

Analytische Chemie

**Neue Fluorophore für die Bioanalytik –
Verwendung in der Tierartendifferenzierung mittels
DNA-Biosensor und DNA-Chiptechnologie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Viola Podsadlowski
aus Marl
- 2004 -

Dekan: Prof. Dr. J. Leker

Erster Gutachter: Prof. Dr. K. Cammann

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. B. Krebs

Tag der mündlichen Prüfungen: 12., 14., 16. 07. 2004

Tag der Promotion: 16.07.2004

Für meine Eltern.

Inhaltsverzeichnis

1	THEORETISCHER TEIL	1
1.1	Allgemeine Einleitung	1
1.2	Fluoreszenzfarbstoffe	2
1.2.1	Fluoreszenz allgemein.....	2
1.2.2	Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen in der Bioanalytik	5
1.2.2.1	Fluoreszenztechniken in der Bioanalytik allgemein	5
1.2.2.2	Fluoreszenztechniken in der DNA-Analytik.....	5
1.2.3	Fluorophore - Stand der Technik	6
1.2.3.1	Fluorophore für die Bioanalytik	6
1.2.3.2	Cyaninfarbstoffe	7
1.2.3.3	Die Oysterfarbstoffe der Denovo Biolabels GmbH	9
1.2.4	Fluorophor-DNA-Konjugate: Synthese und charakteristische Eigenschaften.....	10
1.3	Nukleinsäureanalytik mit DNA-Chips und DNA-Biosensoren	13
1.3.1	Nukleinsäureanalytik mit DNA-Chips	13
1.3.2	DNA-Biosensoren - Überblick.....	14
1.3.2.1	Biosensoren allgemein	14
1.3.2.2	Das Prinzip der DNA-Biosensoren	15
1.3.3	Der DNA-Biosensor des ICB	16
1.3.3.1	Theoretische Grundlagen	17
1.3.3.2	Kinetik der Hybridisierung.....	18
1.3.3.3	Aufbau des Messgerätes	20
1.3.3.4	Aufbau des Sensorchips.....	21
1.3.4	Entwicklung eines neuen DNA-Biosensor-Chipreaders mit höherem Automatisierungsgrad	22
1.4	Tierartendifferenzierung in der Lebensmittelanalytik und in der Forensik	25
1.4.1	Tierartendifferenzierung in der Lebensmittelanalytik	25
1.4.2	Tierartendifferenzierung in der Forensik	27
2	ZIEL DER ARBEIT	30
3	ERGEBNISSE	31
3.1	Synthese neuer <i>spiro</i>-Cyanine	31
3.1.1	Einleitung.....	31
3.1.2	Synthese von <i>spiro</i> -Piperidylcyaninen	32
3.1.3	Synthese weiterer Cyanin-Farbstoffe.....	40
3.1.3.1	Synthese von Stearylfarbstoffen.....	40
3.1.3.2	Synthese von <i>spiro</i> -Cyclopentylfarbstoffen	41
3.1.3.3	Farbstoffe mit nicht indolischen Kopfgruppen.....	43

3.2	Charakterisierung der Fluorophore und der DNA-Konjugate	45
3.2.1	Eigenschaften der <i>spiro</i> -Cyaninfarbstoffe	45
3.2.1.1	Wasserlöslichkeit	45
3.2.1.2	Absorptions- und Emissionsmaxima	47
3.2.1.3	Intrinsische Fluoreszenz	51
3.2.1.4	Solvatochromie	56
3.2.1.5	Modellchemische Berechnungen	56
3.2.2	Kopplung von Fluorophoren an Amino-modifizierte DNA	57
3.2.3	Eigenschaften der DNA-Farbstoff-Konjugate	59
3.2.3.1	Eigenschaften der DNA-Farbstoff-Konjugate in Lösung	59
3.2.3.2	Festphasenfluoreszenz der DNA-Farbstoff-Konjugate	60
3.3	Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifikation und Markierung von DNA	63
3.4	Tierartendifferenzierung mittels Realzeithybridisierung im DNA-Biosensor	66
3.4.1	Charakteristische Eigenschaften des DNA-Biosensors	66
3.4.2	Entwicklung neuer Sonden	73
3.4.2.1	Sequenzdatenverarbeitung	73
3.4.2.2	Spezifität der neuen Sonden	76
3.4.3	Messung von Realproben im DNA-Biosensor	81
3.4.3.1	Messung von Fleischprodukten	81
3.4.3.2	Messung von Milchprodukten	84
3.4.3.3	Messung von Proben aus der Forensik	87
3.4.4	Charakterisierung des neuen DNA-Biosensor-Chipreaders	90
3.5	Tierartendifferenzierung mit konventioneller DNA-Chiptechnologie	93
3.5.1	Spezifität der Sonden	93
3.5.2	Messung von Realproben auf konventionellen Chips	96
3.6	Anwendung der neuen <i>spiro</i>-Cyanine in der DNA-Analytik	98
3.6.1	Messung der <i>spiro</i> -Cyanine am DNA-Biosensor	99
3.6.2	Messung der <i>spiro</i> -Cyanine auf konventionellen DNA-Chips	101
4	DISKUSSION	103
4.1	Synthese und Charakterisierung der neuen Fluorophore	103
4.2	Tierartendifferenzierung in der Lebensmittelchemie und Forensik	116
4.3	Verwendung der neuen Fluorophore im Biosensor und auf DNA-Chips	129
5	ZUSAMMENFASSUNG	131

6	EXPERIMENTELLER TEIL	136
6.1	Geräte, Materialien, Chemikalien	136
6.1.1	Organisch synthetische Methoden.....	136
6.1.2	Molekularbiologische und analytische Methoden	138
6.1.3	Referenz- und Realproben zur Tierartendifferenzierung.....	141
6.2	Molekularbiologische Methoden	145
6.2.1	Sequenzdatenverarbeitung.....	145
6.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	145
6.2.3	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE).....	146
6.2.4	Markierung von PCR-Produkten mit Fluorophoren	146
6.3	Charakterisierung der Fluorophore und Konjugate	147
6.3.1	Absorptionsspektren	147
6.3.2	Emissions- und Anregungsspektren	147
6.3.3	Festphasenfluoreszenz.....	148
6.4	Realzeithybridisierung im DNA-Biosensor	149
6.4.1	Herstellung der DNA-Biosensor-Chips	149
6.4.2	Durchführung der Messungen	150
6.4.3	Auswertung einer Messung	152
6.4.4	Messung am neuen DNA-Biosensor-Chipreader.....	152
6.5	Konventionelle Chiphybridisierung	153
6.5.1	Hybridisierung unter dem Deckgläschen	153
6.5.2	Auslesen der hybridisierten Glasobjektträger	155
6.5.3	Auswertung der Fluoreszenzbilder	155
6.6	Synthese der Fluorophore	156
6.6.1	Synthese der Methylketon-Vorstufen.....	156
6.6.2	Indolsynthesen.....	161
6.6.3	Synthese von quaternären Indolen.....	167
6.6.3.1	Synthese von Quaternierungsmitteln.....	167
6.6.3.2	Synthese von quaternären, nicht-sulfonierten Indolen.....	169
6.6.3.3	Synthese von quaternären, sulfonierten Indolen	176
6.6.4	Synthese der <i>spiro</i> -Cyanine	183
6.6.4.1	Synthese der Hemicyanine.....	183
6.6.4.2	Synthese symmetrischer <i>spiro</i> -Cyanine	186
6.6.4.3	Synthese unsymmetrischer <i>spiro</i> -Cyanine	192
6.6.5	Synthese von Farbstoffen mit nicht indolischen Kopfgruppen	199
6.6.6	Aktivierung von Farbstoffen	205
7	ANHANG	207
7.1	Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide	207
7.2	Sequenzvergleich des CytB-Gens verschiedener Spezies	208
8	LITERATUR	210

Abkürzungsverzeichnis

Bf	Büffel
Boc	ter.-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
BSE	Bovine Spongiformen Enzephalopathie
Cbz	Carboxybenzyl-Schutzgruppe
CCD	<i>Charge coupled device</i>
CLSM	Konfokale Laser scanning Mikroskopie
CVUA	Chemisches Landes- und staatliches Veterinäruntersuchungsamt
CytB	Cytochrom B - Gen
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
Dh	Damhirsch
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EET	elektronischer Energietransfer
ELISA	Enzymimmunoassay (<i>enzyme-linked immuno sorbent assay</i>)
ET	Elektronentransfer
FA	Formamid
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
H	Huhn
Ha	Hase
Hk	Hauskaninchen
Hu	Hund
IC	interne Konversion (<i>internal conversion</i>)
ICB	Institut für Chemo- und Biosensorik GmbH, Münster
ISC	<i>inter system crossing</i>
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LMBG	Lebensmittel und Bedarfsgegenstände Gesetz
LP	Laser Power
Me	Mensch
MOZ	Methoxyphenylcarbammat-Schutzgruppe
MW	Mittelwert
NG	Nachweisgrenze

NHS	N-Hydroxysuccinimid
NRK	<i>normal rat kidney</i>
nt	Nukleotid
NW	Nachweiswahrscheinlichkeit
P	Pute
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pf	Pferd
PMMA	Polymethacrylsäuremethylester
PMT	Lichtdetektor (<i>photomultiplier tube</i>)
PVC	Polyvinylchlorid
R	Rind
RFLP	Restriktionslängenpolymorphismus
Rh	Rothirsch
Re	Reh
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Sensitivität
S	Schwein
S _x	Singulettzustand
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
Sf	Schaf
Sh	Sikahirsch
SSC	Citrat gesättigte Kochsalzlösung (<i>saline saturated citrate</i>)
STR	Mikrosatellit (<i>short tandem repeat</i>)
T _x	Triplettzustand
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
UH	Ultrahyb TM
UV	ultraviolett
VE	voll entsalzt
Wk	Wildkaninchen
Ws	Wildschwein
Z	Ziege

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Elektronische Spektren und JABLONSKI-Diagramm für Chlorophyll	2
Abbildung 2: Mögliche Relaxationsprozesse eines Moleküls aus dem S_1 -Zustand . . .	3
Abbildung 3: Spiegelsymmetrie zwischen Absorptions- und Fluoreszenzspektrum . . .	4
Abbildung 4: Allgemeine Struktur eines Di-Indol-Cyanins.	7
Abbildung 5: Cyaninfarbstoffe Cy3 und Cy5 mit charakteristischen Sulfonsäuregruppen.	8
Abbildung 6: Dimerenbanden bei Kopplung von Cy3 (zwei Sulfonsäuregruppen) und Cy3NOS (eine Sulfonsäuregruppe) an DNA.	8
Abbildung 7: Oy656, ein Farbstoff der Oyster-Serie der Firma Denovo-Biolabels als monofunktionelles NHS-Derivat.	9
Abbildung 8: Zufällige Synthese eines spiro-Cyanins.	10
Abbildung 9: Phosphoramiditchemie zum Markieren von DNA.	11
Abbildung 10: Ausschnitt aus einem typischen konventionellen DNA-Chip.	13
Abbildung 11: Evaneszentes Feld zur Anregung von Fluorophoren im DNA-Biosensor.	17
Abbildung 12: Verlauf der Hybridisierung mit Assoziation, Gleichgewicht und Dissoziation.	19
Abbildung 13: A: Aufbau des DNA-Biosensor Auslesegerätes. B: Zentrales optisches Bauteil im geöffneten Zustand.	20
Abbildung 14: Immobilisierung von aminomodifizierten Oligonukleotid-Fangsonden auf Glasoberflächen: Ablauf der chemischen Modifikation der Glaschips.	21
Abbildung 15: Einzelkomponenten und fertiger DNA-Biosensor-Chip.	22
Abbildung 16: Photos des neuen DNA-Biosensor-Chipreaders.	23
Abbildung 17: Automatisierte Probenaufnahme am neuen DNA-Biosensor-Chip-Reader.	24
Abbildung 18: Grundstruktur der Hetero-spiro-Cyanine.	31
Abbildung 19: Allgemeines Syntheschema zur Darstellung von Piperidylcyaninen.	33
Abbildung 20: Austausch des Gegenions der Sulfonsäuregruppe.	35
Abbildung 21: Unsymmetrischer Piperidylfarbstoff mit nur einer spiro-Gruppe.	35
Abbildung 22: Schutzgruppenwechsel von Cbz zu Boc.	36
Abbildung 23: Derivatisierung des quarternären Indols mit Bromessigsäure.	38
Abbildung 24: Piperidylfarbstoff für die Kopplung an Biomoleküle über die spiro-Piperidylgruppe.	38
Abbildung 25: Drei bisher nicht erfolgreiche Synthesewege zur Derivatisierung des Piperidylamins mit Iodhexansäure.	39
Abbildung 26: Asymmetrischer Piperidylfarbstoff, mit hoher Wasserlöslichkeit und sehr kurzem Anregungsmaximum.	40
Abbildung 27: Stearylfarbstoffe in roter ($n = 1$) und blauer ($n = 2$) Form zum Färben von Zellmembranen.	41
Abbildung 28: CLSM-Aufnahmen von NRK-Zellen, deren Zellmembranen mit dem Stearylfarbstoff gefärbt wurden.	41
Abbildung 29: Synthese von spiro-Cyclopentylfarbstoffen.	42
Abbildung 30: Farbstoffe mit anderen Kopfgruppen als Indolen.	44
Abbildung 31: HPLC-Chromatogramm des Piperidylfarbstoffes Pip.	46
Abbildung 32: Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge bei Oy656.	47

Abbildung 33: Das Absorptionsmaximum verschiebt sich in Abhängigkeit vom sterischen Anspruch der Substituenten.	50
Abbildung 34: Absorptionsspektren verschiedener Piperidylfarbstoffe im Vergleich zu Cy5 (647 nm) und Oy656 (657 nm).	51
Abbildung 35: Zusammenhang zwischen Zahl der spiro-Substituenten und der resultierenden Fluoreszenzintensität.	52
Abbildung 36: Fluoreszenzintensität zweier Pentylfarbstoffe und Oy656 im Vergleich.	53
Abbildung 37: Vergleich der Fluoreszenzintensität eines Cbz-geschützten Piperidylfarbstoffes mit Cy5 und Oy656.	54
Abbildung 38: Fluoreszenzintensität eines Ethyl-substituierten Piperidylfarbstoffes.	55
Abbildung 39: Fluoreszenzintensität eines Piperidylfarbstoffes und Oy656 im Vergleich.	55
Abbildung 40: NHS-aktivierter Piperidylfarbstoff (Pip) für die Markierung von DNA.	57
Abbildung 41: Absorptionsspektren verschiedener DNA-Farbstoffkonjugate.	58
Abbildung 42: Fluoreszenzspektren der freien Farbstoffe und der DNA-Konjugate im Vergleich.	59
Abbildung 43: Fluoreszenzintensität der freien Farbstoffe und der Konjugate im Vergleich (n = 1).	60
Abbildung 44: Messung der Festphasenfluoreszenz der freien Farbstoffe und der Konjugate im Vergleich nach Spotten auf Objektträger.	61
Abbildung 45: Festphasenfluoreszenz der freien Farbstoffe und der DNA-Konjugate im Vergleich.	61
Abbildung 46: Gelelektrophorese der PCR-Produkte verschiedener DNA-Extrakte.	64
Abbildung 47: PAGE-Gel der PCR einer Blutspur des Instituts für Rechtsmedizin mit und ohne Zugabe von BSA.	65
Abbildung 48: Kalibration mit Rind-Target-DNA.	66
Abbildung 49: DNA-Biosensormessung von Rind-DNA als Beimengung in Huhn-DNA.	68
Abbildung 50: Reproduzierbarkeit der Messergebnisse.	69
Abbildung 51: End- und Steigungsbild eines 10x10 Huhn-Arrays mit 1 mm Spotabstand und zugehörige numerische Ergebnismatrix nach Messung einer Huhn-Targetlösung (1nM).	70
Abbildung 52: Assoziations- und Dissoziationsphase der Hybridisierung der Targets an die Sonden.	71
Abbildung 53: Kalibrationsgerade für Damhirsch-PCR-Produkt.	72
Abbildung 54: Entwicklung einer Kaninchen-Sonde mit Hilfe der Matlabroutine.	75
Abbildung 55: Charakterisierung der neuen Ziege-Sonde (Z690) mit Referenz-DNA.	77
Abbildung 56: Variation des Formamidgehaltes bei der Messung von Wildtier-PCR-Produkten.	78
Abbildung 57: Kreuzhybridisierung von Schaf- und Ziege-PCR-Produkten an der Rothirschsonde Rh629.	80
Abbildung 58: Analyse von Fleischprodukt-Realproben.	84
Abbildung 59: Messung von Käseproben K-11 (Schafskäsecreme) und K-4 (Picodon).	86
Abbildung 60: Messung von Realproben aus der Forensik.	89
Abbildung 61: Kalibration mit Rind-Target am neuen DNA-Biosensor-Chipreader.	90
Abbildung 62: Reproduzierbarkeit der Messergebnisse über 7 Messungen an Rind-(R1-R3) und Huhnsots (H1-H3) am neuen DNA-Biosensor-Chipreader.	91

<i>Abbildung 63: Ausleuchtungsprofil des neuen DNA-Biosensor-Chipreaders.</i>	<i>92</i>
<i>Abbildung 64: Messung einer Realprobe am neuen DNA-Biosensor-Gerät</i>	<i>93</i>
<i>Abbildung 65: Spezifität der Sonden auf konventionellen Chips.....</i>	<i>95</i>
<i>Abbildung 66: Spezifität der Reh- und Rothirschsonden auf konventionellen Chips. 96</i>	
<i>Abbildung 67: Messung einer Käseprobe auf konventionellen DNA-Chips.</i>	<i>97</i>
<i>Abbildung 68: Vergleich der Steigungswerte bei Messung von DNA-Konjugaten verschiedener Farbstoffe am DNA-Biosensor.</i>	<i>100</i>
<i>Abbildung 69: Vergleich verschiedener DNA-Farbstoffkonjugate auf konventionellen DNA-Chips.</i>	<i>101</i>
<i>Abbildung 70: Elektronische Vorgänge bei Absorption und Emission.</i>	<i>111</i>
<i>Abbildung 71: Struktur der Alexa-Farbstoffe bei Kopplung über die 3-Position des Indols.....</i>	<i>114</i>
<i>Abbildung 72: Absorptions- und Fluoreszenzspektren von Alexa Fluor 647- und Cy5- DNA-Konjugaten im Vergleich.....</i>	<i>114</i>
<i>Abbildung 73: Vorschlag für einen sehr hydrophilen Piperidylfarbstoff.....</i>	<i>115</i>
<i>Abbildung 74: Dispensiermuster bei Messung der Festphasenfluoreszenz.</i>	<i>148</i>
<i>Abbildung 75: Positionierung des Sondenarrays auf den Glasobjektträgern der DNA- Sensorchips.....</i>	<i>150</i>
<i>Abbildung 76: Sondenimmobilisierung bei konventioneller Chiphybridisierung</i>	<i>154</i>

1 Theoretischer Teil

1.1 Allgemeine Einleitung

Die Fluoreszenzspektroskopie ist eine verbreitete Methode zur Detektion und Quantifizierung unterschiedlicher Analyten sowohl in der klassischen, chemischen Analyse als auch in den verschiedenen Bereichen der „*life sciences*“ [1]. Hier wird sie unter anderem erfolgreich zur Detektion von Proteinen [2, 3] oder DNA (*deoxyribonucleic acid*) [4] eingesetzt und selbst die Lokalisation von Biomolekülen in lebenden Zellen ist möglich [5]. Neben der eigentlichen Fluoreszenzspektroskopie gibt es eine Vielzahl bioanalytischer Assays und Methoden, die ebenfalls auf der Fluoreszenz basieren, wie z. B. die *real time* PCR [6, 7], die Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (Fish) [8] oder die Fluoreszenzmikroskopie [9], um nur einige zu nennen. Da jedoch die wenigsten Biomoleküle eine hohe intrinsische Fluoreszenz zeigen, ist das Markieren der zu untersuchenden Substanzen mit geeigneten Fluorophoren für die Detektion essentiell. Obwohl bereits eine Vielzahl von Fluoreszenz-Markern bekannt und kommerziell erhältlich ist, besteht weiterhin eine große Nachfrage nach neuen Fluorophoren mit verbesserten und für spezielle Anwendungen maßgeschneiderten Eigenschaften. Der Markt in diesem Bereich ist groß und wächst ständig.

