf Feld-Effekt-Sensoren nachweisen, z.B. mit EIS (Electrolyte-Insulator-Silicon) Strukturen (Fritz et al., 2002) oder mit FETs (Feld Effekt Transistoren) (Uslu et al., 2004). Massenspektrometrisch können DNAs oder RNAs anhand von Phosphat-spezifischen Peaks mittels TOF-SIMS nachgewiesen werden (Arlinghaus et al., 1997; Brandt et al., 2003).

Für einige dieser Nachweismethoden kann es von Vorteil sein, PNA-Moleküle als Sonden auf den Microarrays einzusetzen. PNAs besitzen kein Phosphatrückgrat und sind als Moleküle über einen großen pH-Bereich vollkommen ungeladen. Diese beiden Tatsachen und die hervorragenden Hybridisierungseigenschaften mit DNA / RNA machen sie für die erwähnten Detektionsmethoden interessant. Für PNA-Microarrays werden im allgemeinen nur minimale Mengen der aufzubringenden PNA-Sonden im Bereich von wenigen pmol - nmol benötigt. Bei den verwendeten Kontaktspottern, in denen standardmäßig 384er Platten für das Spotten verwendet werden, müssen die einzelnen „wells“ der Platten mit etwa 4 - 10 µl der zu spottenden PNA-Lösungen gefüllt sein, um die Pins ausreichend mit den jeweiligen Lösungen zu füllen. Beim Verwenden der SMP3B-Pins werden ca. 0,6 µl und bei den SMP3-Pins ca. 0,25 µl pro Molekül-Lösung zum Spotten aufgenommen.

Dieses Volumen reicht für die Abgabe von etwa 500 Spots (SMP3B-Pins) auf feste Oberflächen aus. Wie die Ergebnisse zeigen (siehe 3.5), sind selbst bei einer schlechten Synthese der PNAs in 96er Platten, Lösungen von maximal 200 - 300 µM zum Spotten ausreichend, um bei den anschließenden Hybridisierungen optimale Signalintensitäten zu erhalten. In 5 µl dieser Lösung, die für das Spotten in die 384er Platte gegeben werden, sind insgesamt nur 1 - 1,5 nmol jeder zuvor synthetisierten PNA enthalten. PNA-Mengen von etwa 100 - 200 nmol, die bei einer Synthese in 96er Platten an 2 mg „Rink resin LS“ erreicht wurden, sind damit für die Produktion von PNA-Microarrays noch hundertfach überdimensioniert. Um eine weitere Reduzierung der synthetisierten PNA-Menge zu erreichen, müsste ein Roboter mit einem reproduzierbaren Abgabevolumen im Bereich von 1 - 2 µl verwendet werden und gleichzeitig das Design der Synthese-Platten angepasst werden. Der gesamte Prozess könnte dann für Harzmengen von 0,2 mg optimiert und somit um den Faktor 10 verringert werden. Dieses würde die Kosten der Synthese weiter senken, zum Spotten tausender Microarrays aber noch ausreichen.

PNAs können jedoch auch für FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridisation) (Rigby et al., 2002; Larsen et al., 2003), die Aufreinigung von RNA-Molekülen (Chandler & Jarrell, 2003) oder als „PNA-opener“ (Kuhn et al., 2003; Demidov & Frank-Kamenetskii, 2002) verwendet werden. Für diese Anwendungen werden teilweise größere Mengen der PNAs benötigt, die mit der optimierten Synthese in 96er Platten einfach und kostengünstig hergestellt werden können.

In Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass es möglich ist, PNAs schnell und parallel im kostengünstigen Maßstab in 96er oder 384er Platten zu synthetisieren. Weiterhin wurde gezeigt, dass es möglich ist, die PNAs direkt nach der Synthese an entsprechend aktivierte Oberflächen zu binden. Durch das selektive Anbinden der PNAs mit funktioneller Gruppe am N-Terminus konnte so die zeit- und kostenintensive Aufreinigung der PNAs, z.B. durch HPLC, nach der Synthese umgangen werden.

4.1 Synthese von PNA-Molekülen

Die Synthese von PNAs oder Peptiden in 96er oder 384er Multiwell-Platten ist besonders aufgrund der fehlenden Durchmischung der Reaktions- und Waschlösungen mit den Harzkügelchen schwieriger als in entsprechenden Syntheseautomaten, die ein Mischen erlauben. Zudem ist es mit Standard-Syntheseautomaten gewöhnlich nur möglich, eine oder wenige PNAs parallel herzustellen.

Aufgrund der fehlenden Durchmischung in den verwendeten Syntheseplatten werden die

aktivierten Monomere während der Reaktionszeit nur durch Diffusion an die Oberfläche der Harzkügelchen transportiert. Um den fehlenden konvektiven Einfluss auszugleichen, wurden die Kopplungszeiten erhöht und es wurde zusätzlich eine zweifache Kopplung jedes Monomers durchgeführt. Entscheidend für die Qualität der PNA-Synthese ist neben der doppelten Kopplung auch die Anzahl der Waschschritte, mit denen die Reaktionslösungen wieder vom Harz entfernt werden. Als die Anzahl, besonders nach dem Entschützen und der Acetylierung, von einem auf fünf bis sechs Waschschritte erhöht wurde, stieg die Qualität der PNA-Synthese deutlich. Durch das gründliche Waschen werden alle zuvor abgespaltenen Fmoc-Schutzgruppen, die Acetylierungsreagenzien (Essigsäureanhydrid und 2,6-Lutidin) und die Kopplungsreagenzien (HATU, DIPEA und nicht gekoppelte Monomere) nach den entsprechenden Schritten eines Synthesezyklus entfernt, so können diese Moleküle die folgenden Reaktionen nicht mehr stören. An den Harzen verbliebene Moleküle würden, selbst wenn sie nicht mehr reagieren könnten, die Diffusion der zugegebenen Reaktionspartner an die Harzkügelchen und damit die Reaktion selbst behindern.

Neben den Wasch- und Reaktionsbedingungen spielt vor allem die Anzahl der funktionellen Gruppen der Synthese-Harze (Beladungsgrad) eine entscheidende Rolle (Casale et al., 1999). Bei einem hohen Beladungsgrad (größer als ca. 0,5 mmol/g) erhöht sich der Anteil der Abbruchsequenzen deutlich. Ursache hierfür können Wechselwirkungen der verlängerten PNA-Moleküle untereinander sein. Je länger die synthetisierten PNA-Moleküle werden, desto stärker interagieren sie miteinander und lagern sich zusammen, wodurch die Kopplung der folgenden Monomere behindert wird. Besonders stark tritt die Aggregation bei PNAs mit vielen Purinen auf (Nulf et al., 2002). Folge hiervon ist die Zunahme der Abbruchsequenzen an den Harzkügelchen, die auch schon bei relativ kurzen PNA-Molekülen im Massenspektrum erkennbar ist. Verstärkt wird dieser Effekt sicherlich auch noch durch die fehlende Durchmischung der Harzkügelchen untereinander sowie in der jeweiligen Reaktionslösung. Für eine Festphasensynthese an Harzen sind somit besonders der Beladungsgrad und die Waschbedingungen entscheidende Parameter. Es wurden Harze mit niedrigem Beladungsgrad mit und ohne PEG-Linker zwischen dem Polystyrol-Grundgerüst und dem abspaltbaren Linker, an dem die PNA synthetisiert wird, verwendet. Es war jedoch hinsichtlich der Synthesequalität kein großer Unterschied zwischen den beiden Harz-Typen festzustellen. Auffallend ist aber, dass bei den Harzen mit PEG-Linker („NovaSyn® TG Sieber resin“ und „TentaGel®-S RAM Fmoc resin“) die Abbruchsequenzen bei den längeren PNAs tendenziell zunehmen. Beim „Rink resin LS“,

welches keinen PEG-Linker hat, ist diese Tendenz nicht zu erkennen. Generell sind Harze mit PEG-Linker für Batch-Synthesen und besonders für Durchfluss-Synthesen geeignet, da sie sehr gute Quelleigenschaften haben. Während die Polystyrol-Harze (1% quervernetztes 1,2-Divenylbenzol) ca. dreifach in DMF quellen, können die PEG-Harze wie TantaGel® (Bayer & Rapp, 1986) und PEG-PS (Barany et al., 1992) fünffach in DMF quellen. Dieser Vorteil scheint bei der PNA-Synthese in 96er Platten keine große Rolle zu spielen.
Nachdem die Synthese der PNAs für das „Rink resin LS“ optimiert wurde, konnten PNAs bis zum 20mer mit zwei zusätzlichen AEEA-OH-Linkern erfolgreich synthetisiert werden (siehe Abb. 25). Die Synthese von längeren PNAs wurde nicht getestet. Da PNAs bei zunehmender Länge zur Selbstaggregation neigen und kurze PNA-DNA-Duplexe schon relativ hohe T_m-Werte haben (15mer Duplexe T_m-Werte ca. 50 - 70°C), ist es auch nicht unbedingt notwendig längere PNAs zu synthetisieren. Aneinandergelagerte PNAs sind für komplementäre DNAs nicht mehr zugänglich, da die T_m-Werte von PNA:PNA-Duplexen höher sind als die von PNA:DNA-Duplexen (Wittung et al., 1994; Ray & Norden, 2000). Zudem reichen T_m-Werte von 50 - 70°C für viele Anwendungen wie z.B. die Detektion von Mutationen / SNPs mit Hilfe von PNA-Microarrays aus.

4.1.1 Synthese in 384er Platten und an 0,5 mg Harz

Es wurde gezeigt, dass der Wechsel von 96er Platten auf 384-„well“ Platten möglich ist. Das Volumen der Waschlösung musste hierbei wegen des geringeren Fassungsvermögens der einzelnen „wells“ von 80 µl auf 30 µl verringert werden. Trotz dieser Reduzierung wurde die Anzahl der Waschschritte pro Synthesezyklus beibehalten. Die Ergebnisse bestätigten, dass neben der Anzahl der Waschschritte auch die abgegebenen Volumina einen Einfluss auf die Qualität der Synthese haben. Im Gegensatz zur Synthese in den 96er Platten waren besonders bei längeren Sequenzen höhere Signale der Abbruchsequenzen in den MALDI-TOF-Spektren zu sehen. Durch eine Erhöhung der Anzahl der Waschschritte sollte es jedoch gelingen, die Qualität der Synthese in den verwendeten 384er Platten an die der 96er Platten anzupassen. Ebenso einfach sollte es möglich sein, 384er Platten mit einem größeren Fassungsvermögen und integrierter Fritte oder Membran zu konstruieren, so dass die Synthesebedingungen unverändert von den 96er Platten übernommen werden könnten. Mit Hilfe eines Roboters, der für jedes Monomer eine einzeln ansteuerbare Kanüle und einen größeren Kamm (mit z.B. 16 Kanülen) zum Verteilen von Lösungsmitteln hat, könnte zudem die Geschwindigkeit der Synthese noch weiter erhöht werden.
Eine Reduzierung der Harzmenge sowie der Kopplungsreagenzien (HATU, Monomere,

