

2. Zusammenfassung

Oligonukleotid-Fingerprinting (OFP) ist eine sehr leistungsfähige Methode der Charakterisierung und Normalisierung von sowohl cDNA Bibliotheken als auch genomischen Bibliotheken. Mittels des durch OFP zu erreichenden hohen Normalisierungsgrades können nicht redundante "unigene" Sets für einen Organismus bzw. ein bestimmtes Gewebe erzeugt werden. Diese sind nicht nur eine sehr wertvolle Ressource für weiterführende experimentelle Anwendungen, sondern stellen auch einen wichtigen Schritt in Richtung funktioneller Sequenzanalyse dar.

Bestehende technologische Limitierungen, wie z.B. die benötigte große Anzahl an Oligonukleotid-Sonden und die Beschränkung auf serielle Hybridisierungen, verhindern jedoch einen höheren Durchsatz und somit breiteren Einsatz von OFP als Werkzeug zur DNA Charakterisierung.

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war die Überwindung dieser Limitierungen sowie die Schaffung eines innovativen technologischen Fundaments für OFP. Durch die Anwendung von multiplex Peptid-Nukleinsäure (PNA) Hybridisierungen und Matrix-unterstützter Laserdesorption/Ionisierung-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) als Detektionsmittel sollte die Methode zu einem Verfahren mit hohem Grad an Multiplexing entwickelt werden.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden mehrere Charakteristika von PNA Hybridisierungen mit anschließender MALDI-TOF MS Analyse untersucht, die zu neuen Erkenntnissen führten. So konnte gezeigt werden, daß durch die Verwendung von PNA Oligonukleotiden die Länge der Hybridisierungssonden reduziert werden kann und Hexamere als Sonden eingesetzt werden können. Dadurch ist es möglich, die Gesamtmenge an für ein OFP Projekt benötigten Hybridisierungssonden erheblich zu senken. Ferner konnte aufgezeigt werden, daß aufgrund positiven "charge taggings" von PNA ein beispielloser Grad an Multiplexing erreichbar ist. 21 unterschiedliche PNA Oligonukleotide wurden gleichzeitig hybridisiert und erfolgreich detektiert. Darüber hinaus konnte in einer extensiven Pilotstudie an ausgewählten cDNA Klonen und genomischen Klonen die Machbarkeit des multiplex OFP Konzepts bewiesen werden. Des Weiteren wurden mehrere potentielle Substrate und DNA Anbindungsstrategien hinsichtlich ihrer Eignung als Bestandteil eines MALDI-TOF MS kompatiblen DNA Immobilisierungssystem evaluiert, von denen die auf Nylonmembran und Polyamidoamin-Dendrimern basierenden Systeme ein vielversprechendes Potential besitzen.

Durch eine weitere Optimierung der Erstellung von PNA Hybridisierungssonden-Sets sowie eine vollständige Automatisierung des gesamten Verfahrens wird erwartet, daß

multiplex OFP als Routineanwendung mit einem im Vergleich erheblich erhöhten Durchsatz etabliert werden kann.