Die DNA-Chiptechnologie [10] ist eine der modernen Techniken, die auf der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen basiert. Hier werden immer neue, leistungsfähige Fluorophore mit hohen Quantenausbeuten, langer Fluoreszenzlebensdauer, hoher Wasserlöslichkeit und guter chemischer Beständigkeit benötigt. Mit Hilfe der DNA-Chiptechnologie werden beispielsweise Genexpressionsanalysen durchgeführt oder Punktmutationen nachgewiesen. Neue Anwendungsgebiete für Fluorophore sind auch die Biosensoren, wie z.B. der DNA-Biosensor des ICB (Institut für Chemo- und Biosensorik) [11, 12].

Die Lebensmittelanalytik und die Forensik sind zwei Bereiche, die sich prinzipiell die fluoreszenz-basierte DNA-Chiptechnologie und die DNA-Biosensor-Technik zu Nutze machen könnten. In der Lebensmittelanalytik tritt häufig die Frage nach der Tierartendifferenzierung auf, um die genauen Bestandteile eines Produktes zu identifizieren. Bei forensischen Ermittlungen hingegen kann die Bestimmung der in einer Probe enthaltenen Spezies Hinweise auf den Tathergang geben. Die Tierart wird in beiden Techniken durch die hochspezifische Hybridisierung von bekannten Sonden mit der fluoreszenzmarkierten Proben-DNA bestimmt. Dies bietet neue Möglichkeiten im Vergleich zu den heutigen Methoden wie Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) oder Sequenzierung. Die üblichen Verfahren können durch den Einsatz von Chip- oder Sensortechnologie stark beschleunigt und vereinfacht werden.

1.2 Fluoreszenzfarbstoffe

1.2.1 Fluoreszenz allgemein

In der Literatur gibt es sehr viele Werke, die sich mit der Fluoreszenz beschäftigen und Theorie, Instrumentierung und praktische Anwendungen ausführlich erläutern [13-27]. An dieser Stelle sollen nur ganz kurz die Grundlagen der Fluoreszenz dargestellt werden.

Zuerst wurde der Effekt der Fluoreszenz 1565 an Flussspat beobachtet. BEQUEREL entdeckte 1858 die Phosphoreszenz nach Lichtinduktion an Alkalien und seltenen Erden. Das Entstehen von Fluoreszenz und den verwandten Effekt der Phosphoreszenz beschreibt das JABLONSKI-Diagramm, in dem Energieniveaus und mögliche Übergänge dargestellt sind. Abbildung 1 zeigt beispielweise die Spektren und das JABLONSKI-Diagramm von Chlorophyll.

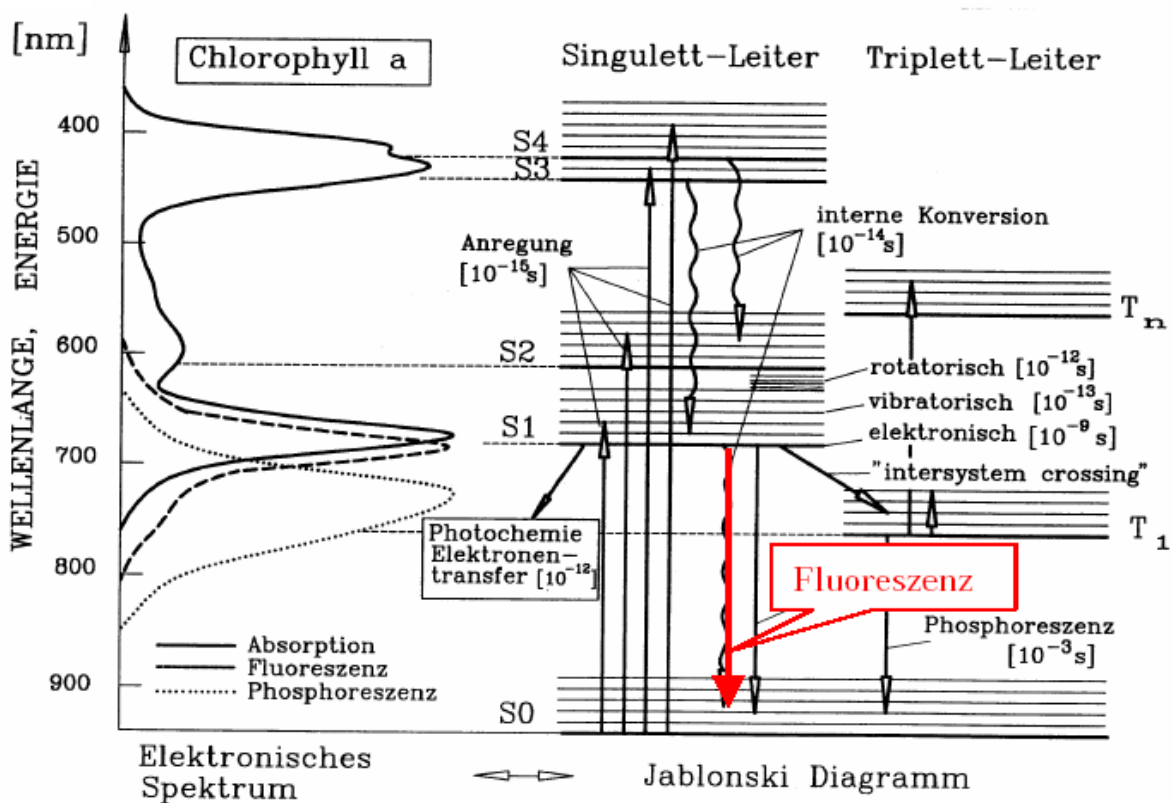


Abbildung 1: Elektronische Spektren und JABLONSKI-Diagramm für Chlorophyll [28].

Fluoreszenz ist nur einer der möglichen Relaxationsprozesse eines Atoms oder Moleküls nach Absorption von elektromagnetischer Strahlung. Bei dieser „strahlenden“ Relaxation wird Energie in Form von Photonen freigesetzt. Konkurrierende, „nicht-strahlende“ Relaxationsprozesse können zu Fluoreszenzlöschung führen. Abbildung 2 zeigt die diversen Relaxationsprozesse eines angeregten Moleküls.

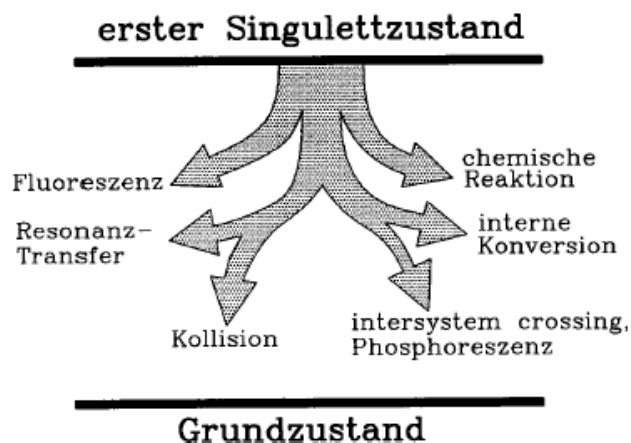


Abbildung 2: Mögliche Relaxationsprozesse eines Moleküls aus dem S_1 -Zustand [28].

Die einfachste Art, die aufgenommene Energie wieder abzugeben ist die Kollision mit anderen Molekülen, wobei Wärme frei wird. Die interne Konversion (IC, *internal conversion*) ist ein schneller Übergang aus elektronisch höheren Zuständen in Tiefere und erfolgt isoenergetisch in hochliegende vibronische Zustände des tieferen elektronischen Zustandes. Es folgt vibronische Relaxation (Wärme). Die interne Konversion für Übergänge von S_n nach S_1 ist wesentlich schneller als optische Übergänge (KASHA-Regel), daher finden Fluoreszenzübergänge in der Regel von S_1 nach S_0 statt. Unter *intersystem crossing* (ISC) wird ein Übergang von einem S_1 - in einen tieferliegenden T_1 -Zustand verstanden. Der Übergang zwischen Singulett und Triplett ist quantenmechanisch auf Grund der Drehimpulserhaltung verboten. Singulett-Triplett-Übergänge sind jedoch möglich, wenn der Elektronenspin an einen anderen Drehimpuls ankoppelt, z.B. an den Bahndrehimpuls (s. g. Spin-Bahn-Kopplung, besonders groß beim Vorhandensein schwerer Atome im Molekül). Da auch der Übergang von T_1 nach S_0 verboten ist, hat der Triplettzustand eine sehr hohe Lebensdauer. Der folgende Übergang in den Grundzustand kann strahlend erfolgen (Phosphoreszenz) oder strahlungslos. Ein angeregtes Molekül kann seine Energie auch auf ein anderes Molekül übertragen (EET, elektronischer Energietransfer). Dabei wird die Fluoreszenz des Donormoleküls gelöscht, das Akzeptormolekül emittiert rotverschoben. Photochemie und Elektronentransferreaktionen (ET) sind weitere Deaktivierungsprozesse. Im angeregten Zustand können viele chemische Reaktionen ablaufen, die im Grundzustand nicht möglich sind.

Die Fluoreszenzquantenausbeute beschreibt die Zahl der emittierten Photonen im Verhältnis zur Zahl der absorbierten Photonen und gibt Aufschluss darüber, wie gut das Molekül fluoresziert. Definitionsgemäß liegt die Quantenausbeute zwischen 0 und 1. Die

Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F als Funktion sämtlicher Deaktivierungsprozesse beschreibt Gleichung 1.

$\Phi_F = \text{emittierte Photonen} / \text{absorbierte Photonen}$

$$\Phi_F = \frac{1}{k_F + k_{IC} + k_{ISC} + k_{ET} + k_{EET}} \quad (\text{Gl. 1})$$

Die Konstanten k_x sind die Geschwindigkeitskonstanten der jeweiligen Deaktivierungsprozesse. Eine weitere wichtige Größe ist die Fluoreszenzintensität des Moleküls. Sie hängt neben der apparativen Nachweiswahrscheinlichkeit (NW) von der Quantenausbeute und der Energieübertragungswahrscheinlichkeit Φ_{EET} ab. Einfluß haben natürlich auch das Anregungslicht mit I_0 , einfallende Lichtintensität, I_T transmittierte Lichtintensität und der Term $hc/\lambda = \text{Energie des Fluoreszenzphotons}$. Die Fluoreszenzintensität (F) beschreibt Gleichung 2:

$$F = NW\Phi_F\Phi_{EET}(I_0 - I_T)\lambda/hc \quad (\text{Gl. 2})$$

Absorptions- und Fluoreszenzspektren verhalten sich spiegelbildlich, da die vibronischen Zustände von Grund- und angeregtem Zustand ähnlich sind. Das Fluoreszenzspektrum ist dabei immer um den so genannten *STOKES-Shift* bathochrom verschoben, da ein Teil der aufgenommenen Energie über andere Relaxationsprozesse abgegeben wird. Abbildung 3 zeigt die Zusammenhänge.

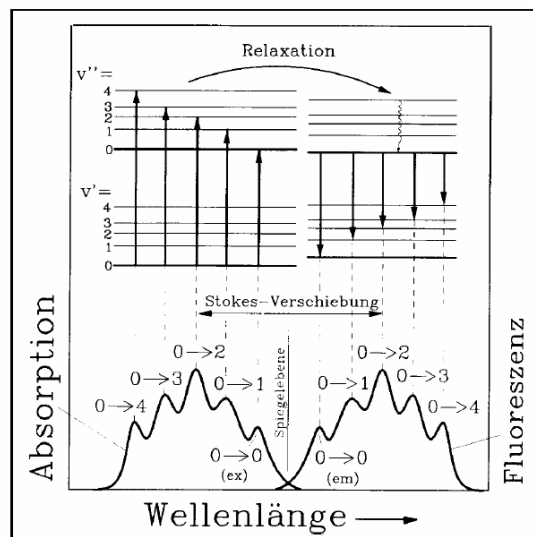


Abbildung 3: Spiegelsymmetrie zwischen Absorptions- und Fluoreszenzspektrum [28].

Für eingehendere theoretische Betrachtungen der Fluoreszenz muss auf oben genannte Literatur verwiesen werden.

1.2.2 Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen in der Bioanalytik

1.2.2.1 Fluoreszenztechniken in der Bioanalytik allgemein

Die Fluoreszenzspektroskopie selbst und die Vielzahl fluoreszenzbasierter Assays sind aus der biochemischen und klinischen Analyse nicht mehr wegzudenken, wie schon in Kapitel 1.1 angedeutet wurde. Weitere Anwendungen sind beispielsweise die Untersuchung molekularer Wechselwirkungen von Biomolekülen in ihrer natürlichen Umgebung (z.B. auf Zelloberflächen oder im Cytoplasma) [29]. Fluoreszenz-Korrelationstechniken wurden verwendet, um die pH-Abhängigkeit der Dynamik der Konformationsfluktuation des grün-fluoreszierenden Proteins in Lösung zu untersuchen [30]. Wellenlängen-selektive Fluoreszenz wurde benutzt, um die Eindringtiefe eines Reporter-Fluorophores in eine biologische Membran zu studieren [31]. Die Geometrie der molekularen Bindung an „Carrier-Moleküle“ wurde mit Hilfe der Elektrofluoreszenz-Polarisations-Spektroskopie mit DNA als „Carrier“ untersucht [32]. Weitere Techniken sind die Fluoreszenz-Resonanzenergieübertragung [33], die konfokale Koinzidenzanalyse [33], die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) [34, 35] und viele andere mehr.

Diverse Reviews beschreiben die zahlreichen biologischen Anwendungen der Fluoreszenz und zeigen die große Anwendungsbreite. WEISS *et al.* [36] berichten beispielsweise über Fortschritte bei der Detektion einzelner Biomoleküle, während WAGNIERES *et al.* sich mit der *in vivo* Fluoreszenzabbildung beschäftigen [37]. MIDDENDORF *et al.* berichten über die Instrumentierung bei der Nahinfrarot-Fluoreszenz für die DNA-Analyse [38]. Andere Reviews beschäftigen sich mit dem Hochdurchsatz-Screening [39, 40]. Ein eher allgemeineres Review wurde von OLDHAM *et al.* veröffentlicht [1].

1.2.2.2 Fluoreszenztechniken in der DNA-Analytik

Die Anwendungsbereiche für Fluoreszenzfarbstoffe bei der Detektion von Nukleinsäuren wachsen ebenfalls kontinuierlich mit der Entwicklung neuer, empfindlicher Assays. Da Nukleinsäuremoleküle wenige intrinsische Eigenschaften besitzen, die sich für eine direkte, hochsensitive Detektion eignen, basieren die meisten Assay-Formate auf der Detektion einer charakteristischen Eigenschaft eines Markers [41, 42]. Früher waren Methoden, die auf radioaktiven Isotopen als Marker beruhten, in der Bioanalytik weit verbreitet, wurden aber in letzter Zeit weitgehend durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen ersetzt.

Fluorophore dominieren heute eine Reihe von neu entwickelten Methoden, die die Detektion von DNA in flüssiger oder fester Phase, mit und ohne vorherige Separation, den Transfer auf Membranen (*Blotting*) oder physikalische Trenntechniken wie Elektrophorese beinhalten. Neben dem Messen der reinen Fluoreszenzintensität sind auch Anwendungen verbreitet, die auf Polarisierung oder Energietransfer (z.B. *TaqMan-Assay*) beruhen. Multilabelling mit verschiedenen Farbstoffen unterschiedlicher Emissionswellenlängen findet Anwendung in der DNA-Sequenzierung oder Chromosom-Färbung und in der CLSM. Die rasante Entwicklung im Bereich von Mikrochips geht ebenfalls einher mit einem steigenden Bedarf an leistungsstarken Fluorophoren. Solche Mikrochips finden beispielsweise Verwendung bei der Mutations- oder Genexpressionsanalyse. Einen Überblick über verschiedene Methoden in der DNA-Analytik mit Fluoreszenztechniken liefern KRICKA *et al.* [4].

1.2.3 Fluorophore - Stand der Technik

1.2.3.1 Fluorophore für die Bioanalytik

Die üblichen in der Bioanalytik verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe basieren auf den Xanthenen Fluorescein (z.B. FAM, JOE) und Rhodamin (z.B. ROX, TAMRA) [38, 42-44] oder auf den Cyaninen (z.B. Cy5, vergl. Kapitel 1.2.3.2). Fluorescein ist zwar immer noch weit verbreitet, aber die Cyaninfarbstoffe erlangen immer größere Bedeutung, da sie mit ihren Absorptions- und Emissionsmaxima den gesamten Bereich des sichtbaren Spektrums von blau (z.B. PoPoTM-1 ex/em 434/456 nm) bis Nah-Infrarot (z.B. Cy5.5 ex/em 675/694 nm) abdecken. Besonders die Nahinfrarot-Farbstoffe haben große Bedeutung in bioanalytischen Anwendungen, da ihre Emission außerhalb des Wellenlängenbereichs liegt, in dem typische Hintergrundemission biologischer Matrices erfolgt. Weiterhin zeigen die Fluorescein-basierten Farbstoffe diverse Nachteile, wie starkes Photobleaching, große pH-Abhängigkeit der Fluoreszenz und eine hohe Tendenz zu *Quenching*-Effekten bei Konjugation an Biomoleküle [45-47], die bei den Cyaninen weniger stark ausgeprägt sind. Den Cyaninfarbstoffen verwandte Fluorophore sind die Phthalo- bzw. Naphthalocyanine [38], die Hemicyanine (z.B. Dy-Farbstoffe [48]) und die Oxazine (z.B. Evoblue [48]), die ebenfalls zur Markierung von Biomolekülen verwendet werden. Die relativ neuen Farbstoffe der TOTO-Serie [43, 49], dimere Cyanine, die vier positive Ladungen an quaternären Aminogruppen tragen, werden zur elektrostatischen Markierung von DNA benutzt. Klassische interkalierende Farbstoffe zur Markierung von DNA sind die Phenanthridine und Acridine, wie Ethidium Bromid [50] oder Acridine Orange [51]. Da diese Farbstoffe jedoch ein sehr hohes cancerogenes Potential besitzen, sollten sie heutzutage weitestgehend durch weniger

gefährdende Substanzen ersetzt werden. Die Bisbenzimidine (Hoechst-Farbstoffe, DAPI [43]) und die Bor enthaltenden Bodipy-Farbstoffe [43] finden ebenfalls häufig Verwendung in verschiedenen biochemischen Anwendungen [52].

1.2.3.2 Cyaninfarbstoffe

Historisch große Bedeutung besaßen die Cyanine in der Fotografie-Industrie. Heute werden sie in Farbstoff-Lasern verwendet und sind eine der am weitesten verbreiteten Farbstoffgruppe in der Bioanalytik. In den Cyaninfarbstoffen sind zwei Heteroaromaten durch eine Brücke von Polymethin-Einheiten verbunden. Die Länge der Polymethinkette und somit die Zahl der konjugierten Doppelbindungen beeinflusst das Absorptions- und Fluoreszenz-Maximum. Die Heteroaromaten sind häufig Indole, können aber auch Benzoxazole, Benzthiazole, Pyridine oder andere sein. Im Folgenden ist die allgemeine Struktur eines Di-Indol-Cyanins gezeigt, bei dem beide heteroaromatischen Kopfgruppen Indole sind (Abb. 4). Ausführliche Informationen zur Synthese und den Eigenschaften von Cyaninen finden sich in diversen Werken [53-56].

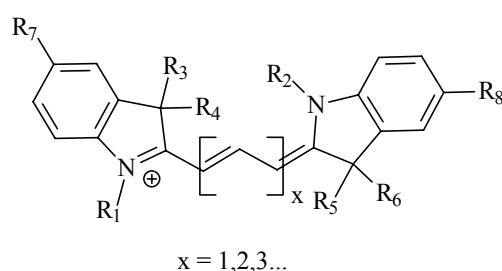


Abbildung 4: Allgemeine Struktur eines Di-Indol-Cyanins.

R_1 und R_2 tragen in der Regel die funktionelle Gruppe, die eine Koppelung an das Biomolekül ermöglicht. R_{3-6} sind häufig Methylgruppen und an den Positionen R_7 und R_8 sind gelegentlich Sulfonsäurefunktionen vorhanden (z.B. bei Cy5).

Cyaninfarbstoffe werden häufig zur Markierung von Proteinen [57-59] oder DNA [60, 61] verwendet und die bekanntesten und meist verwendeten Farbstoffe dieser Klasse sind wohl die Cy-Farbstoffe von WAGGONER [62], wie Cy3 oder Cy5 (Abb. 5). Diese Cyaninfarbstoffe zeichnen sich dadurch aus, dass sie in 5-Position des Indols mit einer Sulfonsäuregruppe derivatisiert sind und daher eine sehr hohe Wasserlöslichkeit besitzen. Synthese und charakteristische Eigenschaften werden unter anderem von WAGGONER beschrieben [63-66]. Die Anwendungen für die Cy-Farbstoffe sind zahllos und erstrecken sich über den gesamten Bereich der biologischen und klinischen Fluoreszenzanalyse.