DIPEA und 2,6-Lutidin) auf ein Viertel war ebenfalls möglich. Die Qualität der Synthese, vor allem von längeren PNAs, war allerdings auch hier geringer als bei der Synthese an 2 mg Harz im größeren Maßstab. Dieses lag zum größten Teil daran, dass die Lösungen zum Koppeln stärker verdünnt eingesetzt wurden, da das verwendete Roboter-System lediglich in der Lage war, minimale Volumina von ca. 8 µl reproduzierbar pro „well" abzugeben. Die aktivierten Monomere lagen daher während der Kopplungszeit in geringerer Konzentration vor, wodurch die Diffusion der Moleküle zur Oberfläche der Harzkügelchen mit den funktionellen Aminogruppen eine noch größere Rolle spielte. Eine Verbesserung der Synthese an 0,5 mg Harz kann also durch das Erhöhen der Kopplungszeiten oder durch die Verwendung eines anderen Roboter-Systems mit der Möglichkeit, geringere Volumina zu verteilen, erreicht werden. Die zweite Variante ist hierbei die bessere, da das Erhöhen der Kopplungszeiten mit dem Faktor $2 \times PNA_{Länge}$ in die gesamte Synthesezeit eingeht. Bei einer Verlängerung jedes Kopplungsschrittes um 5 min wären dies bei einem PNA 15mer zusätzliche 150 min (ca. 17%) für die komplette Synthese. Optimal für die schnelle und kostengünstige Synthese von PNAs und / oder Peptiden wäre eine 384er Platte mit spitz zulaufenden „wells", die jeweils ein Fassungsvermögen von mindestens 100 µl und eine integrierte Fritte haben. Bei einem Roboter, der reproduzierbar Volumina von 1 - 2 µl abgeben könnte, wäre hiermit eine Synthese an 0,25 - 0,5 mg Syntheseharz und damit in Mengen von von 15 - 50 nmol möglich. Dieses würde noch immer für die Produktion tausender PNA-Microarrays und für eine Vielzahl anderer Anwendungen ausreichen. Besonders interessant ist eine weitere Reduktion des Maßstabs, da die PNA-Monomere im Vergleich zu Phosphoramiditen, die für die Synthese von DNA-Oligonukleotiden verwendet werden, noch relativ teuer sind.

4.2 Synthese von Peptiden

Da die Aminosäure-Monomere wesentlich kleiner als die PNA-Monomere sind, stellen sterische Hinderungen bei der Peptidsynthese eine geringeres Problem als bei der PNA-Synthese dar. Zusätzlich aggregieren PNA-Moleküle leichter, wodurch die Synthese nochmals erschwert wird (Tackett et al, 1002; Braasch & Corey, 2001). Bei längeren Peptiden (> 30mer) wird die Kopplungen der folgenden Monomere ebenfalls immer schwieriger, da sich die Peptide verknäulen und aneinander lagern, wodurch die freie Aminogruppe am N-Terminus nicht mehr frei zugänglich ist.

Die Synthese von Peptiden wurde an einigen Beispielen in der 96er Multiwell-Platte getestet. Dabei wurde das günstigere Aktivierungsreagenz HBTU (Dourtoglou et al., 1978)

anstelle des für die PNA-Synthese verwendeten HATU (Carpino, 1993) eingesetzt. Zusätzlich wurden die Moläquivalente der Monomere, des HBTU, von DIPEA und 2,6-Lutidin in Bezug auf die Beladung des Harzes um den Faktor 1,66 auf fünf erhöht. Diese Erhöhung ist für die Gesamtkosten der Synthese weniger entscheidend als es bei den PNAs der Fall war, da Aminosäure-Monomere im Vergleich zu PNA-Monomeren um ein Vielfaches günstiger sind. Mit diesen leichten Modifikationen konnten Peptide bis zum 21mer (Abb. 29) synthetisiert werden, ohne dass deutlich sichtbare Peaks von Abbruchsequenzen in den MALDI-TOF-Spektren zu erkennen waren. Auch die Synthese von Peptiden mit geschützten Seitengruppen war am Harz mit Sieber-Linker möglich. In den MALDI-TOF-Analysen von Peptiden mit Asparagin (Asn), Glutamin (Gln) und Histidin (His) waren jedoch Peaks der vollständig geschützten Peptide mit einer fehlenden Trityl-Gruppe zu sehen. Dieses kann daran liegen, dass selbst unter den milden Abspaltungsbedingungen, die für das „NovaSyn® TG Sieber resin“ verwendet wurden, eine Trityl-Schutzgruppe vom Peptid abgespalten wird. Wahrscheinlich findet dieses am Histidin statt, da in den Massenspektren immer nur die Peaks der vollständig geschützten Peptide und solche, bei denen die Masse genau einer Trityl-Gruppe fehlte, zu sehen waren. Es handelte sich jedoch um Peptide, bei denen alle drei Aminosäuren vorhanden waren. Bei einer Abspaltung an den Carbamid-Gruppen von Asparagin oder Glutamin hätte man in den Massenspektren auch einen dritten Peak mit der Masses des vollständig geschützten Peptids weniger 484 Da (zwei Trityl-Gruppen) sehen müssen.

Eine weitere Möglichkeit stellt die Abspaltung einer Trityl-Gruppe während der massenspektrometrischen Analyse. Da die verwendeten MALDI-TOF-Matrices Säuren sind, könnte die Trityl-Gruppe auch auf dem Probenträger in der Matrix oder während der Desorption durch den Laserimpuls abgespalten werden.

Die Synthese von geschützten Peptiden ist besonders für das Anbinden auf Oberflächen interessant. Dabei werden die Peptide über ihren N-Terminus (z.B. Amino- oder Thiolgruppe) kovalent gebunden, wobei die geschützten Seitengruppen nicht reagieren können. Nach der Anbindung der Peptide werden die Schutzgruppen mit Trifluoressigsäure abgespalten, so dass die vollständig entschützten, am N-Terminus gebundenen Peptide auf der Oberfläche für weitere Anwendungen wie z.B. das Wirkstoffscreening, das Epitopmapping für Antikörperbindungstests (Tribbick, 2002) oder das Aufreinigen von Phagen aus einer „phage display“-Bibliothek (Bialek et al., 2003) vorliegen.

Zur Anbindung der geschützten Peptide kann dabei die Chemie, die schon für die Kopplung von PNAs verwendet wurde, eingesetzt werden (EMCS- oder DSC-aktivierte

Oberflächen). Wahrscheinlich spielt die fehlende Trityl-Gruppe am Histidin beim Anbindungsprozess keine Rolle, da bei der EMCS-aktivierten Oberfläche Thiolgruppen und bei den DSC-aktivierten Oberflächen bevorzugt primäre Amine gebunden werden. Auch die entschützten Seitengruppen von Asparagin und Glutamin sollten somit nicht stören, da Carbonsäureamide nicht mit Succinimidyl- und Maleinimid-Gruppen reagieren. Letzteres wurde auch durch das fehlende Anbinden von PNA-Abbruchsequenzen, deren C-Terminus ein Carbonsäureamid ist, bestätigt (siehe 3.4.4).

4.3 Aktivieren von Oberflächen zum Anbinden von PNAs

Zum Anbinden der PNAs an Oberflächen wurden drei unterschiedliche Strategien verfolgt. Die PNAs wurden entweder über ihren „normalen“ N-Terminus, die Aminogruppe, an DSC-aktivierte Oberflächen gebunden oder es wurde ein Cystein an den N-Terminus der PNAs synthetisiert, so dass diese modifizierten PNAs an Gold- oder Maleinimid-aktivierte Oberflächen gebunden werden konnten. Als dritte Möglichkeit wurde die sehr starke Bindung von Biotin an Streptavidin ausgenutzt, die mit einer Affinitätskonstante (K_A) von 10^{15} M^{-1} eine der stärksten nicht kovalenten Bindungen ist (Weber et al., 1989).

Für die Aktivierung von silanisierten Oberflächen mit dem homobifunktionellen Linker DSC wurden unterschiedliche Lösungsmittel getestet. Besonders wichtig ist hierbei, dass möglichst wasserfrei gearbeitet wird, da der Succinimidylester leicht hydrolisiert und so nicht mehr mit den Aminogruppen der silanisierten Oberfläche reagieren kann. Als Lösungsmittel wurden unter anderem Aceton, Acetonitril und DMSO getestet. Für das Aktivieren von APTES-Oberflächen wurden mit Aceton die besten Ergebnisse nach dem anschließenden Spotten von PNAs und der Hybridisierung mit komplementären Oligonukleotiden erreicht. Dieses kann unter Umständen an der Viskosität und / oder den hygroskopischen Eigenschaften der Lösungsmittel liegen. Bei einer hohen Viskosität diffundieren die DSC-Moleküle langsamer zur Oberfläche, wo sie an diese Binden. Durch das Erhöhen der Aktivierungszeit könnte dieser Nachteil kompensiert werden. Die hygroskopischen Eigenschaften spielen eine Rolle bei der Hydrolyse von Succinimidyl-Gruppen. Wenn die verwendeten Lösungsmittel leicht Wasser aus der Umgebung aufnehmen, können sowohl die angebundenen als auch die in Lösung befindlichen DSC-Moleküle leicht hydrolysieren, wodurch sie anschließend nicht mehr für das Anbinden an die Oberfläche oder die Reaktion mit primären Aminen zur Verfügung stehen.

Zum Funktionalisieren der APTES-Oberflächen mit Maleinimid-Gruppen für die Kopplung von PNAs mit N-terminaler Thiolgruppe wurde die Aktivierungslösung des heterobi-

funktionellen EMCS-Linkers in DMF hergestellt. EMCS hat eine Succinimidyl-Gruppe zum Anbinden an die Aminosilane auf der Oberfläche und eine Maleinimid-Gruppe für das spätere Anbinden von Molekülen mit Thiolgruppe. Da der Linker nicht besonders preiswert ist, wurde die Aktivierung der Oberflächen nicht in geschlossenen Gefäßen mit größeren Volumina wie bei der DSC-Aktivierung durchgeführt. Stattdessen wurde eine kleine Menge der Aktivierungslösung auf die Oberfläche gegeben und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Aceton konnte aufgrund der langen Aktivierungszeit von vier Stunden nicht verwendet werden, da es unter dem Deckgläschen verdampft wäre. Im Gegensatz zu Aceton (Verdunstungszahl = 2,1) hat DMF eine wesentlich höhere Verdunstungszahl von 60, so dass die Aktivierungslösung unter dem Deckgläschen innerhalb der vier Stunden nicht eintrocknete.

Das Streptavidin wurde kovalent über die im Protein vorkommenden primären Aminogruppen auf DSC-aktivierte APTES-Oberflächen gebunden. Hierbei besteht die Möglichkeit, dass zur Oberfläche liegende Bindungstellen des Streptavidins nicht mehr für biotinylierte PNAs zur Verfügung stehen. Da Streptavidin allerdings insgesamt vier Bindungsstellen für Biotin besitzt, sollten immer einige davon frei zugänglich sein, was die Versuche mit PNA-Microarrays bestätigten.

