

2. Zusammenfassung

Oligonukleotid Fingerprinting (OFP) ist eine attraktive Alternative zu TAG-Sequenzierungsmethoden zur Bestimmung vorhandener Gene in genomischer DNA und cDNA Bibliotheken im Hochdurchsatz. Diese Methode basiert im Moment auf der sequentiellen Hybridisierung von mindestens 200 kurzen (8–12 Nukleotide) radioaktiv markierten Oligonukleotiden, um dsDNA aufzureihen. Basierend auf den Hybridisierungssignalen wird nach einer Bildanalyse für jeden Klon ein Sequenz-Fingerprint erstellt. Mit Hilfe von Cluster-Algorithmen können dann Fingerprints mit großer Ähnlichkeit zusammengefaßt werden.

Ein Problem der aktuellen Methodik stellt die hohe Anzahl benötigter Oligonukleotide und die verwendete Radioaktivität dar. In dieser Arbeit wurden die hohe Affinität und zugleich gute Diskrimination von sogenannten Locked Nucleic Acid (LNA) untersucht, um die Anzahl der benötigten Oligos und deren Länge zu reduzieren. Zusätzlich wurden zur Vermeidung von Radioaktivität kurze (Hexamere oder Heptamere), modifizierte LNA's benutzt, die einen fluoreszierenden Farbstoff trugen (z.B. Cy5). Die Ergebnisse wurden mit einer für diesen Zweck entwickelten CCD-Kamera aufgenommen. Die Empfindlichkeit der Fluoreszenzbestimmung diese Methode sorgt dafür, dass sowohl in Lösung befindliche Assays als auch solche auf Nylon-Membranen verwendet werden können. Dadurch ist die Datenqualität verbessert, der Prozeß ist einfacher, schneller und damit auch billiger.

2.1 Oligonukleotid Fingerprinting in Kombination mit der iFRET Technologie

Es wurde eine Methode zur Analyse von DNA Bibliotheken durch Hybridisierung von kurzen (6-7 Nukleotide) fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden entwickelt. Dabei kann die Hybridisierung in Echtzeit optisch mit Hilfe der Induzierten Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (iFRET) Technologie verfolgt werden. Bei Hybridisierung wird durch den Fluoreszenzfarbstoff ein vorhandener interkalierter Farbstoff zum Leuchten angeregt. Auf diese Weise ist es nicht nötig, den Überschuss von Oligoproben, die nicht reagiert haben, zu entfernen. Des weiteren wird die Immobilisierung der analysierten Bibliothek vermieden. Sie ist damit unabhängig von der Kapazität zur Oberflächenbindung oder der chemischen DNA-Immobilisierung und benötigt einzig ein präzises Dispensieren der Oligoprobe und des Targets. Somit

kann das Assay vollständig in einer Lösung für konventionelle OFP-Analysen durchgeführt werden, in Micro-Tropfen oder Nano-Well-Anordnung („nano-well array“) Format.

Die Länge der Hybridisierungs-Oligoproben wurde auf Hexamere reduziert, was die Verwendung einer geringere Gesamtzahl von Oligoproben und bessere Unterscheidungen bei der Fehleranpassung ermöglicht. Ferner wurde durch die Miniaturisierung des Hybridisationsprozessen in ein Nano-Well Format und durch den optischen Nachweis der Hybridisation durch iFRET der Durchlauf des Systems in Hinblick auf die mögliche Anzahl der Klone, die in einem Einzelexperiment analysiert werden können, deutlich gesteigert. Die Miniaturisierung des Systems und der optische Signalnachweis führt außerdem zu einer signifikanten Reduzierung der Kosten für die Analysierung der Proben. Die Datenübertragung des Assays kann durch die Verwendung unterschiedlich gekennzeichnete spezifischer Oligoproben in der gleichen Lösung erreicht werden. Die Herstellung eines Universalsets von Genotypisierungsreagenzien wird ermöglicht durch die Verwendung von extrem kurzen LNA-modifizierten Oligoproben.

2.2 Oligonukleotid Fingerprinting durch Verwendung einer Nanoporen-Nylonmembran.

Neben des weiteren Ausbaus der nicht-radioaktiven Technik wurde eine widerstandsfähige Methode für den Nachweis von Hybridisationsereignissen entwickelt, die ein Microarray-basiertes Assay auf der Plattform einer Nanoporenmembran verwendet. Grundlegende Grenzen von Standardarrays auf Glasobjektträgern wie geringe Bindungskapazität, geringe Signalstärke, begrenzte Wiederverwendung der Arrays und lange Fertigungszeiten konnten überwunden werden. Der Einsatz von LNA-modifizierten Oligoproben verbesserte die Hybridisierungs-Sensitivität und erlaubt dadurch den Gebrauch von kurzen Oligoproben, was die Gesamtanzahl von Oligoproben für dsDNA-Charakterisierung reduziert.

Die Technik ist gekennzeichnet durch eine Hybridisierungszeit von weniger als einer Stunde und dem Gebrauch von Cy5-markierten Heptamer-Oligoproben, modifiziert mit sogenannten Locked Nucleid Oligos (LNA) Nukleotiden. Die Menge an DNA, die auf eine Nanoporen-Membran gespottet wird, konnte bei nachweisbarer Signalstärke auf ca. 4 nl reduziert werden. Darüber hinaus konnte die Menge des

DNA Targets auf 4 fmol reduziert werden. Die Objektträger konnten für mindestens 19 Mal erfolgreich gereinigt und erneut mit Proben beladen werden, ohne signifikanten Verlust der Signalintensität.

In einer Studie zur prinzipiellen Beweisführung wurden 26 unterschiedliche LNA-modifizierte Heptamer-Oligoproben mit einem Set von 66 zufällig ausgewählten auf einem Nanoporen-Membran-Objektträger gespotteten, menschlichen, genomischen DNA-Klonen hybridisiert. Die Leistungsfähigkeit der Methode wurde ausgewertet durch eine Sensitivitätsanalyse unter Verwendung von sogenannten „Receiver Operating Characteristic“ (ROC) -Kurven. Die Effizienz der Hybridisierung der LNA-modifizierten und nicht-modifizierten Heptamere wurde verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass LNA-Modifikationen die Empfindlichkeit und Spezifität der Hybridisierung deutlich verbessern. Um die Effizienz der Anhäufung („Clustering“) LNA-modifizierten Oligoproben de novo zu testen wurden Hybridisierungsmuster basierend auf Clustering, hergestellt und mit in silico Clustering verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die Anwendung von LNA-modifizierten Oligoproben das zuverlässige Clustern von DNA-Sequenzen ermöglicht.

Die beschriebene Anwendung dürfte dafür sorgen, den Durchlauf von Techniken, basierend auf OFP durch Herabsetzen der Anzahl von Oligoproben, die für die Analyse von großen Klonsets nötig sind, und durch Reduzierung des Verbrauchs an Proben und Reagenzien, deutlich zu verstärken. Die Methode ist vor allem von Vorteil wenn große Mengen hybridisierungsbasierter Assays für die Charakterisierung von Probensets von 100.000 und mehr erstellt werden müssen.