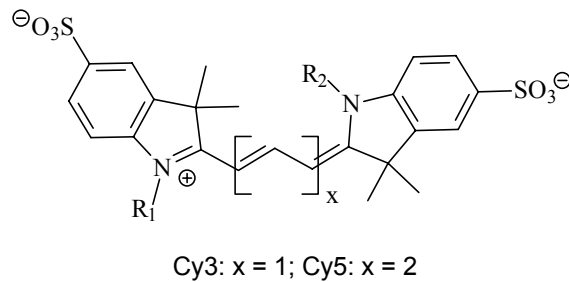


Abbildung 5: Cyaninfarbstoffe Cy3 und Cy5 mit charakteristischen Sulfonsäuregruppen.

Die Reste $R_{1,2}$ tragen die Gruppen zur Koppelung an das Biomolekül.

Ein Nachteil der Cy-Farbstoffe ist, daß sie nach Kopplung an Proteine oder einzelsträngige DNA zum Teil ausgeprägte Dimeren-Bande zeigen, die durch Wechselwirkungen zwischen den Fluorophoren untereinander und zwischen Fluorophor und Biomolekül bei zu hoher Markierungs-Dichte entstehen [60]. Dies äußert sich in Form eines zweiten, blauverschobenen Maximums im Absorptionsspektrum, welches nicht fluoresziert. In Abbildung 6 sind die Dimerenbanden einiger Cy-Farbstoffe gezeigt. Es wird deutlich, dass die *Quenching*-Effekte bei monomerer DNA stärker auftreten, als bei Duplex-DNA. Die Sulfonsäuregruppen führen zur Verminderung von Dimerenbanden, wie der Vergleich zwischen mono- und bisulfoniertem Farbstoff zeigt.

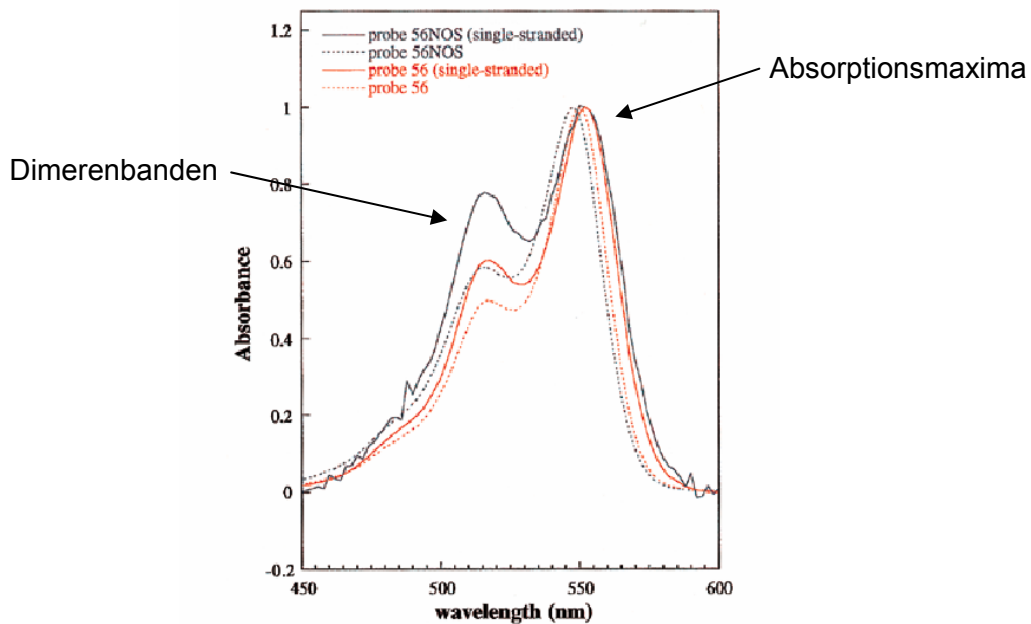


Abbildung 6: Dimerenbanden bei Kopplung von Cy3 (zwei Sulfonsäuregruppen) und Cy3NOS (eine Sulfonsäuregruppe) an DNA.

Die roten Kurven sind von Cy3-Konjugaten, die schwarzen von Cy3NOS-Konjugaten, wobei jeweils die durchgezogene Linie für monomere DNA steht, die gepunktete Linie für doppelsträngige DNA [60].

Eine hohe Farbstoffdichte auf dem Biomolekül ist bei vielen Messungen jedoch wünschenswert, da so ein stärkeres Signal erhalten wird, was die Meßempfindlichkeit erhöht. Durch die *Quenching*-Effekte sinkt jedoch die Fluoreszenzausbeute pro Farbstoffmolekül, so daß eine höhere Markierungsdichte nicht mit einem stärkeren Fluoreszenzsignal einhergeht. WAGGONER regt daher an, die Wechselwirkungen zwischen den Fluorophoren durch Modifizieren des Farbstoffes mit voluminösen Gruppen zu reduzieren, wie mit den Sulfonsäuregruppen in den Cy-Farbstoffen gezeigt. Weiterhin wird festgestellt, dass Fluorophore als Biomarker möglichst hydrophil sein sollten und lange Linker zum Biomolekül besitzen sollten. Dies soll weiter die *Quenching*-Effekte reduzieren.

1.2.3.3 Die Oysterfarbstoffe der Denovo Biolabels GmbH

Am ICB wurde eine neue Klasse von Cyaninfarbstoffen, die so genannten Oyster-Farbstoffe (Abb. 7) entwickelt, deren Vertrieb und Weiterentwicklung die Denovo Biolabels GmbH als Lizenznehmer des ICB verfolgt [67]. Diese Farbstoffe zeichnen sich durch charakteristische *spiro*-Gruppen an den Positionen R₃₋₆ aus. Die sperrigen *spiro*-Gruppen sollen, in Anlehnung an WAGGONER [60] die Interaktion der Farbstoffe untereinander und mit dem Biomolekül reduzieren, so dass *Quenching*-Effekte zurückgedrängt werden. So sollen höhere Markierungsgrade am Biomolekül realisiert werden, ohne dass es zu einem Verlust an Fluoreszenzintensität durch gegenseitige Fluoreszenzlöschung der Farbstoffe kommt. Dies spielt besonders in der Proteinanalytik eine Rolle, da möglichst viele Fluorophore an das Protein gekoppelt werden sollen.

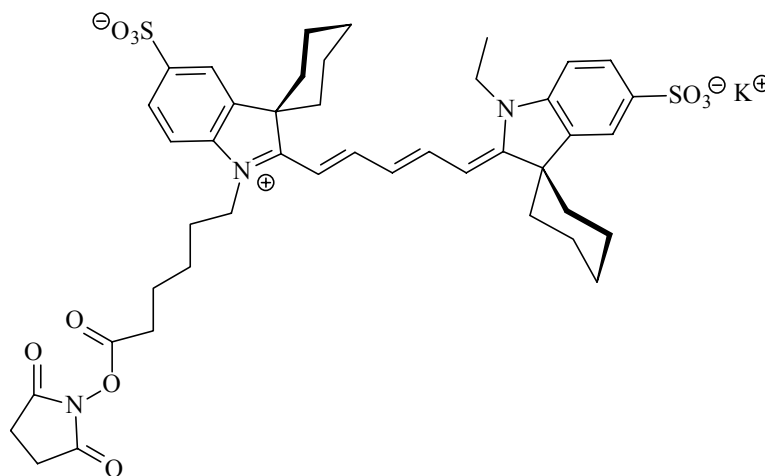


Abbildung 7: Oy656, ein Farbstoff der Oyster-Serie der Firma Denovo-Biolabels als monofunktionelles NHS-Derivat.

Das Absorptionsmaximum in Wasser liegt bei 656 nm, was sich in der Bezeichnung des Farbstoffes widerspiegelt.

Cyanine mit *spiro*-Gruppen wurden in einem anderen Zusammenhang bisher nur einmal in der Literatur erwähnt [68]. Es wurden *spiro*-Cyclohexylindole mit Methylmagnesiumiodid umgesetzt, wobei unerwarteterweise ein fluoreszierendes *spiro*-Cyanin in sehr geringer Ausbeute (5 %) entstand. Das Produkt wurde mittels Röntgenstrukturanalyse charakterisiert. Abbildung 8 zeigt die zufällige Synthese des *spiro*-Cyanins.

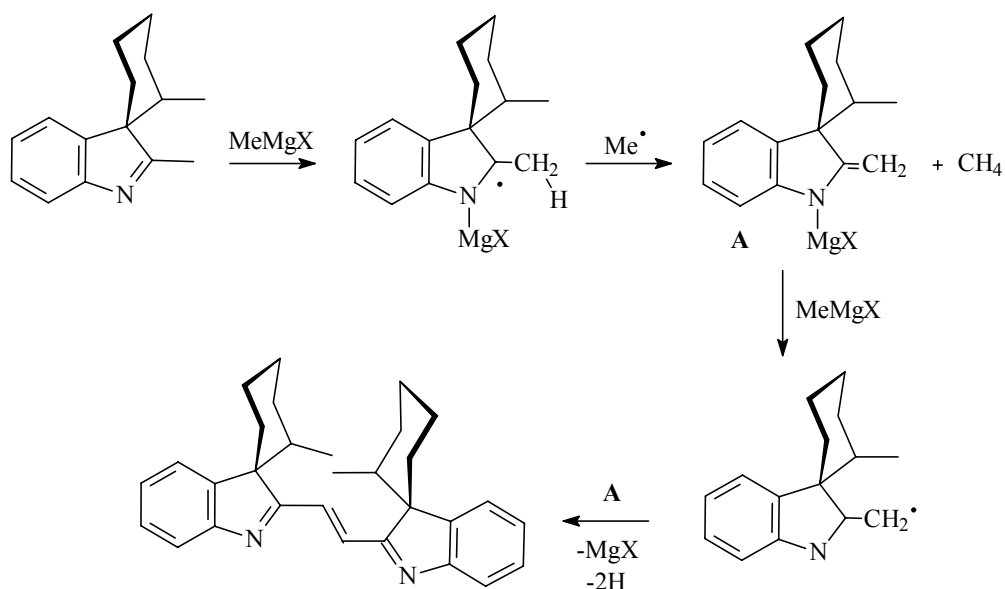


Abbildung 8: Zufällige Synthese eines *spiro*-Cyanins.

1.2.4 Fluorophor-DNA-Konjugate: Synthese und charakteristische Eigenschaften

Um Oligonukleotide, die selbst nur eine geringe intrinsische Fluoreszenz besitzen, mit Hilfe der Fluoreszenz-Spektroskopie bzw. anderen Fluoreszenz-basierten Methoden detektieren zu können, muß zuvor eine Markierung mit einem geeigneten Fluoreszenzfarbstoff erfolgen. Die Anbindung des Fluorophores an die DNA kann dabei entweder über nicht-kovalente Wechselwirkungen (elektrostatistisch oder interkalierend) oder über kovalente chemische Bindungen erfolgen.

Klassische interkalierende Farbstoffe sind die Phenanthridine und Acridine, wie Ethidium Bromid oder Acridine Orange. Diese Fluorophore schieben sich zwischen die beiden Stränge von doppelsträngiger DNA, wobei die Fluoreszenz des Farbstoffes ansteigt [50]. Auch monomere DNA kann gefärbt werden, da auf Grund intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen auch hier Duplexregionen existieren. Durch die interkalierenden Eigenschaften sind diese Farbstoffe jedoch stark cancerogen [69]. Verwendung finden die interkalierenden Fluorophore z.B. bei der Färbung von Gelen.

Farbstoffe, die teilweise über elektrostatische Wechselwirkungen und teilweise durch Interkalation an die DNA binden, sind beispielsweise die relativ neuen Farbstoffe der TOTO-Serie. Diese dimeren Cyanine, die vier positive Ladungen an Stickstoffatomen tragen, können mit den negativen Ladungen der Phosphatgruppen der DNA wechselwirken können. Die direkte, kovalente Anbindung von Fluorophoren an DNA ist mit der Phosphoramidit-Chemie möglich [70-73], mit der auch Oligonukleotide chemisch synthetisiert werden. Eine freie OH-Gruppe der DNA (je nach Anwendung am 3'- oder 5'-Ende) reagiert mit einem Phosphoramidit-substituierten Farbstoff zu einem Phosphit, welches zum Phosphat oxidiert wird (Abb. 9). Zwischen Farbstoff und Phosphoramidit-Gruppe wird häufig noch ein „spacer“ eingebracht, um die Wechselwirkungen zwischen Farbstoff und DNA zu reduzieren. Da in dieser Synthese Cyanoethylschutzgruppen verwendet werden, die später mit Ammoniak wieder entfernt werden, müssen die Fluorophore ein gewisses Maß an Basenstabilität bieten.

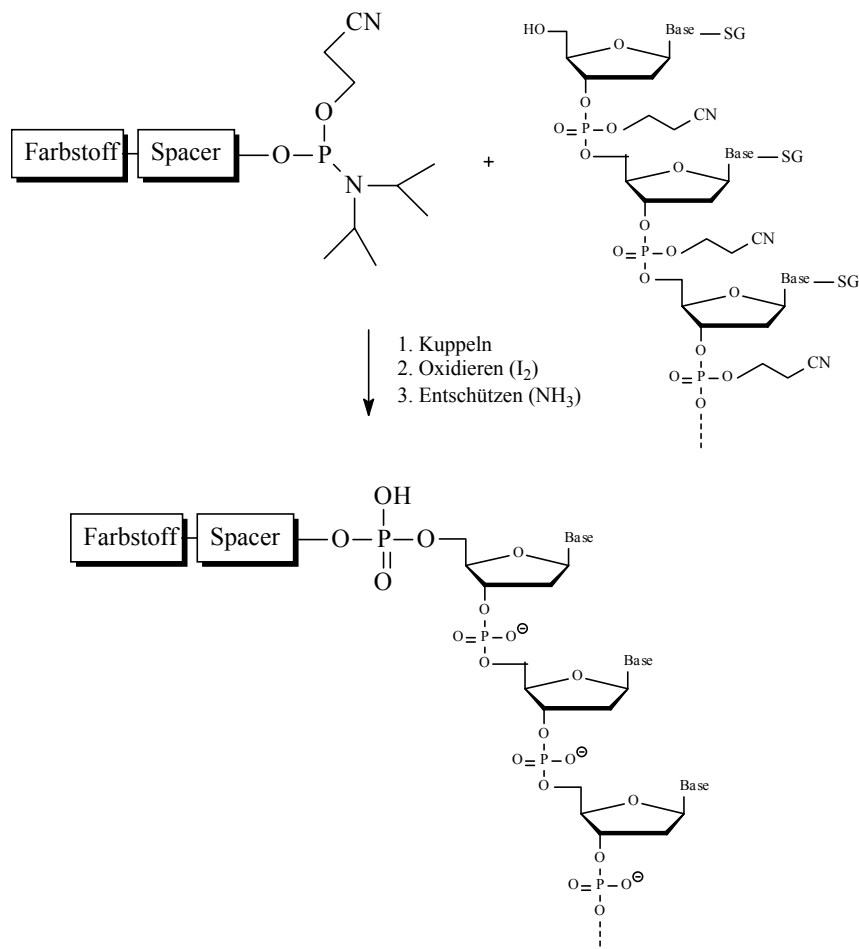


Abbildung 9: Phosphoramiditchemie zum Markieren von DNA (SG = Schutzgruppe).

Alternativ zur Phosphoramidit-Methode kann Amino-modifizierte DNA hergestellt werden, die mit Fluorophoren mit Succimidylester-Funktionen reagieren kann. Diese Reaktion läuft schon

bei Raumtemperatur in wässriger Lösung bei pH 8.5 ab, so dass hier keine erhöhte chemische Stabilität der Farbstoffe nötig ist. Die Aminoallylgruppen können mit enzymatischen Methoden in die DNA eingeführt werden, z.B. während der PCR oder einer reversen Transkription durch Einbau von Aminoallyl-Nukleotiden in die Produkte [60, 74, 75]. Mit den enzymatischen Methoden können ebenfalls Nucleotide in die DNA eingebracht werden, die schon vorher mit einem Farbstoff markiert wurden, z.B. Cy5-dUTP [76-78]. Das voluminöse Farbstoffmolekül kann jedoch die enzymatische Reaktion behindern, so dass der Einbau von Aminoallyl-Nukleotiden und eine nachträgliche Markierung oft wesentlich bessere Markierungsgrade liefert [75]. Statt Aminoallyl-modifizierter Nucleotide werden auch Biotin-modifizierte Nucleotide mit enzymatischen Methoden in DNA eingebracht [79]. Eine Markierung kann dann mit Streptavidin-markierten Farbstoffen erfolgen, wobei die hochspezifische Wechselwirkung zwischen Biotin und Streptavidin genutzt wird. Die Eigenschaften des DNA-Farbstoff-Konjugats können sich bei dieser Art der Markierung durch die hohe molekulare Masse des Streptavidins jedoch ändern.

Die Eigenschaften von Cy3-DNA-Konjugaten werden ausführlich bei WAGGONER [60] diskutiert. Betrachtungen der Schmelzkurven zeigten, dass die Cy3-markierten Proben normales Schmelzverhalten zeigen, auch bei sehr hohen Markierungsgraden, wie 1 Farbstoffmolekül pro 5 Basen. Die Markierung führte jedoch zu einem Absenken des Schmelzpunktes, wobei jedes Cy3-Molekül den Schmelzpunkt um etwa 2 °C erniedrigte. Quantenausbeute und Fluoreszenzintensität hängen vom Markierungsgrad ab. Anfangs steigen beide, wenn zusätzliche Farbstoffmoleküle an das Oligonukleotid gekoppelt werden. Befinden sich zu viele Farbstoffe an der DNA, sinkt die Fluoreszenz auf Grund von *Quenching*-Effekten wieder (bei mehr als einem Farbstoff auf 6 Basen). Bei Hybridisierung einzelsträngiger DNA mit einem komplementären Strang ändert sich die Fluoreszenz des Konjugates. Dabei kann die Fluoreszenz zu- oder abnehmen, abhängig von Markierungsgrad, Ladung des Fluorophores und Länge des Linkers. Längere Linker und die Anwesenheit von Sulfonsäuregruppen führten zu einer Erhöhung der Fluoreszenz bei der Hybridisierung. In den Konjugaten treten sowohl Fluorophor-Fluorophor-Wechselwirkungen, als auch Fluorophor-Nukleotid-Wechselwirkungen auf. Die Bildung von Farbstoff-Dimeren löscht bekanntlich teilweise die Fluoreszenz. Es wird aber vermutet, dass Wechselwirkungen des Farbstoffes mit den Nukleotiden unter Umständen zu einer Erhöhung der Fluoreszenz führen könnten, falls sie die planare Konformation des Farbstoffes unterstützen. Diese komplexen Effekte bei der Synthese vorherzusagen ist jedoch sehr schwer. Es sollte allgemein Ziel der Synthese sein, die Aggregationstendenz der Farbstoffe zu reduzieren (sterisch anspruchsvolle Gruppen) und die Hydrophilie zu erhöhen (geladene Gruppen). Die Sulfonsäuregruppen der Cy-Farbstoffe sind ein möglicher Ansatz, der gute Ergebnisse liefert.

1.3 Nukleinsäureanalytik mit DNA-Chips und DNA-Biosensoren

1.3.1 Nukleinsäureanalytik mit DNA-Chips

Im Bereich der DNA-Analytik hat in den letzten zehn Jahren eine enorme Entwicklung stattgefunden. Neben den PCR-Methoden stellen DNA-Chips heutzutage einen wichtigen Teilbereich der Nukleinsäureanalytik dar. DNA-Chips, auch Mikroarrays genannt, sind miniaturisierte Glassträger, auf denen DNA-Moleküle mit bekannter Sequenz als Fangsonden in Form eines Rasters (*array*) immobilisiert sind. Die Probenlösung mit Fluorophor-markierter DNA (*targets*) wird auf das Array aufgetragen und längere Zeit inkubiert. Dabei hybridisieren die Targets an entsprechenden komplementären Sonden. Nach einem Waschschrift zur Entfernung ungebundener Targets wird die Fluoreszenz mit einem Arrays Scanner ausgelesen. Das charakteristische Signalmuster erlaubt Rückschlüsse auf die in der Probe enthaltene DNA. Um diese Methode von den in Kapitel 1.3.2 beschriebenen DNA-Biosensoren zu unterscheiden, wird im Folgenden von „konventioneller“ DNA-Chiptechnologie gesprochen. Abbildung 10 zeigt einen Ausschnitt eines typischen DNA-Chips. Übersichten über verschiedene Aspekte zur DNA-Chiptechnologie findet sich in diversen Artikeln [80-82].