4.4 Spotten von PNAs auf aktivierte Oberflächen

Das Anbinden der PNAs auf die aktivierten Oberflächen erfolgte nach dem Kontaktspotverfahren mittels eines Spotters sowie eingeschlitzter Pins. Hierzu wurden 8 - 10 µl der zu spottenden PNA-Lösungen in 384er Platten gefüllt und diese zum Auftragen auf die modifizierten Oberflächen verwendet. Ein kritischer Faktor ist dabei das Verdampfen der Lösungen aus den „wells“ der Platte und aus den Pins während des Spottens – besonders bei Pins, die kleine Volumina aufnehmen, wie z.B. die SMP3 Pins mit einem Aufnahmevolumen von 0,25 µl. Verdampfen während des Spottens die Lösungen in den Platten oder Pins, so erhöht sich die Konzentration der PNA-Moleküle, was zum Aneinanderlagern der Moleküle und damit zum Ausfallen führen kann. Im schlimmsten Fall trocknen die Lösungen komplett ein. Um dieses zu verhindern, wird zum einen die Luftfeuchtigkeit im Spotter konstant hoch gehalten (je nach Puffer und Anwendung ca. 40 - 55%). Zum anderen kann dem Puffer Betain oder Glycerin beigesetzt werden, um Wasser besser zu binden (Diehl et al., 2001). Dieses hat zusätzlich den Vorteil, dass die Spots auf der Oberfläche nicht eintrocknen, so dass die Moleküle in der Lösung beweglich bleiben und ungebundene PNAs über einen längeren Zeitraum noch anbinden können. Der

Spottinglösung wurde für die Herstellung von PNA-Microarrays jedoch nur 1 M Betain zugesetzt, da die Hydroxylgruppen des Gylcerins mit den Succinimidylestern auf den DSC-aktivierten Oberflächen reagieren können. Da besonders gemischte PNA-Sequenzen mit einem hohen Anteil an Purinen als auch zunehmender Konzentration in Lösungen mit hohem Salzgehalt ausfielen, wurde schließlich Wasser mit 1 M Betain und angepasstem pH-Wert für das Spotten verwendet. So konnten PNAs nach der Synthese ohne Probleme noch in Konzentrationen von 300 µM gelöst werden.

Es wurde gezeigt, dass neben der Löslichkeit der PNA-Moleküle auch der pH-Wert der Lösungen beim Spotten auf aktivierte Oberflächen entscheidend ist. Succinimidylester reagieren normalerweise in pH-Bereichen von 7 - 9 am spezifischsten mit primären Aminen (Hermanson, 1996). Bei höheren pH-Werten binden vor allem die gemischten Sequenzen (PNAs mit Purinen und Pyrimidinen) nicht mehr so gut an. PNAs, die nur aus Pyrimidin-Basen bestehen, binden auch bei pH-Werten von bis zu 10 noch an. Der optimale pH-Bereich für das Spotten der PNAs in 1 M Betain-Lösungen liegt für die DSC-aktivierten Oberflächen zwischen 7 - 8. Auch das Hydrolisieren der Succinimidylester, die Konkurrenzreaktion zur Reaktion mit primären Aminen, spielt beim Spotten eine entscheidende Rolle. Mit zunehmendem pH-Wert hydrolisieren die Succinimidylester stärker (Morpurgo et al., 1999), was sich besonders bei einer geringen Konzentration an primären Aminen auswirkt. Ab einem pH-Wert von 10 nimmt die Hydrolyse der Succinimidylester auf der Oberfläche so stark zu, dass die Reaktion mit den primären Aminogruppen der PNAs (150 µM) im Vergleich zu geringeren pH-Werten abnimmt. Dieses äußert sich sich später in schwächeren Intensitäten der Hybridisierungssignale (Abb. 33).

Bei den EMCS-Oberflächen ist die Reaktion der Maleinimid-Gruppe mit Thiol-Gruppen im pH-Bereich von 6,5 - 7,5 etwa 1000fach bevorzugt gegenüber der Reaktion mit primären Aminen (Smyth et al., 1964). Bei einem höheren pH-Wert nimmt auch die Reaktion mit primären Aminen sowie die Hydrolyse der Maleinimid-Gruppe signifikant zu (Ishikava et al., 1983). Dieses bestätigte sich auch für das Spotten von PNAs mit N-terminalem Cystein, bei dem eine 1 M Betain-Lösung mit einem pH-Wert um 7 die besten Ergebnisse lieferte.

Das Spotten von PNAs auf Streptavidin-Oberflächen wurde nicht in Wasser mit zugesetztem Betain durchgeführt, da es zu schlechteren Ergebnissen führte als das Spotten in 1× BW-Puffer. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die verringerte Affinität des Biotins zum Streptavidin, wenn letzteres in reinem Wasser teilweise denaturiert und dadurch seine Konformation verändert.

Der Unterschied von BSIL- zu APTES-Oberflächen macht sich bei PNA-Microarray Anwendungen nicht bemerkbar. Obwohl die BSIL-Oberflächen pro Silan zwei reaktive Gruppen besitzen, wohingegen bei den APTES-Oberflächen nur eine Aminogruppe pro Silan zur Verfügung steht, spielt diese Tatsache bei der Anbindung der relativ großen PNA-Moleküle anscheinend keine Rolle. Eine Erklärung hierfür könnte der Mindestabstand sein, den zwei PNA-Moleküle aufgrund ihrer Größe haben. Wenn bei den APTES-Oberflächen schon mehr aktivierte Gruppen vorhanden sind, an die PNA-Moleküle durch ihre Ausdehnung bedingt binden können, dann können auch bei den BSIL-Oberflächen nicht mehr PNAs binden. Somit wäre es für relativ planare Oberflächen nicht entscheidend, ob diese mit noch mehr funktionellen Gruppen beladen wären, zumal auch noch Hybridisierungen an den gebundenen PNAs stattfinden müssen. Abhängig von der Größe der zu hybridisierenden DNAs, kann es bei zu dichter Beladung mit PNAs sogar zu sterisch bedingten Beeinträchtigungen kommen. Eine zweite Möglichkeit kann aber auch die schlechtere Reaktion von Succinimidylestern mit den Hydroxylgruppen der Bishydroxysilane (BSIL-Oberflächen) im Vergleich zu den Aminogruppen der Aminosilane (APTES) sein.

4.5 Effektivität der selektiven Anbindung von PNAs

Das Anbinden von PNA-Molekülen an unterschiedliche Oberflächen muss effektiv und vor allem selektiv sein, um eine Aufreinigung der PNAs nach der Synthese zu umgehen. Diese Voraussetzungen sollten mit den drei Kombinationen, die zur Anbindung von PNAs an aktivierte Oberflächen verwendet wurden, gegeben sein (Hermanson, 1996). Um eine Aussage über die Effizienz der Aufreinigung beim Spotten von PNAs machen zu können, wurden unaufgereinigte PNAs direkt nach der Synthese neben vollständig acetylierte PNAs gespottet. Die am N-Terminus acetylierten PNAs hatten dabei die gleichen Sequenzen wie die „normalen“ PNAs mit ihrem jeweiligen N-Terminus (Amino-, Thiol- oder Biotin-Gruppe). Dabei simulierten die vollständig acetylierten PNAs Abbruchsequenzen, die während der Synthese entstehen, wobei diese dort in sehr viel geringerer Konzentration vorliegen als die eingesetzten Kontroll-PNAs. Die so hergestellten PNA-Microarrays wurden anschließend mit komplementären DNA-Oligonukleotiden hybridisiert und die Ergebnisse ausgewertet.

Die Analysen zeigten, dass die besten Verhältnisse der Signalintensitäten von nicht aufgereinigter zu vollständig acetylierter PNA bei den EMCS- und Streptavidin-Oberflächen erreicht wurden. Hier lagen die Werte zwischen 20 - 60, während bei den DSC-Oberflächen nur Werte zwischen 4 - 10 erreicht wurden. Diese geringeren Werte liegen zum einen

daran, dass der N-Terminus der Kontroll-PNAs nicht quantitativ acetyliert werden konnte. Selbst bei verlängerten Reaktionszeiten, bei denen die PNAs nicht nur am N-Terminus acetyliert wurden, war immer noch ein kleiner Anteil der PNA mit Aminogruppe zu finden (Abb. 36). Dieser Anteil der nicht acetylierten PNA-Moleküle bindet an die DSC-aktivierten Oberflächen und führt somit zu einem höheren Signal bei der Hybridisierung mit DNA-Oligonukleotiden. Hätte man die PNAs noch weiter acetyliert, so wären möglicherweise nur wesentlich schlechtere Hybridisierungseigenschaften zu komplementären DNA-Oligonukleotiden die Folge gewesen. Das schlechtere Verhältnis der DSC-Oberflächen zu den EMCS- bzw. Streptavidin-Oberflächen lässt sich aber vielleicht auch durch ein Anbinden der PNAs über die Aminogruppen der Nukleobasen (Adenin, Cytosin und Guanin) erklären, welches zwar deutlich ineffizienter, aber dennoch denkbar wäre. Es konnte durch die Versuche, in denen zuvor angebundene PNAs von den DSC-Oberflächen wieder abgespalten wurden, jedoch nicht bestätigt werden, dass PNAs über andere als die N-terminalen Aminogruppen anbinden. Die Anbindung findet also entweder nicht statt oder liegt unterhalb der Nachweisgrenze der MALDI-TOF-Massenspektrometrie, die z.B. für Oligonukleotide im Bereich von wenigen fmol liegt (Roskey et al., 1996).

Die EMCS-Oberflächen in Kombination mit Cystein-PNAs lieferten wie die Streptavidin-Oberflächen in Kombination mit biotinylierten PNAs gute Ergebnisse bei der Aufreinigung durch selektives Anbinden. Bei den biotinylierten PNAs war besonders das Verschleppen der PNAs ein Problem, da die Biotin-PNAs während des Spottens an den Pins kleben blieben und sich auch durch 10faches Waschen in Wasser nicht entfernen ließen. Dieses Problem kann unter Umständen durch die Verwendung von Piezo-Spottern, welche die Oberfläche während des Spottens nicht berühren (Okamoto et al., 2000; Rose, 2000), umgangen werden. Denkbar wäre auch die Verwendung anderer Waschlösungen oder das Reinigen der Pins im Ultraschallbad, was jedoch mit dem verwendeten Spotter nicht möglich war. Generell sind die DSC- und EMCS-Oberflächen einfacher herzustellen und nach dem Anbinden der PNAs zudem stabiler als die Streptavidin-Oberflächen, welche z.B. nicht so einfach durch das „Strippen“ in kochendem Wasser nach einer Hybridisierung regeneriert und dann wiederverwendet werden können.

4.5.1 Konzentration der zu spottenden PNAs

Für das Spotten von nicht aufgereinigten PNAs wurde der Konzentrationsbereich ermittelt, in dem die Signale nach dem Spotten und dem anschließenden Hybridisieren mit komplementären DNAs maximal werden. Hierzu wurden für alle drei Oberflächen (DSC, EMCS

und Streptavidin) PNA 13mere, bei denen die Synthese unterdurchschnittlich gut war, in Konzentrationen von 5 - 300 µM gespottet. Nach dem Spotten wurden diese PNA-Microarrays mit komplementären, Cy5-markierten DNA 13meren hybridisiert und die Signale ausgewertet. Die Ergebnisse zeigten, dass PNA-Lösungen mit Konzentrationen im Bereich von 120 - 200 µM maximale Intensitäten lieferten, nachdem mit kurzen komplementären DNA-Oligonukleotiden hybridisiert wurde. Dieses traf für alle verwendeten Oberflächen zu. Abhängig von der Länge der hybridisierten DNA-Moleküle müssen hier gegebenenfalls Anpassungen vorgenommen werden, da es z.B. zu sterischen Einflüssen bei der Hybridisierung kommen kann, wenn die PNAs zu dicht auf der Oberfläche gebunden sind (Shchepinov et al., 1997; Southern et al., 1999).

