

## 4. Zusammenfassung

Diese Arbeit konzentriert sich auf neue experimentelle Strategien der "Oligonukleotid-Fingerprinting"-Technik (OFP). Beim OFP werden DNA Klone durch serielle Hybridisierungen mit kurzen (8-10meren) Oligonukleotiden sequenzabhängig markiert. Ein Problem dabei ist die relativ geringe Wahrscheinlichkeit, mit der ein Oligonukleotid mit einem zu analysierenden Klon hybridisiert. Daher muß eine große Anzahl von Hybridisierungen mit unterschiedlichen Oligomeren durchgeführt werden, um einen Klon in einer Genbank ausreichend zu charakterisieren und zu identifizieren. Durch die Verwendung von kürzeren Oligonukleotiden könnte dieses Problem gelöst werden, jedoch bilden kürzere Oligomere keine ausreichend stabilen Hybride. Das Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einsatz von Peptidnukleinsäuren (PNAs) als Hybridisierungs sonden zu etablieren.

Eine weitere Aufgabe war es, die Spezifität der Hybridisierung zu erhöhen, um die Diskriminierung zwischen komplementären und nicht perfekt komplementären DNAs zu verbessern. Eine redundante Genbank mit Klonen bekannter Sequenz wurde verwendet, um durch detaillierten Vergleich der Hybridisierungsdaten mit den Sequenzen die Reproduzierbarkeit und Spezifität der Hybridisierungen zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurde eine neue graphische Analysemetode entwickelt, die es erlaubt, die Reproduzierbarkeit von Oligonukleotid-Hybridisierungen aufgrund der empirisch ermittelten Singnalstärken abzuschätzen. Außerdem konnte diese Methode für einen Vergleich von DNA und PNA-Hybridisierungen und zur Ermittlung der Spezifität einer Hybridisierung genutzt werden.

Innerhalb dieser Arbeit wurde außerdem eine alternative Methode nicht-radioaktiver Markierung von DNA Oligonukleotiden entwickelt und anschließend auf PNAs übertragen. Da die meisten Fluoreszenzmarkierungen bei Verwendung von Nylonmembranen als DNA-Trägermaterial ein starkes Hintergrundrauschen erzeugen, ist eine Signalverstärkung, z. Bsp. durch eine Enzymreaktion, erforderlich. In einer solchen, neuen Markierungsmethode wurde alkalische Phosphatase über Streptavidin bereits vor der Hybridisierung an ein biotinyliertes 10mer gekoppelt und über Chemilumineszenz nachgewiesen. Es wurde gezeigt, daß durch diese schnelle, empfindliche und lineare Markierungs- und Detektionsmethode eine mit konventionell radioaktiv markierten Oligonukleotiden vergleichbare Sensitivität und Spezifität erreicht werden konnte. Die Hybridisierungseigenschaften des Oligos wurden durch den großen Enzymkomplex nicht nachweisbar beeinträchtigt.

Ein speziell entworfenes Set von 8-mer PNA-Sonden mit unterschiedlicher Basenzusammensetzung und unterschiedlichen Modifikationen wurde synthetisiert, um die Spezifität und Hybridisierungseigenschaften der PNAs sowie die vorhergesagten Interaktionen mit DNA in beiden Orientierungen zu untersuchen. Es wurde gezeigt, daß Identität und Hybridisierungseigenschaften von PNAs durch SDS-PAGE untersucht werden können.

Die Hybridisierungseigenschaften von Protein-konjugierten PNAs wurden detailliert durch Hybridisierung auf die redundante "Modell-Genbank" untersucht. Interessanterweise zeigte die optimale Hybridisierungstemperatur eine Abhängigkeit vom Purin (A+G)-Gehalt der PNAs, und variierte zwischen +8 und +45°C. Die Hybridisierungsrate und Stabilität der Hybride war bei PNA-Proben deutlich höher als bei DNA-Oligos. Aus den erhaltenen Daten kann man schließen, daß die PNAs mit DNA in gegenläufiger, aber auch in paralleler Richtung hybridisieren. Nicht-Watson-

Crick-Paarungen treten bei DNA- und PNA-Oligonukleotiden in übereinstimmender Weise auf und sind von der Basenzusammensetzung des Oligonukleotids abhängig.