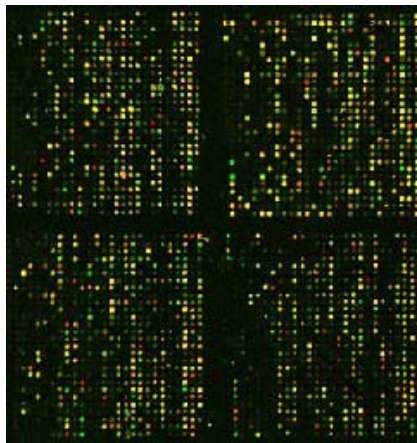


Abbildung 10: Ausschnitt aus einem typischen konventionellen DNA-Chip.

Mit konventionellen DNA-Chips kann eine sehr hohe Informationsdichte erzielt werden, da auf so genannten „*high-density-microarrays*“ viele tausende von Sonden immobilisiert werden können. Bei gezielten Fragestellungen werden jedoch auch *low-density-arrays* mit bis zu wenigen hundert Sondenspots eingesetzt, da diese extrem hohe Informationsdichte in vielen Experimenten nicht benötigt wird.

Typische Anwendungsgebiete für DNA-Chips sind die Genexpressionsanalyse und der Nachweis von Punktmutationen (SNP, *single nucleotide polymorphism*). Bei der

Genexpressionsanalyse liefern DNA-Chips quantitative Aussagen über das Expressionsniveau der verschiedenen Gene, also der Menge an entsprechender mRNA, des gesamten Genoms [83]. Der Vergleich zweier Gewebeproben ist durch Markierung mit unterschiedlichen Fluorophoren möglich. Diese differentielle Expressionsanalyse erlaubt den Vergleich der Transkriptionsaktivität individueller Gene und damit Rückschlüsse auf die Wirkung externer Parameter auf die zelluläre Genexpression. Beispiele hierfür finden sich in der Krebsforschung bei der Tumorklassifizierung [84, 85] oder der Pharmakogenetik bei der Entwicklung von Medikamenten für die Chemotherapie [86, 87]. Weitere Anwendungen sind das Hochdurchsatz-*Screening* von potentiellen pharmazeutischen Wirkstoffen auf Toxizität [88], die Charakterisierung von Krankheitsverläufen [89] oder Beiträge zum besseren Verständnis zellulärer Mechanismen [90]. Bei der Detektion von Punktmutationen, einer weiteren klinisch wichtigen Analyse, wird die hohe Spezifität der Hybridisierung genutzt [91, 92]. Auch Genotypisierungen einzelner Patienten im Rahmen pharmakogenomischer Untersuchungen sind mit DNA-Chips möglich [93]. Neben den klinischen Fragestellungen, die den Schwerpunkt in der DNA-Chip-Technologie bilden, sind auch die Lebensmittel- und Umweltanalytik mögliche Einsatzgebiete. Bisher werden DNA-Chips jedoch im Wesentlichen zu Forschungszwecken eingesetzt, die Einführung in die Routineanalytik erfolgt nur langsam und wird von der Verfügbarkeit preiswerter ArraysScanner abhängen.

1.3.2 DNA-Biosensoren - Überblick

Die konventionelle DNA-Chiptechnologie bietet den Vorteil einer sehr hohen möglichen Informationsdichte in den einzelnen Experimenten. Die Methode ist jedoch auf Grund der vielen Waschschriffe arbeitsaufwändig und relativ kostenintensiv. Für ausgewählte Fragestellungen mit weniger hohem Informationsgehalt sind DNA-Biosensoren daher eine sinnvolle Alternative. Ihre Vorteile gegenüber den konventionellen DNA-Chips sind die Durchführung schneller Hybridisierungsexperimente und die Detektion der Wechselwirkungen in Realzeit.

1.3.2.1 Biosensoren allgemein

In den letzten Jahren haben Biosensoren vermehrt Einzug in unterschiedliche Bereiche der analytischen Chemie gehalten, wie klinische Analytik, Umwelt- oder Lebensmittelchemie. Ihre Vorteile liegen in der Regel in niedrigen Anschaffungs- und Betriebskosten, einfacher Bedienung und häufig der Möglichkeit einer „Vorortanalyse“. Der Begriff „Biosensor“ wurde bereits 1977 von CAMMANN eingeführt. Während es für elektrochemische Biosensoren

bereits eine Definition gibt, wird an einer allgemeinen Definition des Begriffes Biosensor zur Zeit noch gearbeitet (IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry). Es herrscht jedoch Übereinstimmung, dass Biosensoren, als Untergruppe der Chemosensoren, aus einer selektiven biologischen Komponente und einem Transducer bestehen, die direkt räumlich gekoppelt sind [94, 95]. Die biologische Komponente ermöglicht eine hochspezifische Stofferkennung, während der Transducer die bei der Erkennung des Analyten entstehenden physikalischen oder chemischen Veränderungen in ein messbares elektrisches Signal umwandelt. Die enge räumliche Kopplung von biologischer Komponente und Transducer wird durch Immobilisierungstechniken erreicht. Als biologische Komponenten kommen Enzyme, Antikörper, Nukleinsäuren, Mikroorganismen oder ganze Zellen in Frage. Typische Transducer sind optische, elektrochemische, piezoelektrische oder akustische Signalerfassungssysteme. Idealerweise ist die Wechselwirkung zwischen Analyt und Rezeptor reversibel, so dass der Sensor mehrfach verwendbar ist.

1.3.2.2 Das Prinzip der DNA-Biosensoren

DNA-Biosensoren nutzen die hochspezifische Wechselwirkung zwischen komplementären DNA-Einzelsträngen, die so genannte Hybridisierung, als biologische Erkennungsreaktion. Dazu werden auf der Transduceroberfläche einzelsträngige Oligonukleotide (die Sonden) immobilisiert. Diese hybridisieren bei Sequenzübereinstimmung mit komplementären Oligonukleotiden einer Probenlösung (den Targets). Es werden sowohl optische, als auch elektrochemische Transducer eingesetzt [96-99]. Seltener verwendet werden piezoelektrische Methoden, wie die Quarzmikrowaage [100, 101]. Einen Überblick über die Entwicklungen im Bereich der DNA-Biosensoren geben BIER und FÜSTE [102], sowie VERCOUTERE und AKESON [103].

Die optischen Transducer sind am weitesten verbreitet und nutzen in der Regel das Phänomen des evaneszenten Feldes aus. Ein evaneszentes Feld tritt bei totaler interner Lichtreflexion an Grenzflächen von Medien mit unterschiedlichen Brechungsindices auf. Mit Evaneszentfeld-Biosensoren ist eine Detektion von Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen in Realzeit möglich, wobei diese Wechselwirkung markierungsfrei detektiert werden kann (direktoptische Systeme) oder mittels fluoreszierender Marker.

Bei direktoptischen Sensoren werden Änderungen von Brechungsindices auf der sensitiven Oberfläche, hervorgerufen durch das Anbinden von Analytmolekülen an den Rezeptoren auf der Oberfläche, detektiert. Kommerzielle direktoptische Sensoren für die DNA-Analytik sind das SPR-System (*surface plasmon resonance*) von BIAcore (Uppsala, Schweden) [104-112], der *Resonant Mirror* [113-115] oder der Gitterkoppler [116-118].

Eine höhere Sensitivität als mit den direktoptischen Sensoren wird mit Biosensoren erreicht, die das evaneszente Feld zur Anregung von Fluoreszenz nutzen. Dazu werden die zu messenden Target-DNA-Moleküle mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, der nach erfolgter Hybridisierung des Oligonukleotides an den Sonden auf der Oberfläche des Sensors im evaneszenten Feld angeregt wird. Die Fluoreszenzintensität ist ein Maß für die Menge der gebundenen DNA. Eine Fluoreszenzmarkierung nach der Hybridisierung ist mit interkalierenden Farbstoffen wie Ethidiumbromid möglich [119, 120]. Auch fluorophormarkierte Sonden (*Molecular Beacons*), die nach erfolgter Hybridisierung ein Fluoreszenzsignal liefern, können eingesetzt werden [121, 122]. Für die Detektion des Fluoreszenzlichtes kommen planparallele Wellenleiter im Chipformat [123-128] oder faseroptische Transducer [119, 120, 122, 129-131] in Kombination mit CCD-Kameras (*charge coupled device*) oder Photomultipliern in Frage. Die Detektion von Fluoreszenz in einem planaren System mit einem Durchflusssensorchip aus Plastik wurde am Institut für Chemo- und Biosensorik (ICB) für immun- und DNA-analytische Fragestellungen entwickelt [11, 12, 132, 133]. Auf der Basis dieses Systems wurde am ICB ein weiterer Sensor entwickelt [134], der die Fluoreszenz auf einer sensitiven Glassoberfläche orts aufgelöst mittels einer CCD-Kamera detektiert. Dieser Sensor wurde bereits erfolgreich zur DNA-analytischen Untersuchung von Lebensmitteln und zur Detektion von Mikroorganismen eingesetzt [135].

Mit Evaneszentfeld-DNA-Biosensoren kann die Hybridisierung in Realzeit analysiert werden, so dass Untersuchungen zur Reaktionskinetik möglich sind. Kinetische Parameter für verschiedene Oligonukleotidsysteme wurden sowohl mit direktoptischen [112, 117, 136], als auch mit fluoreszenzbasierten Systemen [112, 117, 123-125, 136] bestimmt. Ein theoretisches Modell zur Beschreibung solcher heterogenen Hybridisierungskinetiken wurde von ERICKSON *et al.* [137] entwickelt. O'SHANESSY beschreibt weiterhin ausführlich die Kinetik von Ligand/Rezeptor-Systemen [138].

1.3.3 Der DNA-Biosensor des ICB

In der vorliegenden Arbeit wurden Messungen an dem DNA-Biosensor des ICB durchgeführt. Im Folgenden soll das Gerät kurz beschrieben werden. Eine detaillierte Beschreibung findet sich bei SCHULT [133] und PETER [134, 135].

1.3.3.1 Theoretische Grundlagen

Am ICB wurde ein Evaneszenzfeld-DNA-Biosensor entwickelt, der die simultane Detektion multipler Hybridisierungsereignisse in Realzeit ermöglicht. Das System besteht aus dem Sensorchip, der im Durchflussformat konzipiert ist und aus dem Auslesegerät. Auf dem Glaschip werden DNA-Sonden als Array aufgebracht. Die Messlösung wird durch einen Fließkanal über den Array gepumpt und fluoreszenzmarkierte DNA-Targetmoleküle können an den Sonden anbinden. Die Fluoreszenzmarker werden im evaneszenten Feld angeregt, das durch Totalreflexion eines Laserstrahls an der Grenzfläche zwischen Glas und Messlösung entsteht (Abb. 11). Da die Intensität des evaneszenten Feldes exponentiell mit dem Abstand von der Chipoberfläche abnimmt, werden nur Fluorophore innerhalb der charakteristischen Eindringtiefe d_p (Gl. 3) angeregt.

$$E = E_0 \cdot \exp(-d / d_p) \quad (\text{Gl. 3})$$

$$d_p = \lambda / 2\pi n_2 [\sin^2 \alpha - (n_2 / n_1)^2]^{-0.5} \quad (\text{Gl. 4})$$

Die Tiefe des evaneszenten Feldes in der Probenlösung liegt in etwa in der Größenordnung der Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes (Gl. 4) [139]. Im vorliegenden System beträgt die Eindringtiefe etwa 200 nm. Dadurch werden nur die Fluorophore der Targetmoleküle angeregt, die an den Sonden hybridisiert haben, nicht jedoch ungebundene Targets. Somit sind jegliche Waschschrte überflüssig. Die orts aufgelöste Detektion des Fluoreszenzlichts erfolgt mit einer CCD-Kamera, so dass viele verschiedene Targets simultan detektiert werden können.

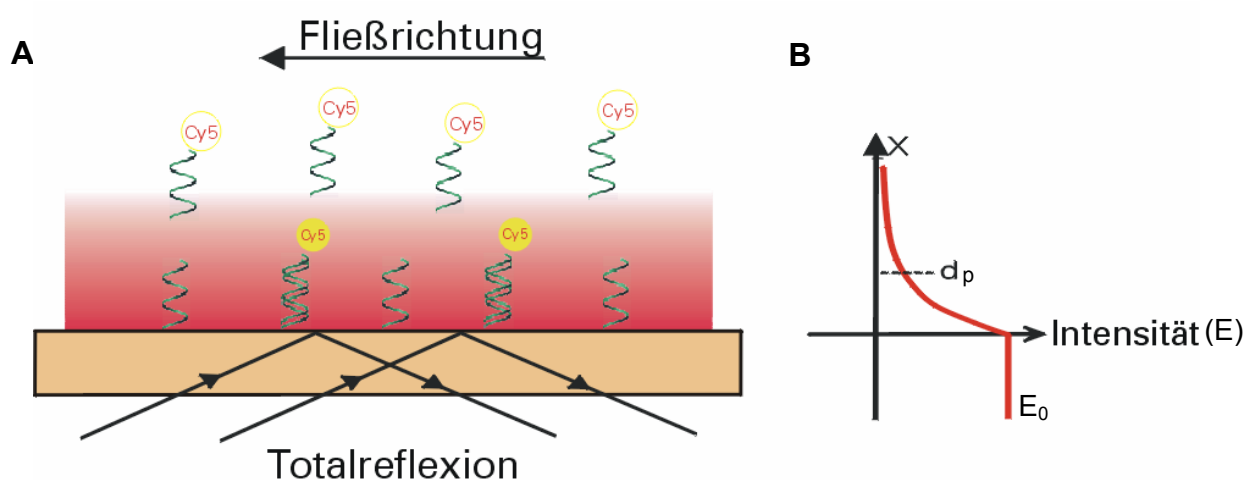


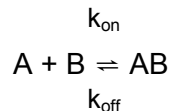
Abbildung 11: Evaneszentes Feld zur Anregung von Fluorophoren im DNA-Biosensor.

A: Ausbildung des evaneszenten Feldes durch Totalreflexion eines Laserstrahls. B: Intensitätsprofil des evaneszenten Feldes.

1.3.3.2 Kinetik der Hybridisierung

Eine Ausführliche Beschreibung der Kinetik von Ligand/Rezeptor-Systemen findet sich bei O'SHANNESY [138], hier soll nur auf grundlegende Parameter, die für den DNA-Biosensor des ICB entscheidend sind, kurz eingegangen werden.

Die Gleichgewichtsreaktion zwischen den immobilisierten Fangsondenmolekülen B und den gelösten Targetmolekülen A lässt sich folgendermassen beschreiben:



Dabei ist k_{on} die Geschwindigkeitskonstante für die Assoziation und k_{off} die Geschwindigkeitskonstante für die Dissoziation. Für die Bildung des Produktes AB gilt folgende Geschwindigkeitsgleichung:

$$d[AB]/dt = k_{\text{on}}[A][B] - k_{\text{off}}[AB] \quad (\text{Gl. 5})$$

Nach einer Reaktionszeit t ist bereits eine bestimmte Anzahl der Rezeptorpositionen auf der Oberfläche belegt und es gilt: $[B] = [B]_0 - [AB]$ mit $B_0 =$ Anfangskonzentration der Sondenmoleküle B. Aus Gl. 5 ergibt sich:

$$d[AB]/dt = k_{\text{on}}[A]([B]_0 - [AB]) - k_{\text{off}}[AB], \quad (\text{Gl. 6})$$

Da das detektierte Signal R proportional zu der Anzahl der gebildeten AB-Komplexe auf der Oberfläche ist und das maximal erreichbaren Signal R_{max} proportional zu der Anfangskonzentration der freien Fangsondemoleküle $[B]_0$, ergibt sich:

$$dR/dt = k_{\text{on}}c(R_{\text{max}} - R) - k_{\text{off}}R \quad (\text{Gl. 7})$$

dR/dt ist die zeitliche Änderung des gemessenen Signals, c die aufgrund der Durchflussmessung konstante Konzentration der Targetmoleküle und $(R_{\text{max}} - R)$ entspricht der Anzahl der freien Oberflächenbindungsstellen zum Zeitpunkt t .

In der Anfangsphase der Hybridisierungsreaktion besteht ein großer Überschuss an immobilisierten Rezeptormolekülen und es gilt $R_{\text{max}} \gg R$, womit die Terme $-k_{\text{off}}R$ und $R_{\text{max}} - R$ vernachlässigt werden können. (Gl. 7) vereinfacht sich daher zu:

$$dR/dt = k_{\text{on}}cR_{\text{max}} \quad (\text{Gl. 8})$$

Durch Intergration von $t = 0$ bis t erhält man mit R_0 als Hintergrundsignal:

$$R(t) = k_{\text{on}}cR_{\text{max}} * t + R_0 \quad (\text{Gl. 9})$$

Innerhalb einer Messung sind k_{on} , R_{max} und c konstant. Daher besteht zu Beginn der Messung ein linearer Zusammenhang zwischen dem Meßsignal R und der Zeit t . Im Weiteren Verlauf der Hybridisierung erreicht das Detektionssignal jedoch ein Sättigungsniveau R_{eq} . Es hat sich auf der Oberfläche ein Gleichgewicht zwischen sich ablösenden und bindenden Targetmolekülen eingestellt. Bei Durchfluss von reinem Hybridisierungspuffer kann auch die Dissoziationsphase betrachtet werden. Auch diese kann ausgewertet werden (Abb. 12).

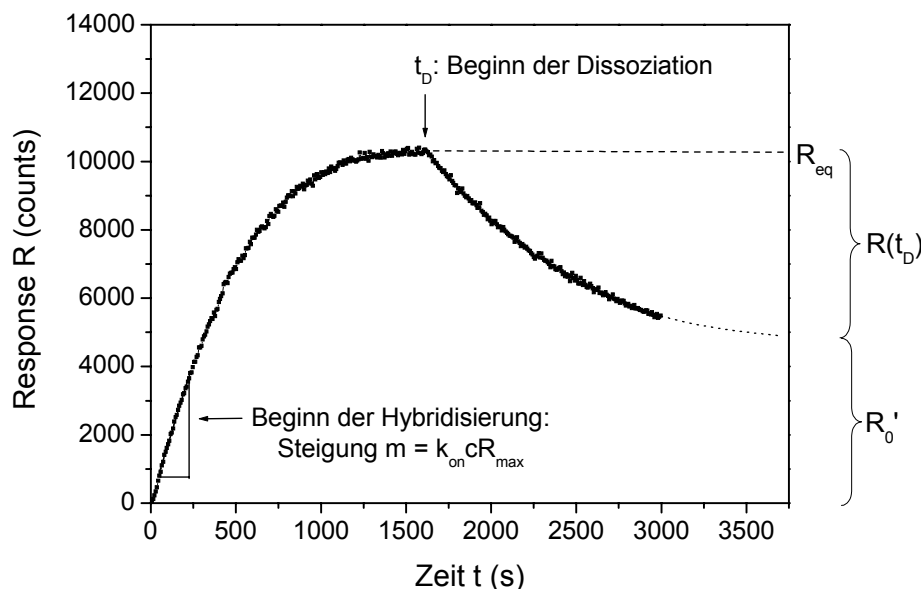


Abbildung 12: Verlauf der Hybridisierung mit Assoziation, Gleichgewicht und Dissoziation.

R_0' ist der Anteil nicht reversibel gebundener Targetmoleküle.

Die Durchflusszelle des Sensorchips ist derart konzipiert, dass die Diffusionsschicht sehr gering ist und der Stofftransport daher nahezu nicht diffusionslimitiert ist, sondern im Wesentlichen durch Konvektion erfolgt. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist in diesem Fall die Wechselwirkung zwischen den Fangsonden und den Targetmolekülen. Somit kann der kinetische Beschreibungsansatz aus Gleichung 8 gewählt werden und es gilt der lineare Zusammenhang zwischen Signal R und Targetkonzentration c für die Anfangsphase der Hybridisierung. Dabei müssen folgende Voraussetzungen stets erfüllt sein: Messung zu Beginn der Hybridisierung (kurze Messzeiten), konstante Targetkonzentration (Messung im Durchfluss), Überschuss an Fangsondenmolekülen. Die Anfangssignalsteigung dR/dt an einem Spot ermöglicht dann eine Quantifizierung der Targetmoleküle unabhängig vom Fluoreszenzhintergrund.

1.3.3.3 Aufbau des Messgerätes

Eine ausführliche Beschreibung des DNA-Biosensorgerätes findet sich bei SCHULT [134]. In dieser Arbeit wurde im Wesentlichen der erste Prototyp des Auslesegerätes verwendet, der sich noch als Laboraufbau auf einem optischen Tisch befindet (Abb. 13). Das System besteht aus dem Glasprisma, auf das der Sensor-Chip mit einem Schrittmotor abgesenkt werden kann, der Anregungsoptik mit dem Lasermodul, der Detektionsoptik mit der CCD-Kamera, dem Fluidiksystem mit Pumpe und Ventil, einem Thermostaten und der elektronischen Steuereinheit. Glasprisma und Chip werden mit einem Silikonöl zu einer optischen Einheit verbunden, so dass der Laserstrahl erst an der Grenzfläche zur Messlösung total reflektiert wird.