Bei PNAs mit Cystein oder andern Thiolen am N-Terminus muss darauf geachtet werden, dass die PNAs gut gelagert werden, da hier besonders die Bildung von Disulfiden ein Problem darstellen kann. PNA-Disulfide (PNA-S-S-PNA) stehen für die Anbindung an Maleinimid-Gruppen auf den EMCS-aktivierten Oberflächen nicht mehr zur Verfügung.

Zusätzlich zu den gerade erwähnten Faktoren spielt auch die Ausbeute bei der PNA-Synthese eine wichtige Rolle. Bei der Synthese von relativ langen PNAs ist aufgrund der durchschnittlichen Kopplungsraten die Ausbeute des Endproduktes geringer, als es bei kürzeren PNAs der Fall ist:

	Ausbeute der PNA-Moleküle (Endprodukte)							
Kopplungsrate	**13mer**	**14mer**	**15mer**	**16mer**	**17mer**	**18mer**	**19mer**	**20mer**
0,99	0,88	0,87	0,86	0,85	0,84	0,83	0,83	0,82
0,98	0,77	0,75	0,74	0,72	0,71	0,70	0,68	0,67
0,97	0,67	0,65	0,63	0,61	0,60	0,58	0,56	0,54
0,96	0,59	0,56	0,54	0,52	0,50	0,48	0,46	0,44
0,95	0,51	0,49	0,46	0,44	0,42	0,40	0,38	0,36
0,94	0,45	0,42	0,40	0,37	0,35	0,33	0,31	0,29
0,93	0,39	0,36	0,34	0,31	0,29	0,27	0,25	0,23
0,92	0,34	0,31	0,29	0,26	0,24	0,22	0,21	0,19
0,91	0,29	0,27	0,24	0,22	0,20	0,18	0,17	0,15
0,90	0,25	0,23	0,21	0,19	0,17	0,15	0,14	0,12

Tab. 2: Tabelle mit den berechneten Ausbeuten der PNA-Endprodukte anhand gegebener durchschnittlicher Kopplungsraten (in %).

Die Konzentrationen der PNA-Lösungen müssen bei längeren PNAs zum Spotten unter Umständen leicht erhöht werden. Die Kopplungsraten eines Zyklus der optimierten Synthese an 2 mg Rink-Harz wurden nur vereinzelt anhand der abgespaltenen Fmoc-Gruppen (Dibenzofulven-Piperidin-Addukte) bestimmt (Fields & Noble, 1990). Sie lagen abhängig von der synthetisierten Sequenz und Länge der jeweiligen PNA zwischen 0,94 und 0,99.

4.6 Hybridisierungen von PNA-Microarrays

Generell können PNA-Microarrays wie gewöhnliche DNA-Microarrays hybridisiert werden. Dabei ist der Schmelzpunkt (T_m) eines PNA:DNA-Duplex nahezu unabhängig von der Salzkonzentration (Egholm et al., 1996). Bei DNA:DNA-Duplexen muss eine bestimmte Salzkonzentration vorhanden sein, um die negative Ladung des DNA-Rückgrats teilweise zu neutralisieren, wodurch die Hybridisierung erst ermöglicht wird. Im Gegenteil zu DNA:DNA-Duplexen erhöht sich der T_m-Wert eines PNA:DNA-Duplex bei sinkender Salzkonzentration und wird bei steigender Konzentration der Salze etwas niedriger (Griffin & Smith, 1998), liegt hierbei aber immer noch höher als bei vergleichbaren DNA:DNA-Duplexen. Für die Hybridisierung der PNA-Microarrays mit DNA-Molekülen wurde ein Puffer mit einer Konzentration von 60 mM Natriumchlorid verwendet, der gute Ergebnisse lieferte. Es sollte aber ohne Probleme möglich sein, die Salzkonzentration entweder zu erhöhen oder aber noch weiter zu senken. Eine geringe Salzkonzentration hat hierbei den Vorteil, dass PNA-Moleküle einfach mit dem komplementären Strang eines DNA:DNA-Duplex hybridisieren können, nachdem der zweite DNA-Strang des Duplex aufgrund der niedrigen Konzentration an positiv geladenen Ionen destabilisiert und verdrängt wurde. Der PNA:DNA-Duplex bleibt unter dieser geringen Salzkonzentration stabil (Demidov, 2001).

4.6.1 Selektivität der Hybridisierung

Die Selektivität der PNA-Microarrays wurde anhand von Fehlpaarungen einzelner Basen zwischen PNA- und DNA-Molekülen gezeigt. Dazu wurden vier PNA 13mere, die sich in der mittleren Position unterschieden, synthetisiert und auf aktivierte Oberflächen gespottet. Die erste PNA wurde mit Adenin, die zweite mit Cytosin, die dritte mit Guanin und die vierte mit Thymin an der siebten Position synthetisiert. Ansonsten waren die Sequenzen komplett identisch: N-Terminus-Li-TTGAAT(**A**,**C**,**G** oder **T**)GCTCGA-Li-C-Terminus

Die PNA-Microarrays wurden anschließend mit einem Gemisch aus je zwei komplementären DNA-Oligonukleotiden, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzmolekülen markiert waren, hybridisiert. Dabei wurde eine Hybridisierungstemperatur von 38°C verwendet. Die berechneten T_m-Werte der PNAs lagen zwischen 44,3°C und 39,8°C und damit durchschnittlich 7,6°C höher als bei vergleichbaren DNA-Oligonukleotiden. Bei einer einzelnen Basenfehlpaarung eines PNA:DNA-Duplex verringert sich die Schmelztemperatur um ca. 8 - 20°C (Ratilainen et al., 2000; Egholm et al., 1993). Folglich sollten bei 38°C die DNA-Oligonukleotide an die vollständig komplementären PNAs auf dem

Microarray binden, während an den PNAs mit einer Basenfehlpaarung keine oder eine wesentlich schwächere Hybridisierung stattfinden sollte, was sich bei den Versuchen auch eintrat. Die Ergebnisse zeigten, dass es möglich ist, PNA-Microarrays für die Analyse von Einzelbasenmutationen / SNPs zu verwenden und bestätigten die Selektivität der PNA-Moleküle, die zuvor auch schon in anderen Studien gezeigt wurde (Svanvik et al., 2000; Doyle et al., 2001; Kuhn et al., 2002).

4.6.2 Wiederverwendbarkeit von PNA-Microarrays

Es wurde gezeigt, dass PNA-Microarrays mehrfach wiederverwendbar sind. Die hybridisierten DNAs konnten durch abwechselndes Waschen in kochendem Wasser und 0,1× SSarc-Puffer wieder regeneriert werden. Anschließend waren sie für eine erneute Hybridisierung nutzbar. Dieser Vorgang konnte ohne Abnahme der Signalintensitäten problemlos fünfmal wiederholt werden. Auch die Zunahme der verbliebenen Signale nach dem „Strippen“ wurde nach den fünf Wiederholungen nicht festgestellt. Die Restsignale blieben jedoch nach der ersten Hybridisierung konstant bei ca. 0,3 - 1,0% der Signalintensitäten des hybridisierten Microarrays. Denkbar ist, dass die konstanten Restsignale aufgrund von Wechselwirkungen der hybridisierten DNA-Moleküle mit der Microarray-Oberfläche bestehen bleiben.

4.7 TOF-SIMS-Analyse von hybridisierten PNA-Microarrays

Es wurde gezeigt, dass es möglich ist, auf PNA-Microarrays hybridisierte DNA-Moleküle mittels TOF-SIMS zu analysieren. Ein großer Vorteil liegt dabei in der markierungsfreien Analyse, da die Detektion der hybridisierten DNAs / RNAs anhand der Phosphate stattfindet, welche Bestandteile der Moleküle sind (Arlinghaus et al., 1997; Brandt et al., 2003). Abhängig von der Art der verwendeten Primärionen und der Dichte der hybridisierten DNA-Moleküle auf der Oberfläche resultieren unterschiedliche Phosphat-spezifische Ionen aus dem Beschuss mit Primärionen. Besonders auffällig ist, dass gerade bei den größeren Sekundärionen die Siganlintensität des Hintergrunds abnimmt. Dieses könnte daran liegen, dass besonders bei 63 Da (PO_2^-) und 79 Da (PO_3^-) auch Verunreinigungen durch Phosphate aus den verwendeten Lösungen zu sehen sind, welche sich beim Hybridisieren und Waschen in geringer Konzentration auf dem Microarray abgelagert haben. Gerade bei einer niedrigen Konzentration der Moleküle auf der Oberfläche entstehen bevorzugt PO_2^--Ionen und weniger die größeren Ionen wie PO_3^-, $HP_2O_6^-$ oder $H_3P_2O_7^-$. Erklärt werden kann dieser

Effekt durch eine dünnere Schicht der Moleküle auf der Oberfläche, bei der sich die Intensität der Primärionen stärker auswirkt als bei einer vergleichsweise dickeren Schicht, zumal bei der statischen TOF-SIMS nur die oberen 1 - 2 nm analysiert werden (Belu et al., 2003; Van Vaeck et al., 1999). Die Primärionen und die resultierenden Kollisionskaskaden werden von vielen Molekülen besser verteilt und damit abgemildert als bei sehr wenigen Molekülen. Die intensiveren Zusammenstöße bei geringen Konzentrationen bewirken eine stärkere Fragmentierung der Moleküle, wodurch vermehrt kleine Ionen gebildet und anschließend detektiert werden. Dieser Effekt ist besonders in Abbildung 45 gut zu sehen. Hier sind die PO_2^--Signale bei den niedrigen Konzentrationen der gespotteten und anschließend hybridisierten PNA-Moleküle intensiver als bei den höheren. Eine zweite Erklärung für die größeren Ionen, welche bei höheren Konzentrationen der Moleküle auf der Oberfläche gebildet werden, könnte folgende sein: durch die höhere Anzahl der Moleküle auf der Oberfläche kommt es insgesamt zu einer größeren Dichte an gebildeten kleinen Fragmentionen. Diese Fragmentionen prallen zusammen, so dass teilweise auch größere Phosphationen ($HP_2O_6^-$ und $H_3P_2O_7^-$) gebildet werden.

Für die Ionen PO_3^-, $HP_2O_6^-$ oder $H_3P_2O_7^-$ gilt der Zusammenhang, dass bei höheren Konzentrationen der zuvor gespotteten PNAs auch die Signalintensitäten im TOF-SIMS-Gerät bei der Analyse zunehmen, nachdem der PNA-Microarray zuvor mit komplementärer DNA hybridisiert wurde. Dieses trifft wahrscheinlich nicht mehr zu, wenn die Konzentration der hybridisierten DNAs geringer wird.