Die Daten aus den Hybridisierungen der redundanten "Modell-Genbank" wurden dazu benutzt, die Klone entsprechend ihrer "Fingerprints" in Klustern zusammenzufassen. Dabei zeigten die PNA-Proben eine bessere Anwendbarkeit als die DNA-Proben, da die Qualität der Kluster höher war, was umgekehrt bedeutet, daß weniger Hybridisierungen notwendig sind, um die Genbank vergleichbar zu normalisieren.

Ein weitere Anwendungsmöglichkeit von PNAs beim OFP ist die Kombination von PNA-Proben und MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation) "time of flight"-Spektrometrie, für die keine Markierung der Probe erforderlich ist. Modellexperimente mit multiplexen PNA-Hybridisierungen auf DNA, die an paramagnetische Partikel gebunden wurde, wurden durchgeführt.

## 5. Summary

This study was focused on new experimental approaches to oligonucleotide fingerprinting (OFP) technology. In OFP DNA clones are characterised by sequence signatures which are generated in serial hybridisations with short 8-10mer DNA oligonucleotides. One of the major problems of the existing approach is the low frequency of oligonucleotide hybridisation to analysed clones, so in order to provide enough information for DNA characterisation it is necessary to hybridise a large number of probes. The use of shorter probes could overcome this drawback, however, DNA oligonucleotides form relatively unstable duplexes in hybridisation. The aim of this work was to implement for OFP the use of PNA (peptide nucleic acid), DNA analogues of improved properties, oligonucleotide probes.

Another challenge was to improve the specificity of hybridisation, the ability of oligonucleotides to distinguish between complementary and non-complementary DNAs. The detailed analysis of oligonucleotide fingerprints of clones in a redundant library of clones of known sequence was performed to examine reproducibility of interaction between a given oligonucleotide and clones of the similar sequence. A new graphical method which describes the reproducibility and specificity of hybridisation of a single oligonucleotide with redundant DNA clones based on the hybridisation intensity values from experiment was introduced. Further this method was used for comparison of PNA and DNA hybridisation and for the estimation of hybridisation specificity.

In the course of this work an alternative method of non-radioactive labelling was established with DNA oligonucleotides and then applied to PNAs. Since most of the existing fluorescent labels have a low signal to background ratio if nylon membranes are used as a support of DNA immobilisation, a method involving signal amplification, e.g. with an enzyme, had to be used. A new method of direct labelling with Alkaline Phosphatase via streptavidin-biotin link was introduced to label biotinylated 10-nt-long oligonucleotides. This method was shown to provide quick, sensitive and linear detection by chemiluminescence. It was fully comparable to conventional radioactive detection. Importantly, hybridisation properties of 10-nt-long DNA probes coupled with the bulky enzyme molecule were not affected. Further this strategy was applied to label PNAs, and could be extended to the use of Phycoerythrin fluorescent label and laser scanner detection. Importantly, the fluorescent labelling which is suitable for automation of the DNA libraries analysis, gave consistent results (sensitivity and reproducibility of detection) only with the PNA probes.

A specially designed set of 8-mer PNA probes of different nucleobase content and modifications was synthesised to investigate specificity and hybridisation properties of PNA and to test hypothesised specificity and interactions with DNA in both possible for PNA orientations. In this work it was shown that PNA identity and hybridisation properties can be assayed by SDS-PAGE.

Hybridisation properties of protein-conjugated PNA were studied in detail using a model redundant DNA library. Interestingly, optimal hybridisation temperature was found to be dependent on purine (A+G) content of the PNA. The hybridisation rate and stability of PNA probes were considerably higher than that of DNA probes. Data

obtained suggests that PNA hybridises in both anti- and parallel orientations. However, the pattern of non Watson-Crick interaction with DNA showed to be very similar for PNA and DNA probes of the same 8-mer core. This points out the importance of the nucleic base component in non-specific DNA-DNA interactions.

The data obtained in OFP of a model library with PNA probes were used in clustering of the clones based on their fingerprints. The PNA probe set showed a better performance compared to a DNA set of the same size, because resulted in a better cluster quality which suggests that a smaller number of PNA probes compared to DNA is sufficient for the same quality of library characterisation by OFP.

A further aspect of PNA application to OFP is the combination of PNA probes and MALDI (matrix-assisted, laser desorption/ionisation) time-of-flight spectrometry detection of hybridisation, which requires no probe labelling. Model experiments with multiplex PNA hybridisation to the DNA bound to magnetic beads were performed, showing a single mismatch discrimination in the system of 5 probes hybridised together.