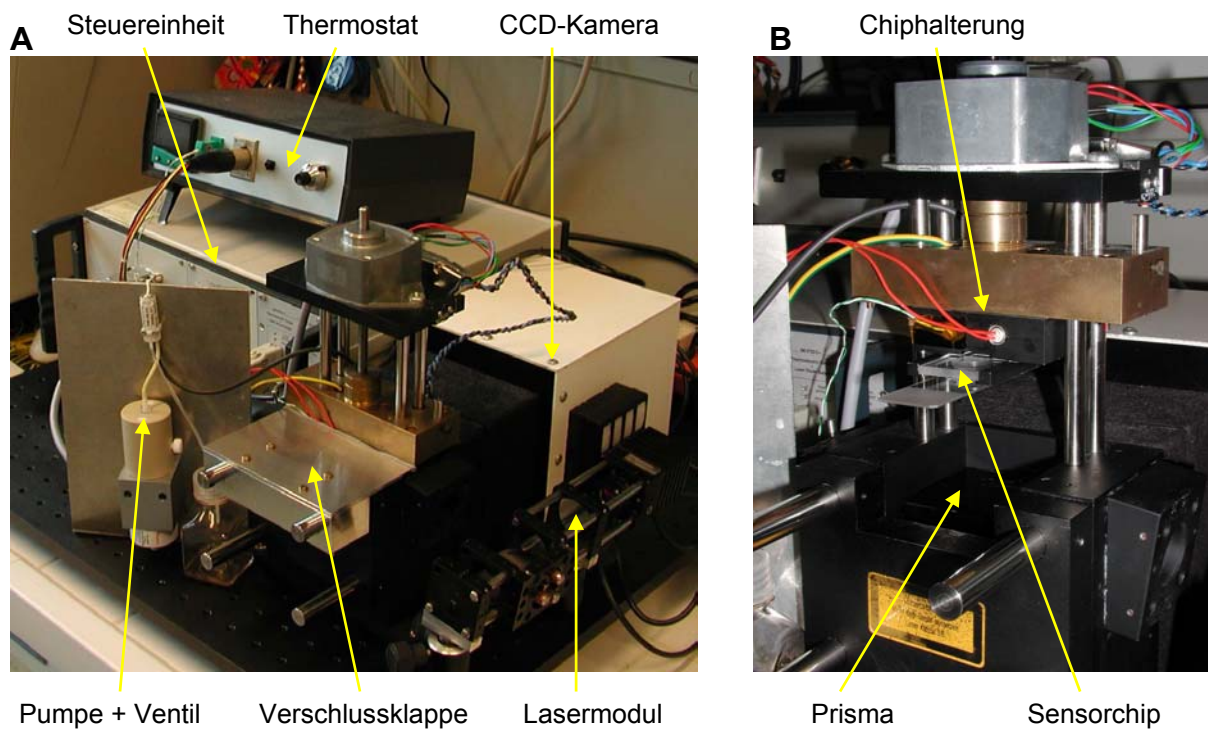


Abbildung 13: A: Aufbau des DNA-Biosensor Auslesegerätes. B: Zentrales optisches Bauteil im geöffneten Zustand.

Die Fluoreszenzanregung erfolgt mit einer Laserdiode bei 635 nm. Der Laser zeigt ein Strahlungsprofil von 7.3 mm x 1.6 mm, wobei die Laserleistung am Rand auf bis zu 50 % abfällt. Eine teilweise Relativierung wird durch einachsige Strahlaufweitung und eine Rechteckblende erreicht, eine absolut homogene Intensitätsverteilung des Anregungslichtes auf der Fläche des Sensorchips (10 mm x 10 mm) kann jedoch nicht erreicht werden. Das Fluoreszenzlicht wird von der Unterseite des Prismas über ein System aus Spiegeln und Linsen auf die sensitive Fläche der CCD-Kamera abgebildet. Die Steuerung des Systems erfolgt mit einer speziell am ICB entwickelten Software.

1.3.3.4 Aufbau des Sensorchips

Der DNA-Biosensorchip besteht aus einem Glasobjektträger, auf dem die Fangsonden immobilisiert werden und diversen Plastikteilen, die zur Ausbildung des Fließkanals aufgeklebt werden.

Aktivierung und Immobilisierung:

Die Aktivierung der Chips und die Immobilisierung der Sonden wurde nach einer Standardmethode durchgeführt [134, 140]. Das Verfahren ist in Abbildung 14 skizziert.

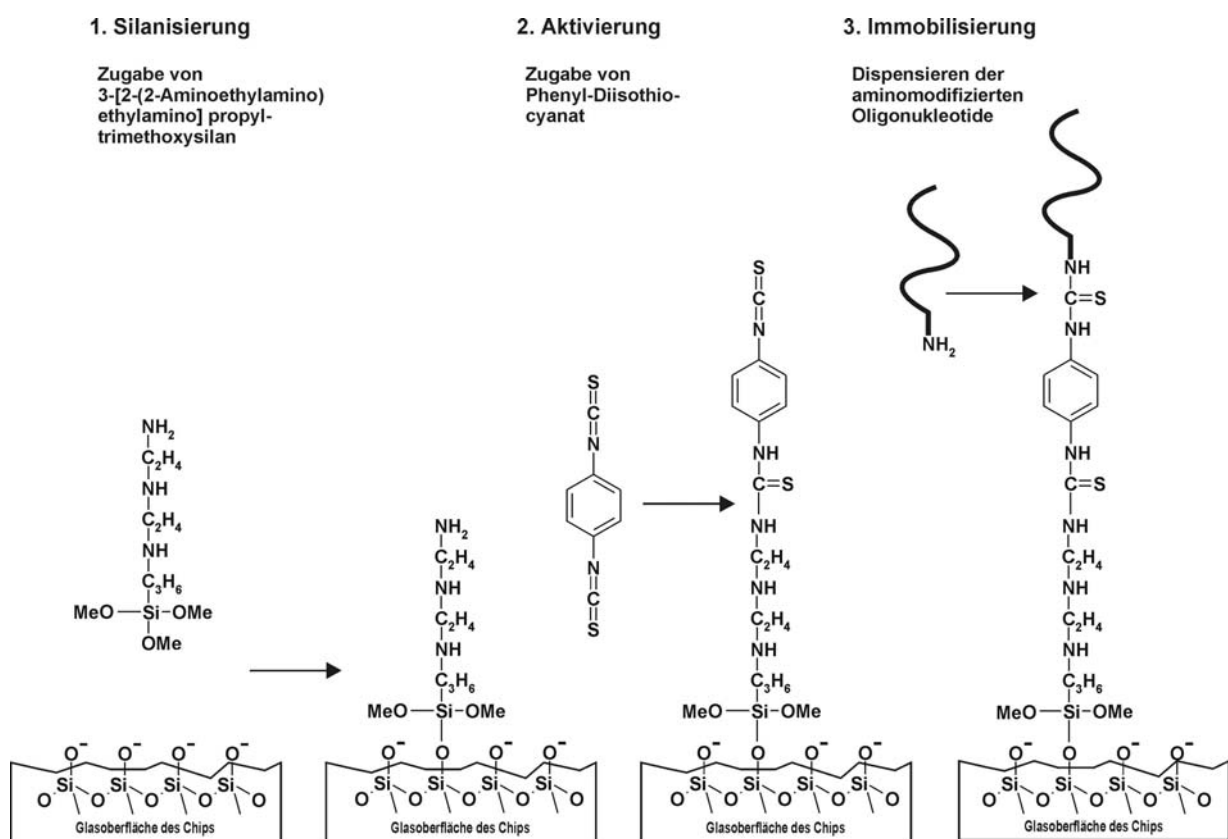


Abbildung 14: Immobilisierung von aminomodifizierten Oligonukleotid-Fangsonden auf Glasoberflächen: Ablauf der chemischen Modifikation der Glaschips.

Standardobjektträger aus Glas werden mit 3-[2-(2-Aminoethylamino)ethylamino]propyltrimethoxysilan silanisiert. Es folgt die Aktivierung mit Phenyl-diisothiocyanat. Die Isothiocyanatgruppen können dann mit 5'-aminomodifizierten Oligonukleotiden, den Sonden, reagieren. Die Sonden werden in Form eines Arrays mit einem Dispenser ortsauflöst aufgetragen. Es folgt eine Deaktivierung der noch freien Isothiocyanatgruppen mit 6-Aminohexansäure und die Oberfläche der Chips wird anschließend mit Rotiblock behandelt, um unspezifische Wechselwirkungen bei den Messungen zu minimieren.

Aufbau des Sensorchips:

Der eigentliche DNA-Sensorchip ist aus insgesamt fünf Komponenten aufgebaut, die in Abbildung 15 dargestellt sind. Die Basis des Chips bildet der Glasobjektträger mit dem immobilisierten Sondenarray. Zur Ausbildung des Fließkanals wird mit einem zugeschnittenen Klebefilm ein graues PVC-Stück mit zwei gefrästen Schlitzen, den Zu- und Abläufen des Fließkanals, aufgeklebt. Über einen weiteren zugeschnittenen Klebefilm wird das Chipoberteil aus klarem PMMA aufgeklebt. In das Chipoberteil ist neben dem Probenauslaß eine Kavität zur Aufnahme der Probe integriert.

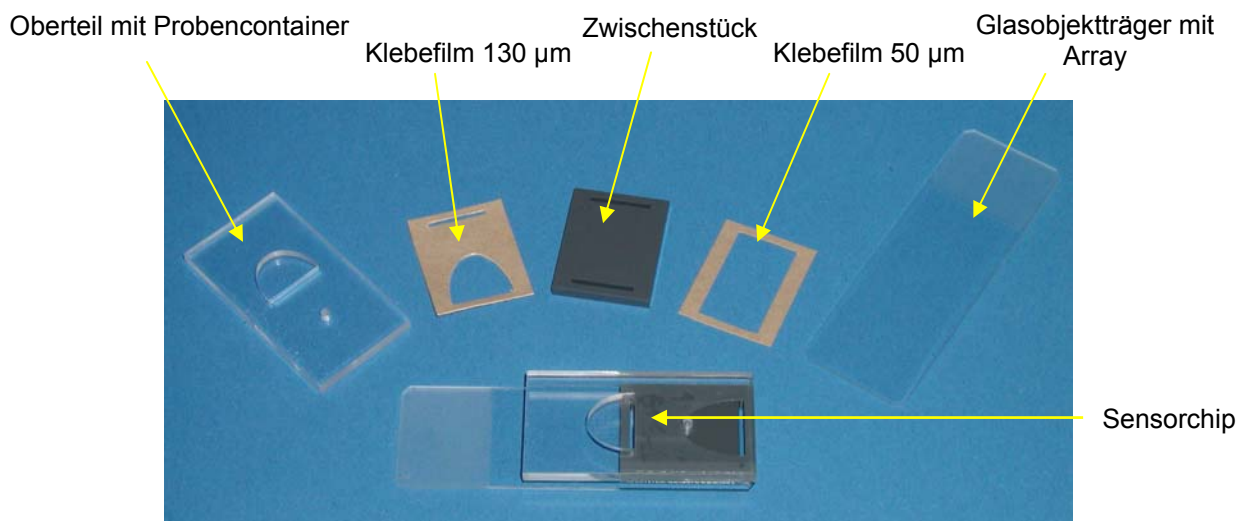


Abbildung 15: Einzelkomponenten und fertiger DNA-Biosensor-Chip.

Die genaue Positionierung des Arrays auf dem Chip ist von großer Bedeutung, da sich das Array genau im Zentrum des Laserprofils befinden soll. Die Sonden werden mehrfach im Array aufgetragen, so dass sich jeder Spot mindestens einmal im Zentrum des Arrays befindet.

1.3.4 Entwicklung eines neuen DNA-Biosensor-Chipreaders mit höherem Automatisierungsgrad

Basierend auf der Technik des ersten Prototyps ist am ICB ein weiterer DNA-Biosensor-Chip-Reader entwickelt worden (Abb. 16). Dieses Gerät besitzt einen höheren Automatisierungsgrad und eine leicht veränderte Optik. Die Laserdiode ist so angeordnet, dass das Anregungslicht nun nicht mehr umgelenkt werden muss. Die CCD-Kamera befindet sich jetzt direkt unter dem Chip, so dass auch das Detektionslicht nicht mehr umgelenkt werden muss, sondern direkt auf der sensitiven Fläche der CCD-Kamera abgebildet werden kann. Es wird daher nur ein einfaches Glasprisma benötigt und nicht mehr ein sehr anfälliges

und teures, mit Gold bedampftes Prisma. Zudem wurde eine empfindlichere CCD-Kamera eingebaut und der Laser stärker ausgelegt, um eine höhere Empfindlichkeit im Vergleich zum alten Gerät zu erreichen.

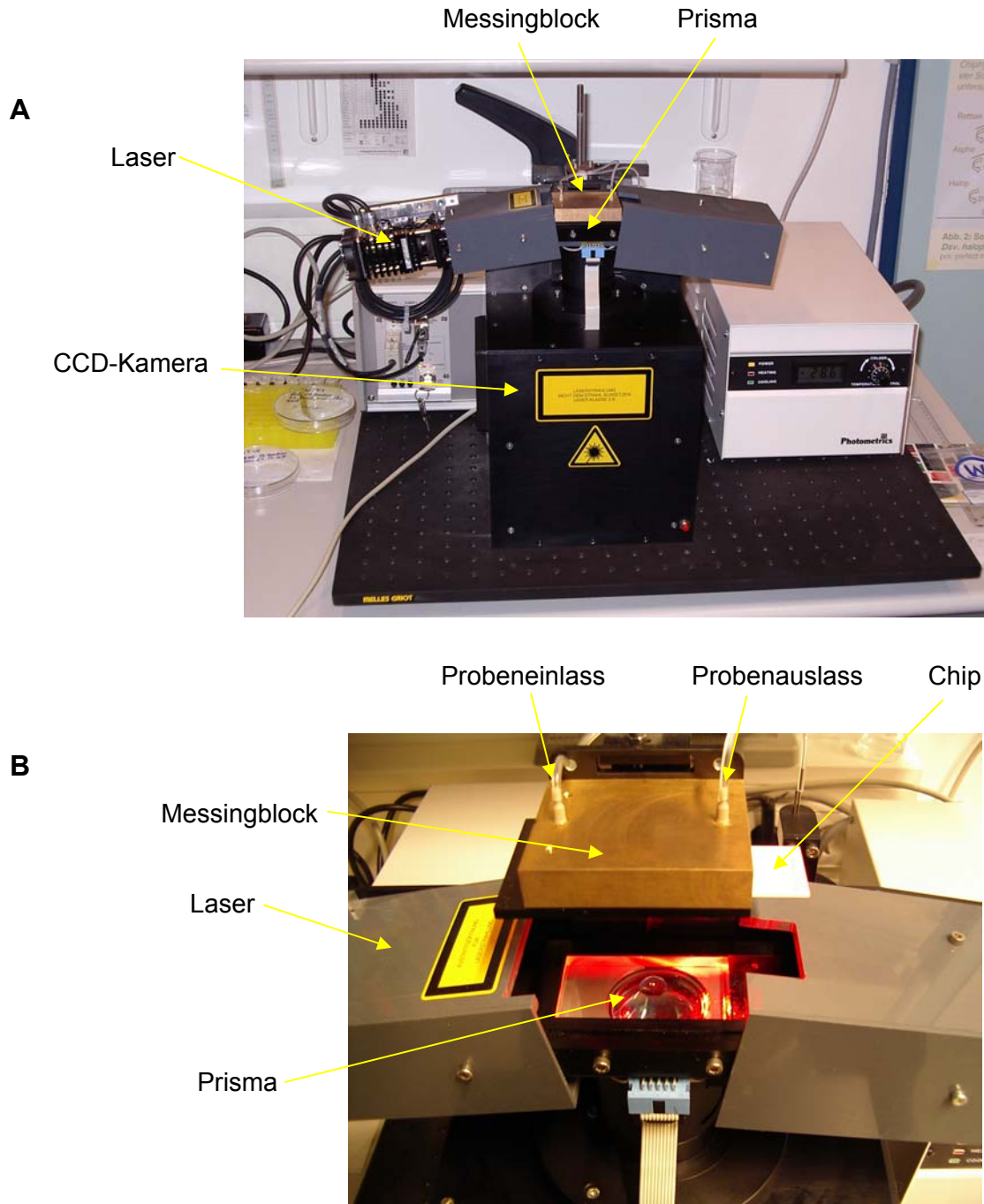


Abbildung 16: Photos des neuen DNA-Biosensor-Chipreaders.

A: Blick auf das Gerät von vorne. B: Chiphalter und Prisma im geöffneten Zustand.

Der Messingblock dient als Halter für den Chip. Er kann mittels einer Schrittmotors auf- und abwärts bewegt werden, so dass der Chip auf das Prisma abgesenkt werden kann und drückt mit seinem Gewicht den Chip in definierter Weise auf das Prisma. Chip und Prisma

werden mit einem Silikonöl zu einer optischen Einheit verbunden. An der Grenzfläche zwischen Glas und Messlösung entsteht das evaneszente Feld. Der Zu- und Abfluss der Probe erfolgt über zwei Stutzen, die in den Messingblock eingelassen sind. Eine Kolbenpumpe hinter dem Chip saugt die Probe mit gewünschter Flussrate über den Chip. Ein großer Vorteil der Neuentwicklung ist die automatisierte Probenaufnahme. Das Gerät verfügt über ein Probenvorlagekarussell, in das mehrere Probenbehälter gegeben werden können (Abbildung 17). Eine Nadel durchsticht den Deckel des Probenbehälters und die Probe wird von der Kolbenpumpe über den Chip gesaugt. Über eine spezielle Software ist es möglich, sämtliche Mess- und Waschvorgänge automatisch hintereinander ablaufen zu lassen. Beim alten DNA-Biosensor-Gerät erfolgte die Probenaufgabe manuell mit Hilfe einer Pipette in den auf dem Chip integrierten Probencontainer. Dies barg die Gefahr, dass die Probe hierbei auslief und sich mit dem Silikonöl vermischte. Diese Fehler bei der Probenaufgabe sind nun nicht mehr möglich. Weiterhin wird der Zeitaufwand für eine Messung deutlich minimiert, da die Wasch- und Regenerierungsschritte nun nicht mehr einzeln manuell ausgeführt werden, sondern automatisch direkt nach der Messung erfolgen.

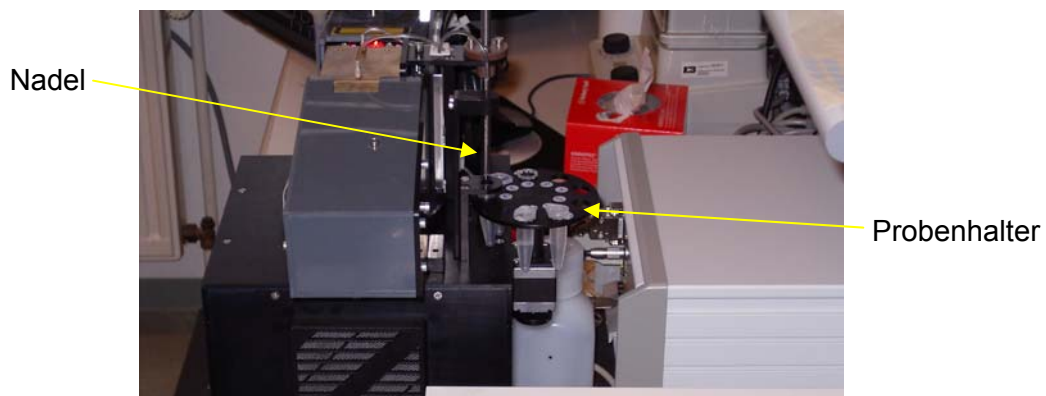


Abbildung 17: Automatisierte Probenaufnahme am neuen DNA-Biosensor-Chip-Reader.

Der Aufbau des Chips ist gegenüber dem alten DNA-Biosensor-Chip vereinfacht. Durch die automatisierte Probenaufnahme ist es nicht mehr nötig den Probencontainer im Chip zu integrieren. Weiterhin ist der Fließkanal nun nicht mehr gefaltet, sondern optimale Strömungsverhältnisse über den Chip werden durch einen längeren Fließweg gewährleistet. Der alte DNA-Chip-Reader verfügt zwar über eine Möglichkeit zu temperieren, jedoch ist die Temperatureinstellung dort sehr langsam. Beim neuen Gerät wurde die Temperierung des Chips über eine Heizung des Glasprismas realisiert, so dass nun in recht kurzer Zeit die Gleichgewichtstemperatur erreicht wird.