Je größer die DNA-Konzentration auf der Oberfläche, desto stärker die Signalintensitäten bei den PO_3^-, $HP_2O_6^-$ oder $H_3P_2O_7^-$-Ionen. Im Gegensatz hierzu werden die PO_2^--Signale erst bei Konzentrationen von wenigen fmol (< 50 fmol, bei einem hybridisierten 50mer DNA-Molekül) verstärkt gebildet.

4.7.1 Auswirkungen von unterschiedlichen Primärionen

Besonders wichtig für die bildgebende Analyse von Oberflächen ist bei TOF-SIMS-Geräten die Auswahl der Ionenquelle. Je nach Bauweise und Art können unterschiedliche Durchmesser des Ionenstrahls und damit verbundene Auflösungen bei der Analyse von Oberflächen erreicht werden. Die kleinsten Durchmesser von ca. 10 - 30 nm werden derzeit bei einem fokussierten Strahl aus einer Flüssigmetall-Ionenquelle (LMIS – „Liquid Metal Ion Source“) erreicht (Van Vaeck et al., 1999). Mit diesem Durchmesser ist es möglich, Strukturen von 100 nm auf Oberflächen gut aufzulösen. Die Spotdurchmesser der PNA-Microarrays könnten demnach noch weiter reduziert werden, wodurch auch der Verbrauch

an Probenmaterial und / oder die Menge des für eine Hybridisierung benötigten Volumens verringert werden könnte. Derzeit werden mit handelsüblichen Kontaktspottern und den dazugehörigen Pins Spots mit Durchmessern von etwa 70 µm erreicht.

Zusätzlich zum Durchmesser des Primärinonenstrahls spielen die verwendeten Primärionen selbst ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Detektion von organischen Molekülen. So wurde in den letzten Jahren gezeigt, dass bei größeren Primärionen, besonders bei der Verwendung von Cluster-Ionen, die Ausbeute der Sekundärionen deutlich erhöht werden kann (Kötter & Benninghoven, 1998). In diesem Zusammenhang sind besonders Gold-Flüssigmetall-Ionenquellen von großem Interesse, da die Masse der generierten Teilchen wesentlich größer ist als die bei anderen Flüssigmetall-Ionenquellen (z.B. Gallium). Zusätzlich bieten Gold-Flüssigmetall-Ionenquellen die Möglichkeit, Cluster-Ionen (Au_2^+, Au_3^+, ...) zu erzeugen (Walker & Winograd, 2003), mit denen die Ausbeute an Sekundärionen nochmals gesteigert werden kann.

Bei den Messungen der hybridisierten PNA-Microarrays wurden mit den Gold-Cluster-Ionen (Au_3^+) etwa 45fach höhere Ausbeuten an Sekundärionen erzielt als mit den sehr viel leichteren Argon-Ionen (Ar^+). Der Unterschied zwischen den Xe^{2+} und den Au_3^+-Ionen fiel etwas geringer aus. Die Anzahl der gebildeten Sekundärionen war aber auch hier bei den Gold-Cluster-Ionen 8,5fach höher als bei den Xe^{2+}-Ionen. Dieses Ergebnis bestätigte auch für PNA-Microarrays die allgemeine Annahme, dass bei größeren Primärionen (z.B. Cluster-Ionen) die Ausbeute an Sekundärionen deutlich zunimmt (Stipdonk, 2001; Weibel et al., 2003).

Auf das Verhältnis der Signalintensitäten zur Intensität des Hintergunds wirkten sich die größeren Gold-Cluster-Ionen nur im Vergleich zu den Argon-Ionen positiv aus. Beim Wechsel von den Xenon- zu den Gold-Cluster-Ionen blieb das Verhältnis nahezu gleich.

4.8 Ausblick

DNA-Analoga spielen inzwischen eine bedeutende Rolle in der modernen Biotechnologie. Nicht nur als potentielle Antisense-Moleküle sondern auch in einer Vielzahl anderer Anwendungen werden sie aufgrund ihrer besserten Hybridisierungseigenschaften und ihrer Stabilität eingesetzt. PNA ist eines dieser Moleküle, welches sich durch ein Peptid-ähnliches Rückgrat besonders gravierend von den natürlich vorkommenden Nukleinsäuren unterscheidet. Durch die stark veränderte Struktur der PNA erschlossen sich auch neue Einsatzgebiete wie z.B. das „PCR-Clamping“ (Behn et al., 2000; Sun et al., 2002), welches mit gewöhnlichen DNA-Oligonukleotiden nicht ohne weiteres möglich gewesen wäre. In

dieser Arbeit wurde eine effiziente, kostengünstige und automatisierte Synthese von PNA-Molekülen in 96er und 384er Platten entwickelt. Im Zuge der fortschreitenden Miniaturisierung und zunehmenden Parallelität, mit der Proben analysiert werden, steigt auch der Bedarf an synthetischen Molekülen ständig (Oligonukleotide, Analoga, Peptide, etc.). Neue Syntheseroboter und veränderte Monomere für die effizientere Synthese werden hier eine wichtige Rolle spielen. Inzwischen gibt es hinsichtlich der PNA-Synthese Bemühungen, PNA-Bausteine mit photolabilen Schutzgruppen herzustellen (Info: Panagene Inc., http://www.panagene.com). Mit diesen Monomeren wäre die parallele *in situ* Synthese von PNA-Molekülen auf Oberflächen mittles photolithographischer Masken- oder Spiegel-Verfahren, die auch schon bei der Herstellung von DNA-Chips eingesetzt werden (Albert et al., 2003; Singh-Gasson et al., 1999), möglich.

Bei der Microarray- aber auch bei anderen Technologien werden Proben-Moleküle auf festen Oberflächen fixiert. Um eine zusätzliche Aufreinigung der PNAs nach der Synthese zu umgehen, wurde ein „On-Chip"-Aufreinigung entwickelt, die das gleichzeitige Anbinden und Aufreinigen der Moleküle direkt auf der Oberfläche erlaubt. Die so hergestellten PNA-Microarrays konnten für spezifische Hybridisierungen mit DNA-Molekülen und die anschließende Analyse mittels TOF-SIMS verwendet werden. Das Potential dieser Methode ist längst noch nicht ausgeschöpft. Durch Weiterentwicklungen der Geräte aber auch der Ionisierung an sich kann die Sensitivität in Zukunft noch weiter gesteigert werden. Vor allem die Primärionenquellen und die Nachionisierung der Sekundärteilchen sind hierfür aussichtsreiche Kandidaten. Letzteres ist besonders vor dem Hintergund der geringen Ausbeute an geladenen Molekül-Fragmenten (ca. 10^{-6} bis 10^{-1}) durch den Beschuss mit Primärionen interessant. Durch die Nachionisierung durch z.B. Photoionisation der neutralen Teilchen mit geeigneten Lasern kann die Ausbeute der Sekundärionen und somit die Signalintensität deutlich gesteigert werden (Schnieders & Benninghoven, 2000; Wucher, 2001). Entsprechende Laser-SNMS-Geräte (Laser – Secondary Neutral Mass Spektrometer), im Prinzip ein TOF-SIMS-Gerät mit einem senkrecht zum Flugrohr angebrachtem Laser, werden ständig weiterentwickelt und unter anderem auch an die Nachionisierung von Phosphaten angepasst. Bei einer vollständigen Ionisierung der Phosphat-spezifischen Teilchen wäre gegebenenfalls auch eine Quantifizierung der Signale möglich.

Neben TOF-SIMS oder Laser-SNMS gibt es inzwischen eine Vielzahl an alternativen Methoden zur Detektion von nicht markierten DNA-Molekülen auf hybridisierten Microarrays (Fritz et al., 2002; McKendry et al., 2002; Wang et al., 2002; Gheorghe & Guiseppi-

Elie, 2003). Diese Methoden werden in der Zukunft zeigen müssen, ob sie schneller, einfacher, kostengünstiger und / oder sensitiver als die gängigen Fluoreszenz-Analysen sind. Bei weiter steigender Sensitivität und der Möglichkeit zur Verwendung von unmarkierten Sonden wird in Zukunft standardmäßig auf die Amplifikation der Moleküle vor einer Hybridisierung verzichtet werden können.

5 Literaturverzeichnis

Aign, V., Schulte, U. and Hoheisel, J. D. (2001) Hybridization-based mapping of Neurospora crassa linkage groups II and V. *Genetics*, **157**(3)**,** 1015-20.

Albert, T. J., Norton, J., Ott, M., Richmond, T., Nuwaysir, K., Nuwaysir, E. F., Stengele, K. P. and Green, R. D. (2003) Light-directed 5'-->3' synthesis of complex oligonucleotide microarrays. *Nucleic Acids Res*, **31**(7)**,** E35.

Arlinghaus, H. F., Kwoka, M. N. and Jacobson, K. B. (1997) Analysis of biosensor chips for identification of nucleic acids. *Anal Chem*, **69**(18)**,** 3747-53.

Barany, G., Albericio, F., Biancalana, S., Bontems, S. L., Chang, J. L., Eritja, R., Ferrer, M., Fields, C. G., Fields, G. B., Lyttle, M. H., Sole, N. A., Tian, Z., Van Abel, R. J., Write, P. B., Zalipsky, S. and Hudson, D. (1992) Biopolymer syntheses on novel polyethylene glycol-polystyrene (PEG-PS) graft supports. In *Peptides: Chemistry and Biology*, J. A. Smith and J. E. River, eds., Leiden, Escom, pp. 603-604.

Barczak, A., Rodriguez, M. W., Hanspers, K., Koth, L. L., Tai, Y. C., Bolstad, B. M., Speed, T. P. and Erle, D. J. (2003) Spotted long oligonucleotide arrays for human gene expression analysis. *Genome Res*, **13**(7)**,** 1775-85.

Bayer, E. and Rapp, W. (1986) New polymer supports for solid-liquid-phase peptide synthesis. In *Chemistry of Peptides and Proteins*, **Vol. 3**, W. Voelter, E. Bayer, Y. A. Ovchinnikov, and V. T. Ivanov, eds., Berlin, Walter de Gruyter & Co., pp. 3-8

Behn, M. and Schuermann, M. (1998) Sensitive detection of p53 gene mutations by a 'mutant enriched' PCR-SSCP technique. *Nucleic Acids Res*, **26**(5)**,** 1356-8.

Behn, M., Thiede, C., Neubauer, A., Pankow, W. and Schuermann, M. (2000) Facilitated detection of oncogene mutations from exfoliated tissue material by a PNA-mediated 'enriched PCR' protocol. *J Pathol*, **190**(1)**,** 69-75.

Belu, A. M., Graham, D. J. and Castner, D. G. (2003) Time-of-flight secondary ion mass spectrometry: techniques and applications for the characterization of biomaterial surfaces. *Biomaterials*, **24**(21)**,** 3635-53.

Benninghoven, A. (1970) The analysis of monomolecular layers of solids by secondary ion emission. *Z Phys*, **230**, 403-17.

Benninghoven, A. (1973) Surface investigation of solids by the statistical method of secondary ion mass spectrometry (SIMS). *Surf Sci*, **35**, 427-57.

Bialek, K., Swistowski, A. and Frank, R. (2003) Epitope-targeted proteome analysis: towards a large-scale automated protein-protein-interaction mapping utilizing synthetic peptide arrays. *Anal Bioanal Chem*, **376**(7)**,** 1006-13.

Braasch, D. A. and Corey, D. R. (2001) Synthesis, analysis, purification, and intracellular delivery of peptide nucleic acids. *Methods*, **23**(2)**,** 97-107.

Brandt, O., Feldner, J., Stephan, A., Schroder, M., Schnolzer, M., Arlinghaus, H. F., Hoheisel, J. D. and Jacob, A. (2003) PNA microarrays for hybridisation of unlabelled DNA samples. *Nucleic Acids Res*, **31**(19)**,** E119.

Briggs, D., Wooten, A. B. (1982) Analysis of polymer surfaces by SIMS. 1. An investigation of practical problems. *Surf Interface Anal*, **4**, 109-15.

Brown, A., Vickerman, J. C. (1984) Static SIMS for applied surface analysis. *Surf Interface Anal*, **6**, 1-14.

Brown, P. O. and Botstein, D. (1999) Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet*, **21**(1 Suppl)**,** 33-7.

Brown, S. C., Thomson, S. A., Veal, J. M. and Davis, D. G. (1994) NMR solution structure of a peptide nucleic acid complexed with RNA. *Science*, **265**(5173)**,** 777-80.

Bulyk, M. L., Gentalen, E., Lockhart, D. J. and Church, G. M. (1999) Quantifying DNA-protein interactions by double-stranded DNA arrays. *Nat Biotechnol*, **17**(6)**,** 573-7.

Burgener, M., Sanger, M. and Candrian, U. (2000) Synthesis of a stable and specific surface plasmon resonance biosensor surface employing covalently immobilized peptide nucleic acids. *Bioconjug Chem*, **11**(6)**,** 749-54.

Carlsson, C., Jonsson, M., Norden, B., Dulay, M. T., Zare, R. N., Noolandi, J., Nielsen, P. E., Tsui, L. C. and Zielenski, J. (1996) Screening for genetic mutations. *Nature*, **380**(6571)**,** 207.

Carpino, L. A. (1993) I-Hydroxy-7-azabeiizotriazole. An efficient peptide coupling additive. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**(10)**,** 4397-4398.

Casale, R., Jensen, I. S. and Egholm, M. (1999) Synthesis of PNA oligomers by Fmoc chemistry. In: Peptide nucleic acids: protocols and applications. (Eds: P. E. Nielsen, M. Egholm) Horizon Scientific Press, Wymondham, United Kingdom, 39-50.

Chandler, D. P. and Jarrell, A. E. (2003) Enhanced nucleic acid capture and flow cytometry detection with peptide nucleic acid probes and tunable-surface microparticles. *Anal Biochem*, **312**(2)**,** 182-90.

Christensen, L., Fitzpatrick, R., Gildea, B., Petersen, K. H., Hansen, H. F., Koch, T., Egholm, M., Buchardt, O., Nielsen, P. E., Coull, J. and et al. (1995) Solid-phase synthesis of peptide nucleic acids. *J Pept Sci*, **1**(3)**,** 175-83.

Davies, N., Weibel, D. E., Blenkinsopp, P., Lockyer, N., Hill, R., Vickerman, J. C. (2003) Development and experimental application of a gold liquid metal ion source. *Appl Surf Sci*, **203-204**:223-7.

Declercq, R., Van Aerschot, A., Read, R. J., Herdewijn, P. and Van Meervelt, L. (2002) Crystal structure of double helical hexitol nucleic acids. *J Am Chem Soc*, **124**(6)**,** 928-33.

Demidov, V. V. and Frank-Kamenetskii, M. D. (2001) Sequence-specific targeting of duplex DNA by peptide nucleic acids via triplex strand invasion. *Methods*, **23**(2)**,** 108-22.

Demidov, V. V. (2001) PD-loop technology: PNA openers at work. *Expert Rev Mol Diagn*, **1**(3)**,** 343-51.

Demidov, V. V. and Frank-Kamenetskii, M. D. (2002) PNA openers and their applications. *Methods Mol Biol*, **208,** 119-30.

Demidov, V. V., Potaman, V. N., Frank-Kamenetskii, M. D., Egholm, M., Buchard, O., Sonnichsen, S. H. and Nielsen, P. E. (1994) Stability of peptide nucleic acids in human serum and cellular extracts. *Biochem Pharmacol*, **48**(6)**,** 1310-3.

Diehl, F., Grahlmann, S., Beier, M. and Hoheisel, J. D. (2001) Manufacturing DNA microarrays of high spot homogeneity and reduced background signal. *Nucleic Acids Res*, **29**(7)**,** E38.

Dourtoglou, V., Ziegler, J.-C. and Gross, B. (1978) L'hexafluorophosphate de O-benzotriazolyl-N,N-tetramethyluronium: un reactif de couplage peptidique nouveau et efficase. *Tetrahedron Lett*., **15,** 1269-1272.

Doyle, D. F., Braasch, D. A., Simmons, C. G., Janowski, B. A. and Corey, D. R. (2001) Inhibition of gene expression inside cells by peptide nucleic acids: effect of mRNA target sequence, mismatched bases, and PNA length. *Biochemistry*, **40**(1)**,** 53-64.

Dueholm, K. L., Egholm, M., Behrens, C., Christensen, L., Hansen, H. F., Vulpius, T., Petersen, H., Berg, R. H., Nielsen, P. E. and Buchardt, O. (1994) Synthesis of Peptide Nucleic Acid Monomers Containing the Four Natural Nucleobases: Thymine, Cytosine, Adenine, and Guanine and Their Oligomerization. *J Org Chem*, **59**(19)**,** 5767-5773.

Egholm, M., Buchardt, O., Christensen, L., Behrens, C., Freier, S. M., Driver, D. A., Berg, R. H., Kim, S. K., Norden, B. and Nielsen, P. E. (1993) PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature*, **365**(6446)**,** 566-8.

Egholm, M., Buchardt, O., Nielsen, P. E. and Berg, R. H. (1992) Peptide nucleic acids (PNA). Oligonucleotide analogs with an achiral peptide backbone. *J Am Chem Soc*, **114**(5)**,** 1895 - 1897.

Eriksson, M. and Nielsen, P. E. (1996) PNA-nucleic acid complexes. Structure, stability and dynamics. *Q Rev Biophys*, **29**(4)**,** 369-94.

Feriotto, G., Corradini, R., Sforza, S., Bianchi, N., Mischiati, C., Marchelli, R. and Gambari, R. (2001) Peptide nucleic acids and biosensor technology for real-time detection of the cystic fibrosis W1282X mutation by surface plasmon resonance. *Lab Invest*, **81**(10)**,** 1415-27.

Fields, G. B. and Noble, R. L. (1990) Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxy-carbonyl amino acids. *Int J Pept Protein Res*, **35**(3)**,** 161-214.

Fodor, S. P., Read, J. L., Pirrung, M. C., Stryer, L., Lu, A. T. and Solas, D. (1991) Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science*, **251**(4995)**,** 767-73.

Fritz, J., Cooper, E. B., Gaudet, S., Sorger, P. K. and Manalis, S. R. (2002) Electronic detection of DNA by its intrinsic molecular charge. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(22)**,** 14142-6.

Ganesh, K. N. and Nielsen, P. E. (2000) Peptide Nucleic Acids: Analogs and Derivatives. *Current Organic Chemistry*, **9**(4)**,** 931-943.

Gheorghe, M. and Guiseppi-Elie, A. (2003) Electrical frequency dependent characterization of DNA hybridization. *Biosens Bioelectron*, **19**(2)**,** 95-102.

Giesen, U., Kleider, W., Berding, C., Geiger, A., Orum, H. and Nielsen, P. E. (1998) A formula for thermal stability (Tm) prediction of PNA/DNA duplexes. *Nucleic Acids Res*, **26**(21)**,** 5004-6.

Griffin, T. J. and Smith, L. M. (1998) An approach to predicting the stabilities of peptide nucleic acid:DNA duplexes. *Anal Biochem*, **260**(1)**,** 56-63.

Haab, B. B., Dunham, M. J. and Brown, P. O. (2001) Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. *Genome Biol*, **2**(2)**,** RESEARCH0004.

Hanvey, J. C., Peffer, N. J., Bisi, J. E., Thomson, S. A., Cadilla, R., Josey, J. A., Ricca, D. J., Hassman, C. F., Bonham, M. A., Au, K. G. and et al. (1992) Antisense and antigene properties of peptide nucleic acids. *Science*, **258**(5087)**,** 1481-5.

Hermanson,G. T. (1996) *Bioconjugate Techniques.* Academic Press, San Diego, CA

Hoheisel, J. D., Maier, E., Mott, R., McCarthy, L., Grigoriev, A. V., Schalkwyk, L. C., Nizetic, D., Francis, F. and Lehrach, H. (1993) High resolution cosmid and P1 maps spanning the 14 Mb genome of the fission yeast S. pombe. *Cell*, **73**(1)**,** 109-20.

Hyrup, B. and Nielsen, P. E. (1996) Peptide nucleic acids (PNA): synthesis, properties and potential applications. *Bioorg Med Chem*, **4**(1)**,** 5-23.

Isacsson, J., Cao, H., Ohlsson, L., Nordgren, S., Svanvik, N., Westman, G., Kubista, M., Sjoback, R. and Sehlstedt, U. (2000) Rapid and specific detection of PCR products using light-up probes. *Mol Cell Probes*, **14**(5)**,** 321-8.

Ishikawa, E., Imagawa, M. and Hashida, S. (1983) Ultra sensitive enzyme immunoassay using fluorogenic, luminogenic, radioactive and related substances and factors to limit the sensitivity. *Proceedings 2nd Internat. Sym. Immunoenzymatic Tech.*

Kane, M. D., Jatkoe, T. A., Stumpf, C. R., Lu, J., Thomas, J. D. and Madore, S. J. (2000) Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays. *Nucleic Acids Res*, **28**(22)**,** 4552-7.

Koch, T., Hansen, H. F., Andersen, P., Larsen, T., Batz, H. G., Otteson, K. and Orum, H. (1997) Improvements in automated PNA synthesis using Boc/Z monomers. *J Pept Res*, **49**(1)**,** 80-8.

Komiyama, M., Ye, S., Liang, X., Yamamoto, Y., Tomita, T., Zhou, J. M. and Aburatani, H. (2003) PNA for One-Base Differentiating Protection of DNA from Nuclease and Its Use for SNPs Detection. *J Am Chem Soc*, **125**(13)**,** 3758-62.

Kötter, F. and Benninghoven, A. (1998) Secondary ion emission from polymer surfaces under Ar^+, Xe^+ and $SF5^+$ ion bombardment. *Appl Surf Sci*, **133**(1-2)**,** 47-57.

Kuhn, H., Demidov, V. V., Coull, J. M., Fiandaca, M. J., Gildea, B. D. and Frank-Kamenetskii, M. D. (2002) Hybridization of DNA and PNA molecular beacons to single-stranded and double-stranded DNA targets. *J Am Chem Soc*, **124**(6)**,** 1097-103.

Kuhn, H., Demidov, V. V., Gildea, B. D., Fiandaca, M. J., Coull, J. C. and Frank-Kamenetskii, M. D. (2001) PNA beacons for duplex DNA. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, **11**(4)**,** 265-70.