1.4 Tierartendifferenzierung in der Lebensmittelanalytik und in der Forensik

Die analytischen Fragestellungen in dieser Arbeit stammen aus zwei Teilbereichen der Analytik, der Lebensmittelanalytik und der Forensik. In der Lebensmittelanalytik wird die Tierartendifferenzierung in Fleisch- und Milchprodukten betrachtet, in der Forensik sollen Informationen über die Spezies einer bestimmten DNA-Probe einer kriminalistischen Untersuchung geliefert werden. Nachfolgend wird der Stand der Technik in beiden Bereichen kurz erläutert.

1.4.1 Tierartendifferenzierung in der Lebensmittelanalytik

In den letzten Jahren hat die Notwendigkeit von Lebensmittelkontrollen verschiedener Art stark zugenommen und in diesem Zusammenhang auch die Frage nach der Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln. Die Globalisierung der Märkte und die Produktion von Lebensmitteln im großindustriellen Maßstab machen Kontrollen hinsichtlich der Zusammensetzung der verschiedenen Produkte unumgänglich. Qualitätssicherung, und das Erkennen von Falschdeklarationen bzw. Verfälschungen von Lebensmitteln ist ein wichtiger Punkt, aber auch gesundheitliche Aspekte spielen eine Rolle, wie z.B. in der BSE-Problematik (Bovine Spongiformen Enzephalopathie), bei der die eindeutige Deklaration von Rindfleisch in Fleischwaren von großem Interesse ist. Für viele Allergiker ist es wichtig zu wissen, welches tierische Eiweiß sich in einem Lebensmittel befindet. Religiöse Gründe (z.B. Schweinefleisch bei Muslimen, Rindfleisch bei Hindus) können ein weiterer Grund für ein verstärktes Interesse an der genauen Zusammensetzung eines Produktes sein. Aus seuchenhygienischer Sicht ist das Erkennen von exotischen Tierarten interessant, um das Einschleppen neuer Tierseuchen zu verhindern. Vom Gesetzgeber anerkannte Verfahren zur Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln finden sich in der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 des Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz (LMBG). Prinzipiell kommen verschiedene Methoden der Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln zum Einsatz [141-143].

Bisher basierten die meisten Methoden auf dem Nachweis speziesspezifischer Proteine. Bei stark verarbeiteten oder hoch erhitzten Produkten liegen die Proteine jedoch in hohem Maße denaturiert vor, was zu Problemen bei diversen Nachweismethoden führen kann.

Gelelektrophoretische Methoden nutzen die Trennung von Proteinen im elektrischen Feld, wobei tierartenspezifische Bandenmuster erzeugt werden. Die Tierartendifferenzierung in rohen, unverarbeiteten Fleischmaterialien war mit der Elektrophorese erfolgreich möglich

[144, 145], marinierte Proben konnten jedoch nicht bestimmt werden [146]. In erhitzten Proben war eine Analyse nur mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) möglich [147, 148], bei der die Trennung der Proteine in einem pH-Gradienten erfolgt.

Verbreitet sind auch immunchemische Methoden zur Tierartendifferenzierung, bei denen spezifische Antikörper für charakteristische Tierproteine eingesetzt werden. Kreuzreaktivitäten nah verwandter Spezies sind hier jedoch oft ein Problem. Häufig eingesetzte Tests sind der Immunodiffusionstest nach OUTERLONY [149] oder diverse Enzymimmunoassays (ELISA, *enzyme-linked immuno sorbent assay*) [150, 151].

DNA-analytische Methoden basieren auf dem Nachweis speziesspezifischer DNA-Sequenzen und bieten eine größere Sensitivität und Spezifität. Da DNA wesentlich hitzebeständiger als Proteine ist und sich höchstens hinsichtlich der Länge, nicht aber im Informationsgehalt verändert, ist sie wesentlich besser für analytische Verfahren geeignet. Einen Überblick über DNA-analytische Methoden zur Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln liefern MEYER und CANDRIAN [152].

Zunächst wird die DNA aus der Lebensmittelprobe extrahiert und kann dann nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Transfer auf eine Membran z.B. durch Hybridisierung mit tierartenspezifischen Sonden in einem Southern-Blot analysiert werden [153-157]. In jüngerer Zeit finden verstärkt PCR-basierte Methoden Verwendung, bei denen speziesspezifische DNA-Sequenzen in der Probe amplifiziert und anschließend nachgewiesen werden. Die PCR-Verfahren unterscheiden sich durch die Art der gewählten Primer. In der tierartenspezifischen PCR werden Primer verwendet, die nur an der DNA einer bestimmten Tierart binden können [158, 159]. Die Primer werden zusätzlich so gewählt, dass die PCR-Produkte speziesspezifische Fragmentlängen besitzen, die mittels Gelelektrophorese detektiert werden können [160-163]. Mittlerweile gibt es diverse kommerzielle Kits für tierartenspezifische PCR-Nachweise in Lebensmitteln, wie die Animal-Kits (Alcum, Rietberg), die PCR-Kits von Coring oder die CIB-A-Kits (Cibus Biotech, Gütersloh). Im Gegensatz zu der tierartenspezifischen PCR bietet die Konsensus-PCR die Möglichkeit mit einem universellen Primerpaar alle in der Probe enthaltenen Spezies zu amplifizieren. Die Primer werden so gewählt, dass sie in Regionen anbinden, die in allen untersuchten Spezies stark konserviert sind, jedoch eine variable Region flankieren. Diese Konsensus-PCR-Produkte sind demnach alle gleich lang, unterscheiden sich aber hinsichtlich der Basenabfolge. Die Analyse der PCR-Produkte kann mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) erfolgen [164], wobei ein Restriktionsenzym die PCR-Produkte an definierten Sequenzstellen spalten. Es entstehen artspezifische Spaltprodukte, die mittels Gelelektrophorese analysiert werden können.

Die meisten PCR-RFLP-Methoden nutzen das Cytochrom B (CytB) – Gen der mtDNA, da mitochondriale DNA evolutionsbedingt eine viel höhere Mutationsrate zeigt, als nukleare DNA, so dass hier auch eine Differenzierung nah verwandter Spezies möglich wird [165, 166]. Weiterhin liegt mt-DNA in wesentlich höherer Kopienzahl in der Zelle vor, so dass größere Probenmengen für die Analytik erhalten werden. Das CytB-Gen ist für zahlreiche Spezies untersucht worden [167, 168], so dass ausreichend Sequenzdaten für die Entwicklung von Primern zur Verfügung stehen. Eine wegweisende Arbeit in diesem Zusammenhang war die von MEYER *et al.* [169], bei der 1995 mittels PCR-RFLP bis zu drei verschiedene Spezies auch in erhitzten Fleischproben auf der Basis des CytB-Gens nachgewiesen werden konnten. Es folgten diverse weitere Arbeiten mit den selben Primern [170-172].

Bei Mischproben ist die Interpretation der Bandenmuster der PCR-RFLP-Produkte jedoch häufig komplex bzw. nicht eindeutig [173, 174]. Eine gute Alternative stellen daher die wesentlich eindeutigeren Hybridisierungsassays, wie der PCR-ELISA der Firma Congen dar, bei dem in einer Mikrotiterplatte verschiedene Sonden immobilisiert werden, die mit der Proben-DNA hybridisieren können. Eine schnelle und eindeutige Erkennung der Spezies lässt sich auch mittels Hybridisierung der PCR-Produkte auf DNA-Chips realisieren, wie es unter anderem in dieser Arbeit demonstriert wird. Weiterhin können die Konsensus-PCR-Produkte mit dem DNA-Biosensor des ICB analysiert werden, der noch schnellere Ergebnisse liefert, wie von PETER gezeigt wurde [135].

1.4.2 Tierartendifferenzierung in der Forensik

Wenn von der forensischen DNA-Analytik gesprochen wird, so ist in der Regel die Untersuchung von menschlicher DNA zur Identifizierung eines Täters mit Hilfe eines Verfahrens, das umgangssprachlich auch „genetischer Fingerabdruck“ genannt wird, gemeint. Hierbei wird mittels PCR-basierter DNA-Analytik aus der DNA eines Menschen (z.B. Abstrich der Mundschleimhaut) ein Bandenmuster generiert, das wie der echte Fingerabdruck individualspezifisch ist und einem Barcode an einer Supermarktkasse ähnelt [175, 176]. Teile der menschlichen DNA werden zunächst amplifiziert, und nicht kodierende Bereiche, die so genannten STRs (*short tandem repeats*, auch Mikrosatelliten), eine Klasse von repetitiver DNA, werden mittels hochauflösender Kapillarelektrophorese untersucht. Die STRs stellen hoch-spezifische und hoch-diskriminative Systeme dar und die nahezu einmalige Kombination von Allelpaares unterschiedlicher STR-Marker werden daher zur Individualisierung und für Vaterschaftstests genutzt [177, 178]. Wichtig für die Akzeptanz in der Bevölkerung ist, dass die untersuchte, nicht kodierende DNA keinerlei Rückschlüsse auf

Gene oder Persönlichkeitsmerkmale der Person zulässt [179]. Neben der genomischen DNA kann auch mitochondriale DNA im Bereich der variablen Regionen für die Individualisierung verwendet werden [180], was vorteilhaft ist, wenn stark degradierte DNA-Proben vorliegen, wie es in forensischen Anwendungen häufig vorkommt (z.B. alte Blutspuren). Mitochondriale DNA liegt in wesentlich höherer Kopienzahl vor und eignet sich daher gut zur Spurenanalytik.

Häufig ist bei einer unbekanntem Spur, z.B. einer Blut- oder Gewebespur jedoch die erste Frage, ob es sich um menschliches Material handelt, oder um die Spur eines Tieres. Hier kommen z.B. immunologische Verfahren zum Einsatz, bei denen speziesspezifische Antikörper eingesetzt werden [181]. Prinzipiell eignet sich dieses Verfahren auch zur Unterscheidung verschiedener Tierarten. Problematisch ist jedoch, dass zu wenige passende Antikörper für die verschiedenen Spezies am Markt sind und die meisten nicht die gewünschte hohe Spezifität auf der Speziesebene zeigen, da es zu vielen Kreuzreaktivitäten kommt. Weiterhin zeigen immunologische Verfahren stets den Nachteil, dass Proteine untersucht werden, die wenig stabil sind und speziell in forensischen Spuren häufig nicht mehr in ihrer nativen Form zu finden sind. Die Tierartendifferenzierung wird daher nur selten immunologisch durchgeführt, die generelle Unterscheidung zwischen Mensch und Tier findet jedoch Anwendung. DNA-analytische Verfahren zur Erkennung menschlicher Proben sind die oben beschriebene STR-Technik oder reverse Dot-Blot-Techniken, z.B. an Hand des HLA-DQalpha-Gens [182-185]. Diese Verfahren beruhen darauf, dass die verwendeten Primer nur Primaten-DNA amplifizieren, nicht jedoch DNA anderer Spezies. Allenfalls können Amplifikate erhalten werden, die nicht die erwartete Länge besitzen.

In vielen Fällen ist jedoch eine genaue Erkennung der Tierart einer Probe gewünscht, z.B. bei der Untersuchung von unbekanntem Blut- und Gewebespuren, Knochen- oder Haarproben oder Mageninhalten, um daraus weitere Hinweise auf den Tathergang zu erhalten, aber auch bei Verkehrsunfälle mit Tieren, Wilderei oder Sachschäden durch Tiere. Morphologische Marker für bestimmte Tierarten finden zwar Verwendung [186], sind aber wenig geeignet für Untersuchungen von Wildtieren. Biochemische Merkmale wie Gallensekret Eigenschaften [187] oder der Blut-Häm-Analyse [188] werden ebenfalls zur Identifizierung genutzt. Generell ist es schwierig diese Marker in ausreichender Zahl und natürlicher Form in forensischen Proben zu finden.

Es gibt derzeit drei Ansätze, die wie in der Lebensmittelanalytik das mt-CytB-Gen zur Tierartendifferenzierung in forensischen Proben nutzen [181, 189, 190]. Teile des mt-CytB-Gens werden mittels Konsensus-PCR amplifiziert und anschließend untersucht. Der Vorteil dieser Methoden ist, dass bei Amplifikation nur kurzer Bereiche des Gens auch stark degradierte Proben noch gut amplifiziert werden können. VERMA *et al.* [190] konnten auf diese Art 221 Spezies mit nur einem universellen Primerpaar amplifizieren. Die PCR-

Produkte wurden in diesem Fall mittels Sequenzierung untersucht und die Spezies mit Datenbankrecherchen (BLAST, National Center of Biotechnology Information, NCBI) ermittelt. Das 421 Basenpaare große PCR-Produkt war kurz genug, um forensische Spuren zu untersuchen. PARSON *et al.* [181] nutzten ein 358 Basenpaar großes Amplifikat des CytB-Gens und analysierten ebenfalls mit Sequenzierung diverse forensische Proben auch aus problematischen Materialien wie Haar, Knochen, Borsten oder Federn nach Extraktion mit organischen Lösungsmitteln. Ein etwas anderer Ansatz stammt von ZEHNER *et al.* [189]. Hier wurde ebenfalls mit Konsensusprimern ein sehr großes Amplifikat des CytB-Gens hergestellt (981 von insgesamt 1140 bp). Die PCR-Produkte wurden in diesem Fall durch speziesspezifische RFLP untersucht mit den Restriktions Endonukleasen Alu I und Nco I. Es konnten Gemische von zwei und mehr Spezies analysiert werden und forensische Proben wurden exemplarisch untersucht (Mageninhalte und Knochenproben). Bei Verdacht auf menschliche DNA waren zusätzliche Tests nötig, weil das Restriktionsmuster dem ungeschnittenen Amplifikat zu ähnlich war (der Schnitt erfolgt bei 3 bp). Spezies, die evolutionär sehr nah beieinander liegen, konnten nicht differenziert werden (z.B. Huhn und Truthahn), denn obwohl die Sequenzen nur 86 % Homologie aufweisen sind, war die Lage der Restriktionsstellen zu ähnlich. Die RFLP-Methode hat jedoch ihre Vorteile bei der Analyse von Mischungen. Sequenzierungen können nur durchgeführt werden, wenn die interessierende Minorkomponente mindestens im Verhältnis 1:4 vorliegt. Die beschriebene RFLP-Studie konnte noch Gemische von 1:10 richtig analysieren.

Auf Grund der Rahmenbedingungen war zu erwarten, dass die DNA-Chiptechnologie und der DNA-Biosensor des ICB sehr gut für die Analyse der CytB-PCR-Produkte forensischer Proben eingesetzt werden können, wie mit der vorliegenden Arbeit demonstriert wird. Dies macht die aufwändigen Verfahren RFLP oder Sequenzierung überflüssig und liefert schnellere Ergebnisse.

2 Ziel der Arbeit

Auf der Basis der Oyster-Farbstoffe (Denovo Biolabels GmbH), die sich durch charakteristische *spiro*-Cyclohexylgruppen an den 3-Positionen der Indole auszeichnen, sollen weitere Cyaninfarbstoffe mit anderen *spiro*-Substituenten, insbesondere mit Piperidylsubstituenten, synthetisiert werden. Von Fluorophoren dieser Art werden verbesserte Fluoreszenzeigenschaften und erhöhte Wasserlöslichkeit im Vergleich zu den bisherigen Oyster-Farbstoffen erwartet. Der *spiro*-Piperidylsubstituent mit seiner reaktiven Aminofunktion ermöglicht weiterhin das Einführen funktioneller Gruppen, die das Fluoreszenzverhalten oder die Wasserlöslichkeit des Farbstoffes positiv beeinflussen können. Außerdem eröffnet der Piperidylsubstituent alternative Kopplungsmöglichkeiten an Biomoleküle.

Die neu synthetisierten Fluorophore sollen exemplarisch in der DNA-Analytik getestet werden. Dabei sollen sie zum einen in dem am Institut für Chemo- und Biosensorik (ICB) entwickelten DNA-Biosensor eingesetzt werden, darüber hinaus aber auch in der konventionellen DNA-Chiptechnologie.

Zunächst soll der DNA-Biosensor auf der Basis von Cy5-markierter DNA charakterisiert werden. Als biologisches Modellsystem dient die Tierartendifferenzierung in der Lebensmittelanalytik. Der bisher in einer ersten Arbeit entwickelte SONDENSATZ für die Nutztiere soll erweitert und optimiert werden. Ziel ist es, zwei Chips für die gezielte Verwendung in der Milchprodukte- und der Fleischprodukte-Analytik zu entwerfen und an Realproben zu testen. Anschließend soll das System auch auf Wildtier- und Mensch-DNA ausgeweitet werden, so dass neben der Lebensmittelanalytik auch ein Einsatz des Biosensors in der Forensik möglich ist. Im Folgenden soll DNA, die mit den neuen *spiro*-Fluorophoren markiert wurde, im DNA-Biosensor analysiert werden. Es soll geprüft werden, ob die neuen Farbstoffe für das vorliegende Messsystem geeignet sind.

Das so entwickelte und optimierte Protokoll der Tierartendifferenzierung soll weiterhin auf die konventionelle Chiptechnologie übertragen werden. Es sollen entsprechende konventionelle DNA-Chips für die Milch- und Fleischprodukte-Analytik und die Forensik entworfen und getestet werden. Die neuen *spiro*-Fluorophore sollen dann auch auf ihre Eignung für dieses weit verbreitete Detektionssystem hin untersucht werden.

3 Ergebnisse

3.1 Synthese neuer *spiro*-Cyanine

3.1.1 Einleitung

Auf der Basis der Oysterfarbstoffe wurden weitere *spiro*-Cyanine synthetisiert, wobei der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Synthese von Farbstoffen lag, in denen der *spiro*-Cyclohexylring durch einen *spiro*-Piperidylring ausgetauscht wurde (Abb. 18). Die *spiro*-Piperidylcyanine sind von großem Interesse, da die Aminofunktion im Piperidylring die Möglichkeit zur Einführung weiterer funktioneller Gruppen bietet. Es können beispielsweise die Fluoreszenzeigenschaften verbessernde oder die Wasserlöslichkeit erhöhende Gruppen am Piperidylring angebracht werden. Weiterhin kann die Kopplung des Farbstoffes an das Biomolekül über eine Funktionalisierung am Piperidin erfolgen. Von der Möglichkeit weiterer chemischer Modifikationen abgesehen, sollte sich allein das Vorhandensein einer zusätzlichen Aminofunktion schon positiv auf die Eigenschaften des Farbstoffmoleküls auswirken, da tertiäre Amine die Wasserlöslichkeit des Farbstoffes erhöhen können. Eine hohe Wasserlöslichkeit der Farbstoffe ist für die in der Regel in wässriger Phase ablaufenden Bioassays eine elementare Grundbedingung. Weiterhin sollen hohe Quantenausbeuten der Konjugate und hohe Photostabilität der Farbstoffe gewährleistet sein. Ein wichtiger Punkt ist außerdem, dass sich die Anregungswellenlänge im Bereich typischer Laserwellenlängen befindet. Für die Cyanine sind das in der Regel der rote Diodenlaser (635 nm) und der YAG-Laser (532 nm).

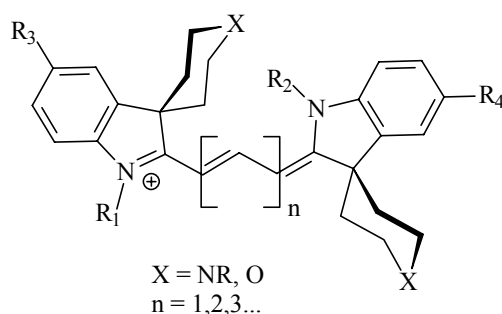


Abbildung 18: Grundstruktur der Hetero-*spiro*-Cyanine.