Kuhn, H., Demidov, V. V., Nielsen, P. E. and Frank-Kamenetskii, M. D. (1999) An experimental study of mechanism and specificity of peptide nucleic acid (PNA) binding to duplex DNA. *J Mol Biol*, **286**(5)**,** 1337-45.

Kuhn, H., Hu, Y., Frank-Kamenetskii, M. D. and Demidov, V. V. (2003) Artificial site-specific DNA-nicking system based on common restriction enzyme assisted by PNA openers. *Biochemistry*, **42**(17)**,** 4985-92.

Kusnezow, W., Jacob, A., Walijew, A., Diehl, F. and Hoheisel, J. D. (2003) Antibody microarrays: An evaluation of production parameters. *Proteomics*, **3**(3)**,** 254-64.

Landegren, U., Nilsson, M. and Kwok, P. Y. (1998) Reading bits of genetic information: methods for single-nucleotide polymorphism analysis. *Genome Res*, **8**(8)**,** 769-76.

Larsen, R. D., Schonau, A., Thisted, M., Petersen, K. H., Lohse, J., Christensen, B., Philip, J. and Pluzek, K. J. (2003) Detection of gamma-globin mRNA in fetal nucleated red blood cells by PNA fluorescence in situ hybridization. *Prenat Diagn*, **23**(1)**,** 52-9.

Lee, L. G., Chen, C. H. and Chiu, L. A. (1986) Thiazole orange: a new dye for reticulocyte analysis. *Cytometry*, **7**(6)**,** 508-17.

Leijon, M., Graslund, A., Nielsen, P. E., Buchardt, O., Norden, B., Kristensen, S. M. and Eriksson, M. (1994) Structural characterization of PNA-DNA duplexes by NMR. Evidence for DNA in a B-like conformation. *Biochemistry*, **33**(33)**,** 9820-5.

Lipshutz, R. J., Fodor, S. P., Gingeras, T. R. and Lockhart, D. J. (1999) High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet*, **21**(1 Suppl)**,** 20-4.

Lohse, J., Dahl, O. and Nielsen, P. E. (1999) Double duplex invasion by peptide nucleic acid: a general principle for sequence-specific targeting of double-stranded DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(21)**,** 11804-8.

MacBeath, G. and Schreiber, S. L. (2000) Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science*, **289**(5485)**,** 1760-3.

McKendry, R., Zhang, J., Arntz, Y., Strunz, T., Hegner, M., Lang, H. P., Baller, M. K., Certa, U., Meyer, E., Guntherodt, H. J. and Gerber, C. (2002) Multiple label-free biodetection and quantitative DNA-binding assays on a nanomechanical cantilever array. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(15)**,** 9783-8. Epub 2002 Jul 15.

Merrifield, R. B. (1963) Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J Am Chem Soc*, **85**(14)**,** 2149-2154.

Miller, J. C., Zhou, H., Kwekel, J., Cavallo, R., Burke, J., Butler, E. B., Teh, B. S. and Haab, B. B. (2003) Antibody microarray profiling of human prostate cancer sera: antibody screening and identification of potential biomarkers. *Proteomics*, **3**(1)**,** 56-63.

Morpurgo, M., Bayer, E. A. and Wilchek, M. (1999) N-hydroxysuccinimide carbonates and carbamates are useful reactive reagents for coupling ligands to lysines on proteins. *J Biochem Biophys Methods*, **38**(1)**,** 17-28.

Murdock, D. G., Christacos, N. C. and Wallace, D. C. (2000) The age-related accumulation of a mitochondrial DNA control region mutation in muscle, but not brain, detected by a sensitive PNA-directed PCR clamping based method. *Nucleic Acids Res*, **28**(21)**,** 4350-5.

Nielsen, P. E., Egholm, M., Berg, R. H. and Buchardt, O. (1991) Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science*, **254**(5037)**,** 1497-500.

Nulf, C. J. and Corey, D. R. (2002) DNA assembly using bis-peptide nucleic acids (bisPNAs). *Nucleic Acids Res*, **30**(13)**,** 2782-9.

Nygren, J., Svanvik, N. and Kubista, M. (1998) The interactions between the fluorescent dye thiazole orange and DNA. Biopolymers, **46**(1), 39-51.

Okamoto, T., Suzuki, T. and Yamamoto, N. (2000) Microarray fabrication with covalent attachment of DNA using bubble jet technology. *Nat Biotechnol*, **18**(4)**,** 438-41.

Orum, H., Nielsen, P. E., Egholm, M., Berg, R. H., Buchardt, O. and Stanley, C. (1993) Single base pair mutation analysis by PNA directed PCR clamping. *Nucleic Acids Res*, **21**(23)**,** 5332-6.

Pastinen, T., Kurg, A., Metspalu, A., Peltonen, L. and Syvanen, A. C. (1997) Minisequencing: a specific tool for DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide arrays. *Genome Res*, **7**(6)**,** 606-14.

Pease, A. C., Solas, D., Sullivan, E. J., Cronin, M. T., Holmes, C. P. and Fodor, S. P. (1994) Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**(11)**,** 5022-6.

Peffer, N. J., Hanvey, J. C., Bisi, J. E., Thomson, S. A., Hassman, C. F., Noble, S. A. and Babiss, L. E. (1993) Strand-invasion of duplex DNA by peptide nucleic acid oligomers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**(22)**,** 10648-52.

Perry-O'Keefe, H., Yao, X. W., Coull, J. M., Fuchs, M. and Egholm, M. (1996) Peptide nucleic acid pre-gel hybridization: an alternative to southern hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93** (25)**,** 14670-5.

Petersen, M., Nielsen, C. B., Nielsen, K. E., Jensen, G. A., Bondensgaard, K., Singh, S. K., Rajwanshi, V. K., Koshkin, A. A., Dahl, B. M., Wengel, J. and Jacobsen, J. P. (2000) The conformations of locked nucleic acids (LNA). *J Mol Recognit*, **13**(1)**,** 44-53.

Ratilainen, T., Holmen, A., Tuite, E., Nielsen, P. E. and Norden, B. (2000) Thermodynamics of sequence-specific binding of PNA to DNA. *Biochemistry*, **39**(26)**,** 7781-91.

Ray, A. and Norden, B. (2000) Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future. *Faseb J*, **14**(9)**,** 1041-60.

Rigby, S., Procop, G. W., Haase, G., Wilson, D., Hall, G., Kurtzman, C., Oliveira, K., Von Oy, S., Hyldig-Nielsen, J. J., Coull, J. and Stender, H. (2002) Fluorescence in situ hybridization with peptide nucleic acid probes for rapid identification of Candida albicans directly from blood culture bottles. *J Clin Microbiol*, **40**(6)**,** 2182-6.

Rose, D. (2000) Microfluidic technologies and instrumentation for printing DNA microarrays. In: Microarray Biochip Technology. (Eds: Schena, M.) Eaton Publishing, 19-38

Roskey, M. T., Juhasz, P., Smirnov, I. P., Takach, E. J., Martin, S. A. and Haff, L. A. (1996) DNA sequencing by delayed extraction-matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**(10)**,** 4724-9.

Ross, P. L., Lee, K. and Belgrader, P. (1997) Discrimination of single-nucleotide polymorphisms in human DNA using peptide nucleic acid probes detected by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem*, **69**(20)**,** 4197-202.

Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W. and Brown, P. O. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, **270**(5235)**,** 467-70.

Schena, M., Heller, R. A., Theriault, T. P., Konrad, K., Lachenmeier, E. and Davis, R. W. (1998) Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. *Trends Biotechnol*, **16**(7)**,** 301-6.

Schnieders, A., Benninghoven, A. (2000) Detection and quantification of metals in organic materials by laser-SNMS with nonresonant multiphoton ionization. *Anal Chem.* **72**(18)**,** 4289-95.

Schwarz, F. P., Robinson, S. and Butler, J. M. (1999) Thermodynamic comparison of PNA/DNA and DNA/DNA hybridization reactions at ambient temperature. *Nucleic Acids Res*, **27**(24)**,** 4792-800.

Shchepinov, M. S., Case-Green, S. C. and Southern, E. M. (1997) Steric factors influencing hybridisation of nucleic acids to oligonucleotide arrays. *Nucleic Acids Res*, **25**(6)**,** 1155-61.

Singh, S. K., Nielsen, P., Koshkin, A. A. and Wengel, J. (1998) LNA (locked nucleic acids): synthesis and high-affinity nucleic acid recognition. *Chem. Commun.*, **4,** 455-456.

Singh-Gasson, S., Green, R. D., Yue, Y., Nelson, C., Blattner, F., Sussman, M. R. and Cerrina, F. (1999) Maskless fabrication of light-directed oligonucleotide microarrays using a digital micromirror array. *Nat Biotechnol*, **17**(10)**,** 974-8.

Smyth, D. G., Blumenfeld, O. O. and Konigsberg, W. (1964) Reaction of *N*-ethylmaleimide with peptides and amino acids. *Biochem. J.*, **91,** 589.

Solinas-Toldo, S., Durst, M. and Lichter, P. (1997) Specific chromosomal imbalances in human papillomavirus-transfected cells during progression toward immortality. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**(8)**,** 3854-9.

Solinas-Toldo, S., Lampel, S., Stilgenbauer, S., Nickolenko, J., Benner, A., Dohner, H., Cremer, T. and Lichter, P. (1997) Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer*, **20**(4)**,** 399-407.

Southern, E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gelelectrophoresis. *J Mol Biol*, **98**(3)**,** 503-17.

Southern, E., Mir, K. and Shchepinov, M. (1999) Molecular interactions on microarrays. *Nat Genet*, **21**(1 Suppl)**,** 5-9.

Stears, R. L., Martinsky, T. and Schena, M. (2003) Trends in microarray analysis. *Nat Med*, **9**(1)**,** 140-5.

Stender, H., Mollerup, T. A., Lund, K., Petersen, K. H., Hongmanee, P. and Godtfredsen, S. E. (1999) Direct detection and identification of Mycobacterium tuberculosis in smear-positive sputum samples by fluorescence in situ hybridization (FISH) using peptide nucleic acid (PNA) probes. *Int J Tuberc Lung Dis*, **3**(9)**,** 830-7.

Stipdonk, M. J. V. (2001) Polyatomic primary beams. *In: Vickerman, J. C., Briggs, D., editors. TOF-SIMS: surface analysis by mass spectrometry. Chichester, UK: IM Publications and SurfaceSpectra Limited*, 309-45.

Sun, X., Hung, K., Wu, L., Sidransky, D. and Guo, B. (2002) Detection of tumor mutations in the presence of excess amounts of normal DNA. *Nat Biotechnol*, **20**(2)**,** 186-9.

Svanvik, N., Westman, G., Wang, D. and Kubista, M. (2000) Light-up probes: thiazole orange-conjugated peptide nucleic acid for detection of target nucleic acid in homogeneous solution. *Anal Biochem*, **281**(1)**,** 26-35.

Tackett, A. J., Corey, D. R. and Raney, K. D. (2002) Non-Watson-Crick interactions between PNA and DNA inhibit the ATPase activity of bacteriophage T4 Dda helicase. *Nucleic Acids Res*, **30** (4)**,** 950-7.

Thiede, C., Bayerdorffer, E., Blasczyk, R., Wittig, B. and Neubauer, A. (1996) Simple and sensitive detection of mutations in the ras proto-oncogenes using PNA-mediated PCR clamping. *Nucleic Acids Res*, **24**(5)**,** 983-4.

Thomson, S. A., Josey, J. A., Cadilla, R., Gaul, M. D., Hassman, C. F., Luzzio, M. J., Pipe, A. J., Reed, K. L., Ricca, D. J., Wiethe, R. W. and Noble, S. A. (1995) Fmoc mediated synthesis of peptide nucleic acids. Tetrahedron, **51**(22), 6179-94.

Tribbick, G. (2002) Multipin peptide libraries for antibody and receptor epitope screening and characterization. *J Immunol Methods*, **267**(1)**,** 27-35.

Tyagi, S. and Kramer, F. R. (1996) Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol*, **14**(3)**,** 303-8.

Uslu, F., Ingebrandt, S., Mayer, D., Bocker-Meffert, S., Odenthal, M. and Offenhausser, A. (2004) Labelfree fully electronic nucleic acid detection system based on a field-effect transistor device. *Biosensors and Bioelectronics*, **In Press, Corrected Proof**.

Van Aerschot, A., Meldgaard, M., Schepers, G., Volders, F., Rozenski, J., Busson, R. and Herdewijn, P. (2001) Improved hybridisation potential of oligonucleotides comprising O-methylated anhydrohexitol nucleoside congeners. *Nucleic Acids Res*, **29**(20)**,** 4187-94.

Van Vaeck, L., Adriaens, A. and Gijbels, R. (1999) Static secondary ion mass spectrometry (S-SIMS) Part 1: methodology and structural interpretation. *Mass Spec Rev*, **18**(1)**,** 1-47.

Verheggen, I., Van Aerschot, A., Van Meervelt, L., Rozenski, J., Wiebe, L., Snoeck, R., Andrei, G., Balzarini, J., Claes, P., De Clercq, E. and et al. (1995) Synthesis, biological evaluation, and structure analysis of a series of new 1,5-anhydrohexitol nucleosides. *J Med Chem*, **38**(5)**,** 826-35.

Walker, A. V., Winograd, N. (2003) Prospects for imaging with TOF-SIMS using gold liquid metal ion sources. *Appl Surf Sci*, **203-204**:198-200.

Wang, H., Li, J., Liu, H., Liu, Q., Mei, Q., Wang, Y., Zhu, J., He, N. and Lu, Z. (2002) Label-free hybridization detection of a single nucleotide mismatch by immobilization of molecular beacons on an agarose film. *Nucleic Acids Res*, **30**(12)**,** e61.

Wang, H. Y., Malek, R. L., Kwitek, A. E., Greene, A. S., Luu, T. V., Behbahani, B., Frank, B., Quackenbush, J. and Lee, N. H. (2003) Assessing unmodified 70-mer oligonucleotide probe performance on glass-slide microarrays. *Genome Biol*, **4**(1)**,** R5.

Weber, P. C., Ohlendorf, D. H., Wendoloski, J. J. and Salemme, F. R. (1989) Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. *Science*, **243**(4887)**,** 85-8.

Weibel, D., Wong, S., Lockyer, N., Blenkinsopp, P., Hill, R. and Vickerman, J. C. (2003) A C60 primary ion beam system for time of flight secondary ion mass spectrometry: its development and secondary ion yield characteristics. *Anal Chem*, **75**(7)**,** 1754-64.

Weiler, J., Gausepohl, H., Hauser, N., Jensen, O. N. and Hoheisel, J. D. (1997) Hybridisation based DNA screening on peptide nucleic acid (PNA) oligomer arrays. *Nucleic Acids Res*, **25**(14)**,** 2792-9.

Winssinger, N., Ficarro, S., Schultz, P. G. and Harris, J. L. (2002) Profiling protein function with small molecule microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **7,** 7.

Wittung, P., Nielsen, P. E., Buchardt, O., Egholm, M. and Norden, B. (1994) DNA-like double helix formed by peptide nucleic acid. *Nature*, **368**(6471)**,** 561-3.

Worden, A. Z., Chisholm, S. W. and Binder, B. J. (2000) In situ hybridization of Prochlorococcus and Synechococcus (marine cyanobacteria) spp. with RRNA-targeted peptide nucleic acid probes. *Appl Environ Microbiol*, **66**(1)**,** 284-9.

Wucher, A. (2001) Laser Postionization: Fundamentals. *ToF-SIMS: Surface Analysis by mass spectrometry,* Ed. J. C. Vickerman, D. Briggs, IM Publications and Surface Spectra, 347-74

Zhu, H., Bilgin, M., Bangham, R., Hall, D., Casamayor, A., Bertone, P., Lan, N., Jansen, R., Bidlingmaier, S., Houfek, T., Mitchell, T., Miller, P., Dean, R. A., Gerstein, M. and Snyder, M. (2001) Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science*, **293**(5537)**,** 2101-5.

6 Abkürzungsverzeichnis

Ac_2O	Essigsäureanhydrid
APTES	3-Aminopropyl-triethoxysilan
Bhoc	Benzhydryloxycarbonyl
Boc	*tert*-Butyloxycarbonyl
bp	Basenpaare
BSIL	3-[Bis-(2-hydroxyethyl)-amino]-propyl-triethoxysilan
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CDI	1,1'-Carbonyldiimidazol
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
DCM	Dichlormethan
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIC	N,N-Diisopropylethylamin
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DSC	Di-(N,N'-succinimidyl)-carbonat
EMCS	6-Maleinimidohexansäure-N-succinimidylester
FISH	Fluoreszenz *In Situ* Hybridisierung
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorphosphat
HBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorphosphat
HOAt	7-Aza-1-hydroxybenzotriazol
3-HPA	3-Hydroxypicolinsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisaton - Time Of Flight
MBHA	*p*-Methylbenzyhydrylamid
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
MS	Massenspektrometer
m/z	Masse- zu Ladungsverhältnis eines Teilchens
NMI	1-Methylimidazol
NMP	1-Methyl-2-pyrrolidon
nt	Nukleotide

PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglycol
PNA	Peptide Nucleic Acid
PMT	Photomultiplier
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
SDS	Natiumdodecylsulfat
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TFA	Trifluoressigsäure
TIPS	Triisopropylsilan
T_m	Schmelztemperatur
TOF-SIMS	Time Of Flight - Secondary Ion Mass Spectrometry

7 Anhang

Für die PNA-Microarrays verwendete PNA-Sequenzen:

Name	Sequenz	Masse in [Da]
TC-PNA	N-Terminus-Li-TTCTCCCTCTCTC-Li-C-Terminus	3663,5
Seq1-PNA	N-Terminus-Li-AGCTTACGGATCA-Li-C-Terminus	3834,7
Seq2A-PNA	N-Terminus-Li-TTGAATAGCTCGA-Li-C-Terminus	3849,7
Seq2C-PNA	N-Terminus-Li-TTGAATCGCTCGA-Li-C-Terminus	3825,7
Seq2G-PNA	N-Terminus-Li-TTGAATGGCTCGA-Li-C-Terminus	3865,7
Seq2T-PNA	N-Terminus-Li-TTGAATTGCTCGA-Li-C-Terminus	3840,7
Cys-TC-PNA	Cys-Li-TTCTCCCTCTCTC-Li-C-Terminus	3766,8
Cys-Seq1-PNA	Cys-Li-AGCTTACGGATCA-Li-C-Terminus	3937,9
Cys-Seq2C-PNA	Cys-Li-TTGAATCGCTCGA-Li-C-Terminus	3928,9
Cys-Seq3-PNA	Cys-Li-TAAGTCTTAGTCATT-Li-C-Terminus	4460,4
Biotin-TC-PNA	Biotin-Li-TTCTCCCTCTCTC-Li-C-Terminus	3889,8
Biotin-Seq1-PNA	Biotin-Li-AGCTTACGGATCA-Li-C-Terminus	4061,0
Biotin-Seq2C-PNA	Biotin-Li-TTGAATCGCTCGA-Li-C-Terminus	4052,0
Ac-TC-PNA	Ac-Li-TTCTCCCTCTCTC-Li-C-Terminus	3705,6
Ac-Seq1-PNA	Ac-Li-AGCTTACGGATCA-Li-C-Terminus	3876,7
Ac-Seq2C-PNA	Ac-Li-TTGAATCGCTCGA-Li-C-Terminus	3867,7

Tab. 3: Liste der verwendeten PNA-Sequenzen. C-Terminus = $CONH_2$-Gruppe, N-Terminus = H_2N-Gruppe, Cys = Cystein, Li = AEEA-OH-Linker und Ac = acetylierter N-Terminus.

8 Eigene Publikationen

Brandt, O., Feldner, J., Stephan, A., Schroder, M., Schnolzer, M., Arlinghaus, H. F., Hoheisel, J. D. and Jacob, A. (2003) PNA microarrays for hybridisation of unlabelled DNA samples. *Nucleic Acids Res*, **31**(19)**,** E119.

Jacob, A., Brandt, O., Würtz, S., Stephan, A., Schnölzer, M. and Hoheisel, J.D. (2003) Production of PNA-arrays for nucleic acid detection. *Peptide Nucleic Acids; Protocols and Applications (Second Edition)* (Nielsen, P.E., ed.), Horizon Bioscience, Wymondham, 261-279.

Bauer, A., Beckmann, B., Busold, C., Brandt, O., Kusnezow, W., Pullat, J., Aign, V., Fellenberg, K., Fleischer, R., Jakob, A., Frohme, M. and Hoheisel, J. D. (2003) Use of complex DNA and antibody microarrays as tools in functional analyses. *Comparative and Functional Genomics*, **4**(5)**,** 520-524.

Tost, J., Brandt, O., Boussicault, F., Derbala, D., Caloustian, C., Lechner, D. and Gut, I. G. (2002) Molecular haplotyping at high throughput. *Nucleic Acids Res*, **30**(19)**,** e96.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Ole Brandt
Geburtsdatum / -ort	10.09.72 in Langenhagen
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulbildung:

1979 – 1983	Grundschule, Mellendorf
1983 – 1985	Orientierungsstufe, Mellendorf
1985 – 1992	Gymnasium, Mellendorf (Abitur: 15. Mai 1992)

Zivildienst:

Juli 1992 – Sept. 1993	Zivildienst als Rettungshelfer beim Roten Kreuz.

Studium:

Okt. 1993 – Okt. 2000	Studium der Biotechnologie an der TU-Berlin
Okt. 1997 – Mai 1998	Studienarbeit bei der metaGen, Gesellschaft für Genomforschung mbH, Berlin. Thema: „Physikalische Kartierung, Shotgun-Sequenzierung und Computeranalysen in der Chromosomenregion 6q25“
Nov. 1999 – Juni 2000	Diplomarbeit am „Centre National de Génotypage“ (CNG) in Evry, Frankreich. Abteilung „Technology Development“ von Dr. Ivo Gut. Thema: "Haplotypisierung mittels Massenspektrometrie". MALDI-TOF-Analyse von SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) zur Geno- bzw. Haplotypisierung, gefördert durch das LEONARDO-Stipendium der EU.

Promotion:

Aug. 2000 – März 2004	Promotion am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg. Abteilung „Funktionelle Genomanalyse“ von Dr. Jörg Hoheisel. Thema: „Markierungsfreie DNA-Mikrochip Analytik“