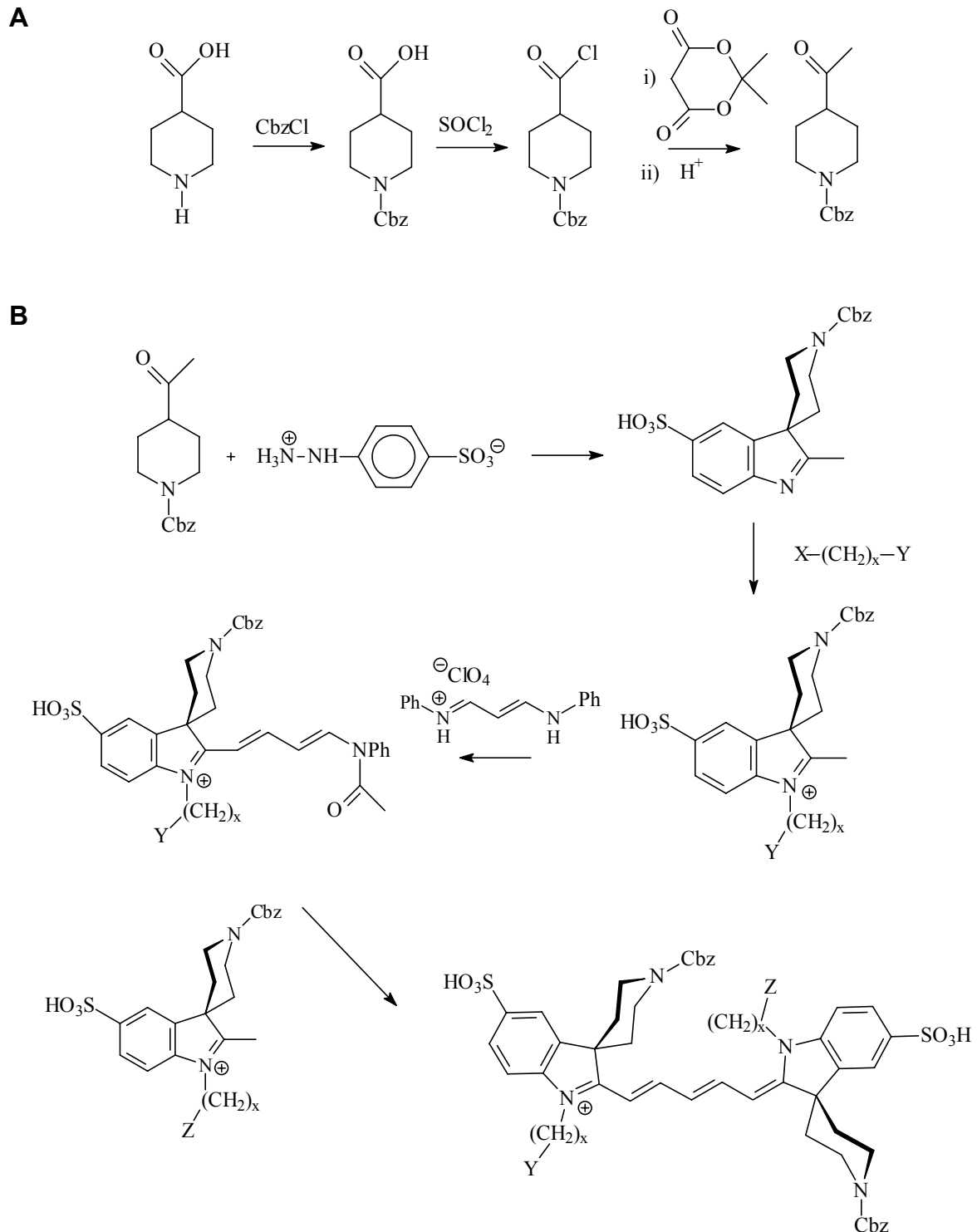
3.1.2 Synthese von *spiro*-Piperidylcyaninen

Die im Folgenden beschriebenen Synthesewege zur Darstellung der verschiedenen *spiro*-Piperidylcyanine wurden auf der Basis des Patentes von WAGGONER *et. al.* [62] entwickelt. Dabei wurden jedoch zahlreiche Abwandlungen der Synthesen vorgenommen, um die ursprüngliche Synthese an die wesentlich aufwändigere Darstellung von höher derivatisierten Cyaninen anzupassen.

Im Verlauf der Synthese der *spiro*-Piperidylcyanine wurden zunächst die benötigten Piperidylmethylketone dargestellt, welche anschließend in einer FISCHER-Indolsynthese mit Phenylhydrazinderivaten umgesetzt wurden. Die Indole wurden im Folgenden mit dem gewünschten Alkylierungsmittel quaterniert, wobei je nach Bedarf eine weitere funktionelle Gruppe in das Molekül eingeführt werden konnte. Zur Synthese symmetrischer Cyanine wurden zwei Äquivalente eines quaternären Indols mit einem Äquivalent des jeweiligen Kupplungsreagenz in einer Polymethinkondensation umgesetzt. Das verwendete Kupplungsreagenz gab den Ausschlag dafür, wie viele Doppelbindungen sich später in der Polymethinkette befanden. Zur Darstellung unsymmetrischer Cyanine wurde ein Indol zunächst zum Hemicyanin umgesetzt, das nachfolgend mit einem anderen Indol zum Cyanin reagieren konnte.

Ausgehend von Piperidin-4-carbonsäure erhält man das Piperidyl-4-methylketon in einer fünfstufigen Synthese (Abb. 19 A). Zunächst wurde die reaktive Aminofunktion durch eine Carboxybenzylgruppe (Cbz) geschützt. Es folgte die Umsetzung mit Thionylchlorid zum Säurechlorid. Die derart aktivierte Säuregruppe wurde mit MELDRUMS-Säure umgesetzt, anschließende Hydrolyse des Acylierungsproduktes mit Essigsäure lieferte das Cbz-geschützte Piperidylmethylketon. Die Cbz-Schutzgruppe konnte beispielsweise durch Hydrieren entfernt werden, häufig wurde das Piperidylmethylketon jedoch geschützt in der nachfolgenden Indolsynthese eingesetzt.

Die Schlüsselstelle in der Synthese der *spiro*-Piperidylcyanine war die Derivatisierung an der Piperidylaminfunktion. Sie kann bereits sehr früh (z.B. schon vor der FISCHER-Indolsynthese) erfolgen, oder erst gegen Ende des Syntheseweges (z.B. am fertigen Farbstoff). Eine frühe Derivatisierung zeigt den Nachteil, dass man das Syntheton schon zu Beginn der Synthese für eine bestimmte Anwendung spezifiziert. Es wurde daher zunächst ein Syntheseweg verfolgt, bei dem die Funktionalisierung am Piperidin erst am Ende der Synthese durchgeführt wird (Abb. 19 B). Dies bietet die Möglichkeit, erst am fertigen Farbstoff je nach Anwendung entsprechende Gruppen anzubringen.



Bei diesem Syntheseweg wurde die Piperidylaminofunktion zu Beginn der Synthese durch eine Cbz-Gruppe geschützt, die erst am fertigen Farbstoff wieder entfernt werden sollte, so dass dann die jeweilige Derivatisierung des Farbstoffes vorgenommen werden konnte. Das Schützen der Aminfunktion war unerlässlich, weil sich diese sehr reaktive Gruppe im Laufe des Syntheseweges mit unterschiedlichen Reagenzien, wie z.B. mit Alkylierungsmitteln umsetzen kann. Selbst die starke Cbz-Schutzgruppe war nicht vollständig beständig gegen die für die Quarternierungen benötigten starken Alkylierungsmittel. Ethyliodid war beispielsweise auf Grund seines geringen Siedepunktes nicht geeignet, die Indolaminogruppen zu quarternieren, so dass starke, hoch siedende Alkylierungsmittel wie z.B. Diethylsulfat gewählt werden mussten. Mehrstündiges Erwärmen auf Temperaturen über 100 °C mit sehr starken Alkylierungsmitteln führte jedoch teilweise zu einem Abspalten der Cbz-Schutzgruppe, so dass als Nebenprodukt der Alkylierungen immer auch am Piperidin alkyliertes Produkt erhalten wurde (etwa 5-10 %), welches säulenchromatographisch abgetrennt werden musste.

Die beiden Indolkopfgruppen wurden entweder beide mit dem selben Alkylierungsmittel quaterniert, so dass später symmetrische Farbstoffe dargestellt werden konnten, oder aber die Indole wurden mit unterschiedlichen Alkylierungsmitteln umgesetzt, so dass unsymmetrische Farbstoffe synthetisiert werden konnten. Als Alkylierungsmittel wurden Diethylsulfat, Toluolsulfonsäurediethylester, Iodhexansäure, Iodbutylacetat und Bromhexanol erfolgreich getestet. Letzteres zeigte jedoch auf Grund seiner schwächeren Alkylierungseigenschaften nur sehr mäßige Ausbeuten.

Die nicht-sulfonierten Indole ließen sich relativ leicht quarternieren. Sie reagierten in hochsiedenden Lösungsmitteln wie Toluol oder 1,2-Dichlorbenzol mit den entsprechenden Alkylierungsmitteln in wenigen Stunden. Im Fall von Diethylsulfat diente das Alkylierungsmittel selbst als Lösungsmittel für die Reaktion. Die Alkylierung von sulfonierten Indolen war Anfangs erfolglos. Die meisten organischen Lösungsmittel waren nicht geeignet das stark polare, sulfonierete Indol zu lösen, ohne Zusatz von Lösungsmitteln wurde jedoch kein Alkylierungsprodukt erhalten. Es wurde schließlich das hydrophile, sulfonierete Indol mit einem voluminösen, quartären Amin (tert.-Butylamin) als Gegenion versehen (Abb. 20). Auf diese Weise konnte das sulfonierete Indol in organischer Phase gelöst werden. Die Alkylierungen konnten dann in Acetonitril erfolgreich durchgeführt werden. Da bei der Alkylierung eine positive Ladung am Indolamin entsteht, bildet sich ein Innersalz mit der Sulfonsäuregruppe. Das Alkylierungsprodukt fiel demnach aus der organischen Phase aus und ließ sich so leicht wieder vom voluminösen Gegenion abtrennen, das in Lösung verblieb.

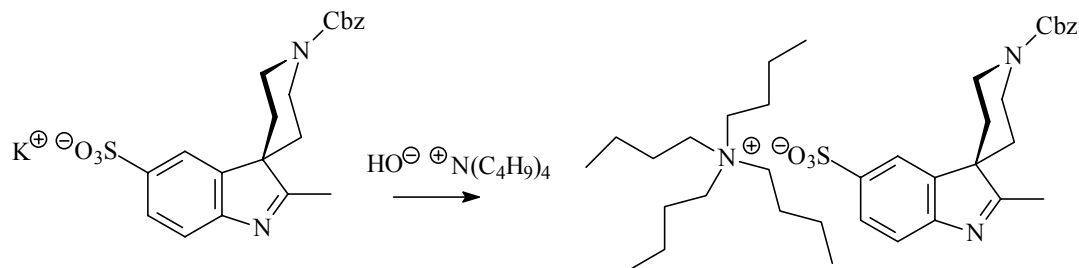


Abbildung 20: Austausch des Gegenions der Sulfonsäuregruppe.

Ein quartäres Amin als Gegenion ermöglicht Alkylierungen der sulfonierten Indole in organischen Lösungsmitteln.

Entsprechend dem Syntheseweg aus Abbildung 19 und unter Ausnutzung der Phasentransfereigenschaften des tert.-Butylaminkations wurden eine Reihe von neuartigen symmetrischen und unsymmetrischen Farbstoffen mit und ohne Sulfonsäuregruppen synthetisiert und charakterisiert (Kapitel 3.2).

Da sich zeigte, dass die Fluoreszenz von Farbstoffen mit zwei *spiro*-Gruppen relativ gering war und ihre Absorptionsmaxima sehr langwellig waren (im Vergleich mit Cy5, Kapitel 3.2.1.2 und 3.2.1.3), wurden Farbstoffe synthetisiert, die nur an einer Indolkopfgruppe einen *spiro*-Substituenten trugen. Das andere Indol wurde an der 3-Position alternativ mit zwei Methylgruppen substituiert. Abbildung 21 zeigt ein Beispiel eines solchen mono-*spiro*-Cyanins. Solche Farbstoffe zeigen bessere Fluoreszenzeigenschaften und kürzere Anregungswellenlängen. Von den mono-*spiro*-Cyaninen wurden ebenfalls diverse Derivate hergestellt und vergleichend mit den bi-*spiro*-Cyaninen charakterisiert (Kapitel 3.2).

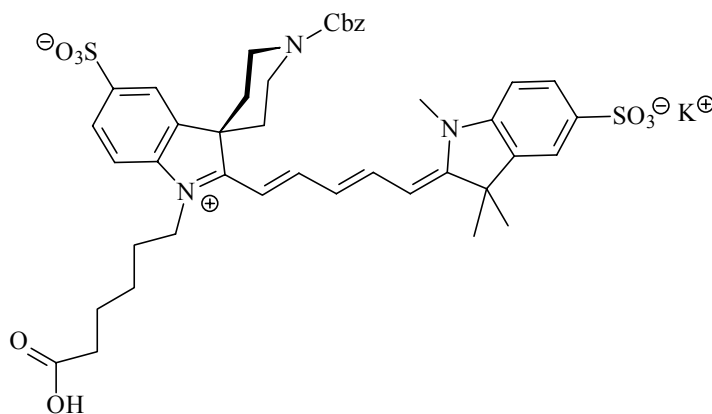


Abbildung 21: Unsymmetrischer Piperidylfarbstoff mit nur einer *spiro*-Gruppe.

Ein gemeinsames Problem tritt jedoch bei allen bisher beschriebenen Farbstoffen auf: Das chromophore System zeigt sich sehr empfindlich gegenüber den meisten Reaktionsbedingungen, die zur Entfernung der Cbz-Gruppe notwendig sind. Stark basische oder stark saure Bedingungen führten zu einer Ringöffnung des Indols, so dass sich die Farbstofflösungen sehr schnell auf Grund der Zerstörung des hochkonjugierten π -Systems entfärbten. Auch Hydrierungen erwiesen sich wegen der vielen Doppelbindungen als unbrauchbar. Nach Testen einer Vielzahl von Reagenzien für das Abspalten der Cbz-Gruppe (Trimethylsilylchlorid, AlCl_3 , Trifluoressigsäure, methanolische HCl, Bromcatecholboran, hydrieren mit Pd-Aktivkohle und Cyclohexen oder Ameisensäure) wurde dieser Syntheseweg verlassen und alternative Schutzgruppenstrategien wurden getestet.

Zunächst wurde die tert-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe (Boc) getestet. Abbildung 22 zeigt den Schutzgruppenwechsel.

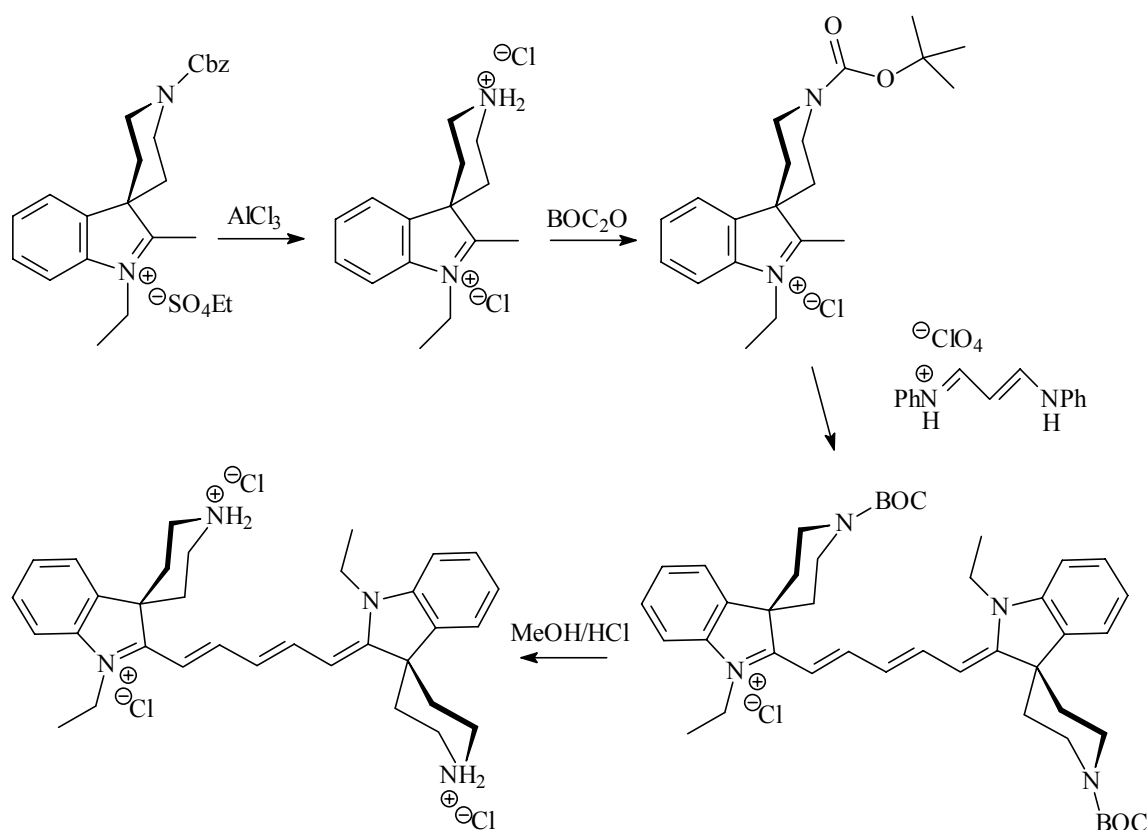


Abbildung 22: Schutzgruppenwechsel von Cbz zu Boc.

Die Boc-Schutzgruppe lässt sich schon unter schwach sauren Bedingungen, die dem chromophoren Gerüst des Farbstoffes nicht schaden, wieder abspalten. Die vergleichsweise schwache Boc-Schutzgruppe konnte jedoch erst nach der Quarternierung der Indole

eingeführt werden, da sie den harschen Alkylierungsbedingungen nicht Stand halten konnte. Die quaternierten Indole wurde daher mit AlCl_3 entschützt und anschließend mit Boc-Anhydrid umgesetzt. Dieser Wechsel der Schutzgruppe führt zu einer Verlängerung des Syntheseweges um zwei weitere Stufen, was besonders ungünstig ist, da die Umsetzungen der Cbz-Indole mit AlCl_3 nur mäßige Ausbeuten von etwa 30 - 40 % zeigten. Aus den Boc-geschützten Indolen wurde ein symmetrischer Farbstoff hergestellt, der jedoch nur in nicht zufrieden stellender Ausbeute entstand. Die sterisch sehr anspruchsvolle Boc-Gruppe scheint die Kopplung der Indole zum Farbstoff stark zu beeinträchtigen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass sich die Boc-Gruppe unter schwach sauren Bedingungen (methanolische HCl) vom Farbstoff entfernen ließ. Der Syntheseweg wurde auf Grund zu geringer Ausbeuten in unterschiedlichen Syntheseschritten und daraus resultierender nicht-Wirtschaftlichkeit jedoch wieder verworfen.

Als weitere Schutzgruppe wurde die Methoxybenzylcarbamat-Gruppe (Moz) getestet. Sie trägt im Vergleich zur Cbz-Gruppe am Phenylring in para-Position einen Methoxysubstituenten und ist daher sterisch ähnlich anspruchsvoll. Im Gegensatz zur Cbz-Gruppe lässt sich die Moz-Gruppe jedoch, wie die Boc-Gruppe, unter milden sauren Bedingungen abspalten. Die Moz-Gruppe ist ebenfalls zu schwach, um den Bedingungen der Alkylierungen der Indole Stand zu halten und wurde, wie die BOC-Gruppe, erst nach der Quarternierung eingeführt.

Die mit AlCl_3 entschützten, quarternären Indole konnten quantitativ mit Moz-ON (α -(4-Methoxybenzyloxycarbonyloxyimino)phenylacetonitril) umgesetzt werden. Die folgende Kopplung zum Farbstoff war in zufrieden stellenden Ausbeuten möglich und der Moz-geschützte Farbstoff konnte mit 10 % Trifluoressigsäure in Methanol von der Schutzgruppe befreit werden. Es wurden ein symmetrischer blauer Farbstoff und ein unsymmetrischer roter Farbstoff hergestellt, wobei bei letzterem ein Indol mit zwei Methylgruppen, statt mit einer *spiro*-Gruppe substituiert war. Rote Farbstoffe mit zwei *spiro*-Moz-Indolen konnten nicht synthetisiert werden, da der Moz-Substituent offensichtlich sterisch schon zu anspruchsvoll für die kurzkettigeren Cyanine war. Diese Synthesestrategie ermöglichte es erfolgreich Piperidylfarbstoffe zu synthetisieren, die erst als fertige Farbstoffe von ihrer Schutzgruppe befreit werden und dann mit entsprechenden aminreaktiven Reagenzien umgesetzt werden können.

Um den aufwändigen Schutzgruppenwechsel zu vermeiden wurde eine weitere Synthesestrategie erprobt, in welcher das Indol zunächst am Piperidin derivatisiert wurde und danach erst zum fertigen Farbstoff umgesetzt wurde (Abb. 23). Dies hat zwar den Nachteil, dass ein Teil der Flexibilität der Synthese eingebüsst wird, jedoch ist der größte Teil

des gesamten Syntheseweges für die unterschiedlichen Indolgruppen immer noch derselbe, so dass die meisten Synthons vielseitig verwendbar bleiben.

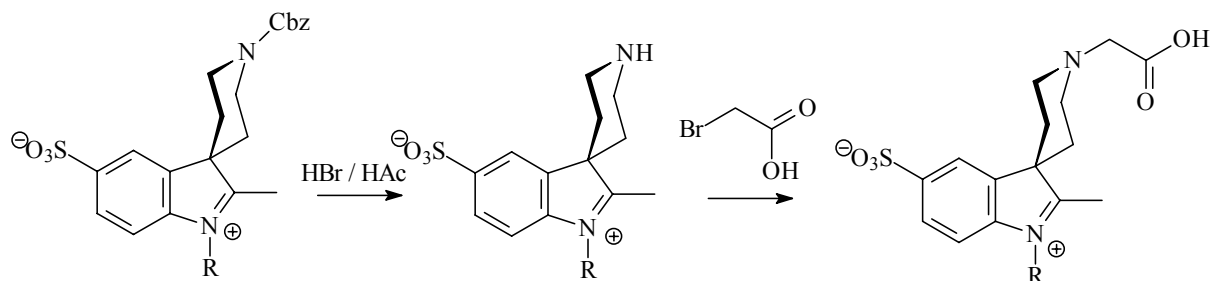


Abbildung 23: Derivatisierung des quarternären Indols mit Bromessigsäure.

In dieser Synthese wurde ein sulfoniertes Indol verwendet. Da sich die quaternierten, sulfonierten Indole nicht wie die unsulfonierten Indole mit AlCl_3 von der Cbz-Gruppe befreien ließen wurde hier die Schutzgruppe mit eine Lösung von Bromwasserstoff in Eisessig entfernt. Das derart entschützte Indol konnte statt mit einer anderen Schutzgruppe direkt mit Bromessigsäure umgesetzt werden, so dass eine Säurefunktion über einen kurzen Linker am Piperidin in das Molekül eingeführt wurde.

Wurde dieses Synthons in der Farbstoffsynthese eingesetzt, so konnte nachher leicht an der Säuregruppe weiter funktionalisiert werden, indem die Carbonsäurefunktion zunächst in eine N-Hydroxysuccinimidelesterfunktion (NHS-Esterfunktion) umgewandelt und damit aktiviert wurde. So entstand eine aminreaktive Gruppe am Farbstoff, die im wässrigen Medium bei moderaten pH-Werten reagieren kann. Es können nun Substituenten, die die Eigenschaften des Farbstoffes beeinflussen sollen, als Aminderivate an den Farbstoff gekoppelt werden (z.B. PEG, hydrophile Gruppen etc.). Eine andere Variante ist, den Farbstoff direkt über die NHS-Esterfunktion an aminomodifizierte Biomoleküle zu koppeln. Abbildung 24 zeigt einen Piperidylfarbstoff für die Kopplung an Biomoleküle über die *spiro*-Piperidylfunktion.

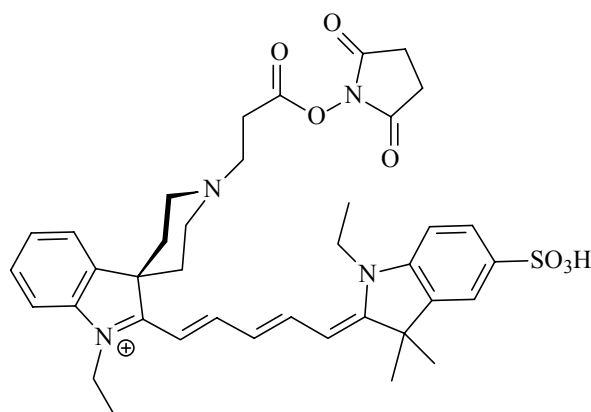


Abbildung 24: Piperidylfarbstoff für die Kopplung an Biomoleküle über die *spiro*-Piperidylgruppe.

Der Farbstoff in Abbildung 24 besitzt durch die Substitution mit Bromessigsäure nur einen relativ kurzen Linker zum Biomolekül. Dies kann bei der Kopplung ein Nachteil sein, da es zu verstärkter Wechselwirkung zwischen Biomolekül und Farbstoff kommen kann.

Um auch einen Farbstoff mit längerem Linker zu synthetisieren, wurde Iodhexansäure ebenfalls zur Alkylierung des Piperidins getestet. Zunächst wurden Alkylierungen mit Iodhexansäure am quarternären Indol versucht, wobei jedoch kein Produkt erhalten wurde. Alternativ wurde das noch nicht quaternierte Indol mit AlCl_3 entschützt, was quantitativ möglich war, und dann mit Iodhexansäure erfolgreich alkyliert. Dieses Produkt ließ sich jedoch im Anschluss nicht zufrieden stellend mit Diethylsulfat quaternieren. Eine weitere getestete Strategie war die Alkylierung des Piperidylmethylketons mit Iodhexansäure. Das daraus synthetisierte Indol lässt sich jedoch, wie vermutet, ebenfalls nicht mit Diethylsulfat quaternieren. Da diese Synthesewege prinzipiell viel versprechend erscheinen, sollte an der Optimierung der Quarternierungsbedingungen noch weiter gearbeitet werden. Abbildung 25 fasst die verschiedenen Synthesewege zusammen.

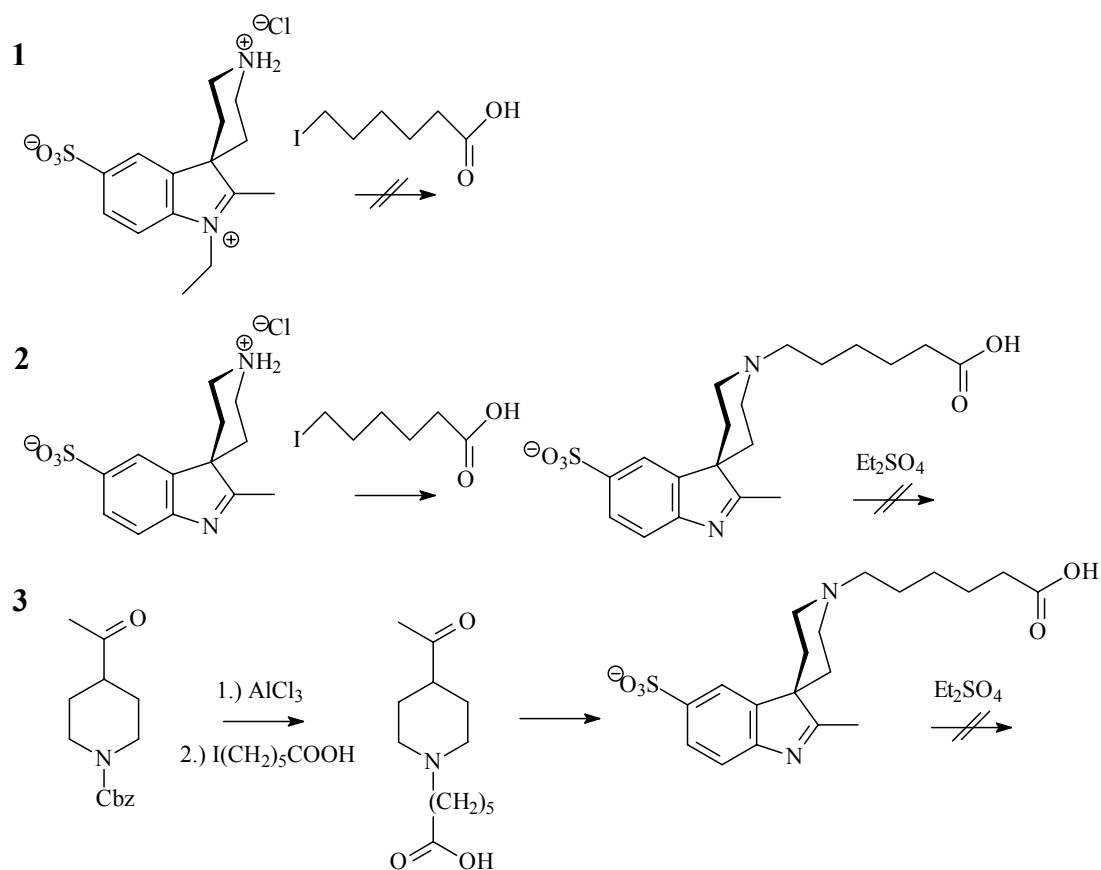


Abbildung 25: Drei bisher nicht erfolgreiche Synthesewege zur Derivatisierung des Piperidylamins mit Iodhexansäure.

1: Alkylierung am quarternären Indol. 2: Alkylierung des Indols vor der Quarternierung. 3: Alkylierung des Piperidylmethylketons.

Ein nachträgliches Verlängern des kürzeren Essigsäure-Linkers sollte jedoch ebenfalls möglich sein. Dies bietet sogar diverse Vorteile gegenüber der Einführung eines längeren Linkers mittels Iodhexansäure. Beispielsweise wäre es möglich statt eines einfachen Alkyl-Linkers einen hydrophileren Linker zu wählen. Die Firma Denovo-Biolabels hat verschiedene hydrophile Linker entwickelt und optimiert, die hier zum Einsatz kommen könnten.

Ein weiterer interessanter Piperidylfarbstoff konnte synthetisiert werden, der ebenfalls deren Potential als Biomarker unter Beweis stellt (Abb. 26). Dieser Farbstoff war sehr gut wasserlöslich und zeigte gleichzeitig ein sehr kurzweiliges Anregungsmaximum (643 nm). Offensichtlich übt schon die zusätzliche Aminofunktion im Piperidylring allein einen positiven Einfluss auf die Eigenschaften des Farbstoffes aus. Kopplungsfähige Derivate dieser Grundstruktur wurden bereits beschrieben.

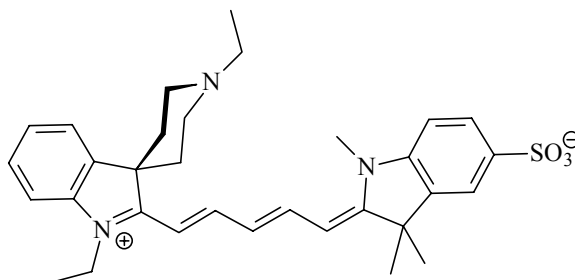


Abbildung 26: Asymmetrischer Piperidylfarbstoff, mit hoher Wasserlöslichkeit und sehr kurzem Anregungsmaximum.

3.1.3 Synthese weiterer Cyanin-Farbstoffe

Neben den oben beschriebenen Piperidylfarbstoffen wurde noch eine Reihe weiterer *spiro*-Cyanin-Farbstoffe synthetisiert und auf ihre Fluoreszenzeigenschaften und ihre Eignung als Biomarker getestet. Sie werden im Folgenden beschrieben.

3.1.3.1 Synthese von Stearylfarbstoffen

Ein Derivat des Oy656 mit sehr langen Alkylresten an den Indolgruppen wurde für das Färben von Zellmembranen synthetisiert. Dazu wurde das Indol mit Stearyliodid quarterniert. Der daraus synthetisierte Farbstoff kann sich nun mit seinen langen Alkylketten in die Zellmembranen einlagern und diese somit färben. Abbildung 27 zeigt die Struktur der dargestellten Stearylfarbstoffe.

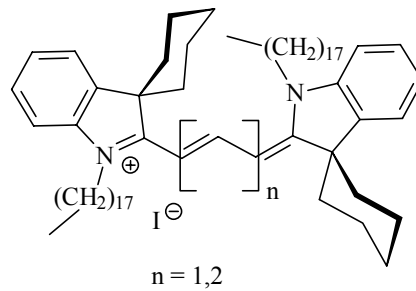


Abbildung 27: Stearylfarbstoffe in roter ($n = 1$) und blauer ($n = 2$) Form zum Färben von Zellmembranen.

Die Farbstoffe wurden in Zusammenarbeit mit Dr. J. Wegener (Institut für Biochemie, Münster) im Einsatz für das Färben von Zellmembranen erfolgreich getestet. Es wurden NRK-Zellen (*normal rat kidney*) mit dem roten Stearylfarbstoff behandelt und die Färbung der Zellmembran anschließend im CLSM betrachtet. Abbildung 28 zeigt zwei der CLSM-Bilder. Die Ergebnisse waren vergleichbar mit den Bildern, die mit dem in dieser Arbeitsgruppe üblicherweise verwendeten Cy5-Farbstoff erhalten wurden.

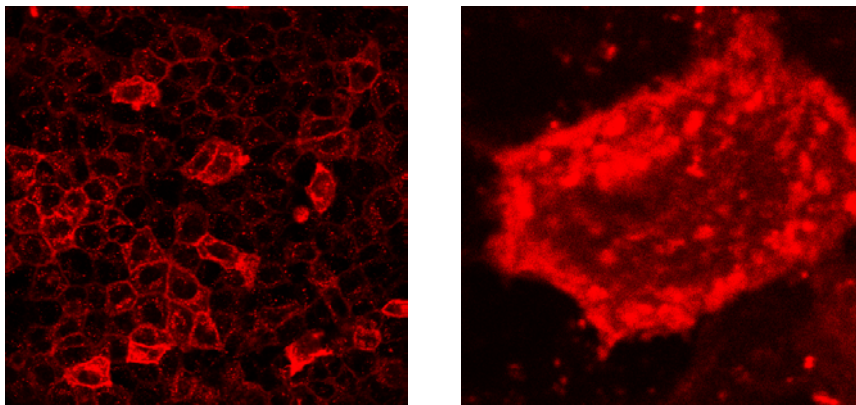


Abbildung 28: CLSM-Aufnahmen von NRK-Zellen, deren Zellmembranen mit dem Stearylfarbstoff gefärbt wurden.

Links: Ausschnitt über mehrere Zellen. Rechts: Eine einzelne Zelle.

3.1.3.2 Synthese von *spiro*-Cyclopentylfarbstoffen

Es zeigte sich bei allen bisher betrachteten *spiro*-Farbstoffen, dass die sterisch anspruchsvollen *spiro*-Gruppen im Vergleich zur einfachen Substitution des Indols in 3-Position mit zwei Methylgruppen zwar den Vorteil besitzen, Wechselwirkungen mit dem Biomolekül zu reduzieren, andererseits aber auch die Fluoreszenz vermindern und zu einer Rotverschiebung der Absorptions- und Emissionsmaxima führen (vergl. Kapitel 3.2.1.2 und

3.2.1.3). In einem weiteren Ansatz wurden daher *spiro*-Cyclopentylfarbstoffe synthetisiert, die an der 3-Position des Indols mit einem *spiro*-Cyclopentylring substituiert sind. Es wurde erwartet, dass der sterisch weniger anspruchsvolle Cyclopentylring zu einer höheren Fluoreszenzausbeute und einer geringeren Rotverschiebung der Farbstoffe führt. Die Synthese der Cyclopentylfarbstoffe sollte damit auch weitere Informationen darüber liefern, wie sich die Art der Substitution am Indol auf die Eigenschaften des Farbstoffes auswirkt. Auf der Grundlage der Ergebnisse könnten Modelle zur Erklärung des Fluoreszenzverhaltens aufgestellt werden. Die Synthese der *spiro*-Cyclopentylfarbstoffe ist im Folgenden dargestellt (Abb. 29):

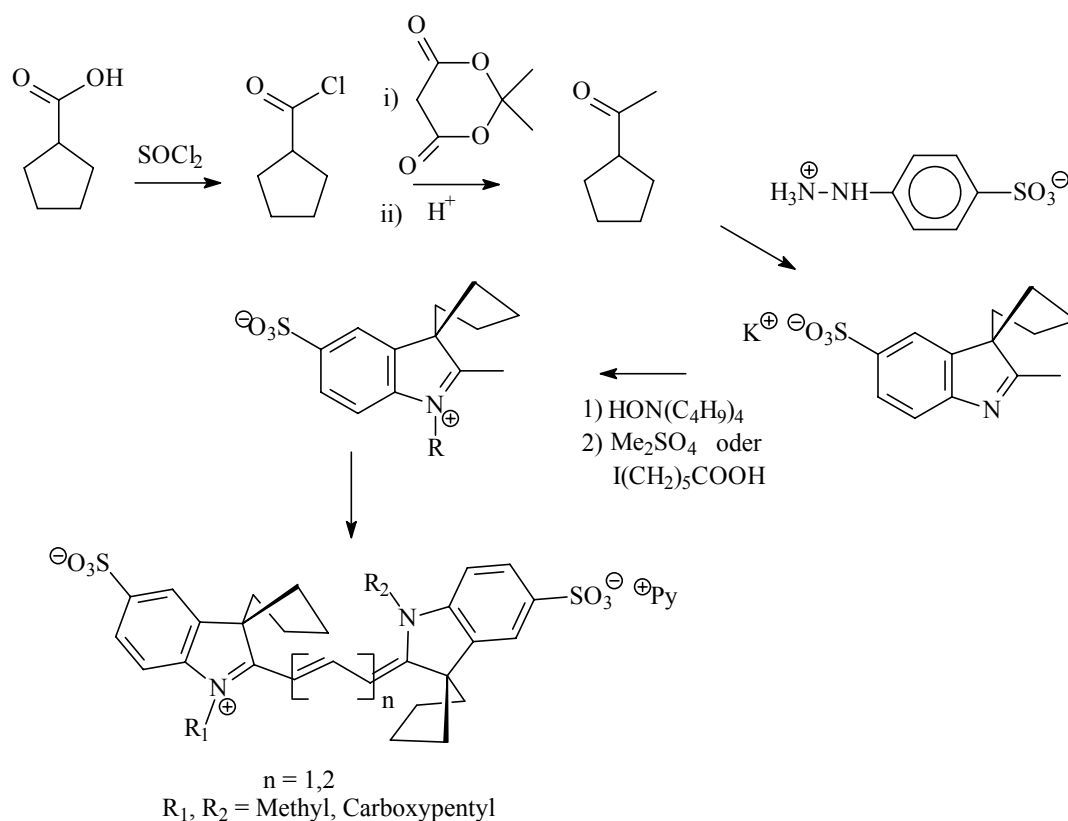


Abbildung 29: Synthese von *spiro*-Cyclopentylfarbstoffen.

Die neu entwickelte Synthesestrategie für die Darstellung des Piperidylmethylketons wurde auf die Synthese des Cyclopentylmethylketons übertragen. Nach Aktivierung der Säurefunktion der Cyclopentylcarbonsäure mittels Thionylchlorid wurde mit MELDRUMS-Säure acyliert und anschließend mit Essigsäure hydrolysiert. Das Cyclopentylmethylketon wurde mit Phenylhydrazinsulfonsäure zum sulfonierten Indol umgesetzt, das mit dem voluminösen tert.-Butylammoniumkation versehen wurde, um die folgende Quaternierung in organischer Phase zu ermöglichen. Als Quaternierungsmittel kamen Dimethylsulfat,

Diethylsulfat und Iodhexansäure zum Einsatz. Die quaternären Indole wurden dann zu den gewünschten Cyaninen umgesetzt.

Es wurden sowohl symmetrische di-Cyclopentylfarbstoffe ($R_1, R_2 = \text{Methyl/Ethylgruppe}$) als auch unsymmetrische Analoga ($R_1 = \text{Methylgruppe}, R_2 = \text{Carboxypentylgruppe}$) in roter ($n = 1$) und blauer ($n = 2$) Form synthetisiert. Weiterhin wurden Farbstoffe, die nur eine *spiro*-Cyclopentylgruppe trugen und auf der anderen Seite ein Dimethylindol besaßen hergestellt. Es wurde mit den Cyclopentylfarbstoffen eine weitere Farbstoffklasse mit interessanten Eigenschaften erschlossen die in Kapitel 3.2 beschrieben werden.

3.1.3.3 Farbstoffe mit nicht indolischen Kopfgruppen

Es wurden weiterhin diverse Farbstoffe synthetisiert, die nur auf der einen Seite eine *spiro*-Indol-Kopfgruppe trugen, auf der anderen Seite eine Kopfgruppe, die nicht auf der Indolstruktur beruhte. Die Indolstruktur ist relativ empfindlich gegenüber Basen. Für einige biochemische Kopplungsmethoden, z.B. in der Phosphoramiditchemie, ist jedoch eine höhere Basenstabilität wünschenswert. Es wurde daher überprüft, ob der Ersatz eines Indols durch eine andere Gruppe wie z.B. Benzoxazol zu einer höheren Basenstabilität des Farbstoffes führt. Gleichzeitig ist es von großem Interesse, wie sich das Fluoreszenzverhalten dieser Farbstoffe darstellt. Abbildung 30 zeigt die verschiedenen Farbstoffe, die zu diesem Zweck synthetisiert wurden.

Die Basenstabilität der Farbstoffe wurde getestet, indem die wässrigen Farbstofflösungen mit wenigen Tropfen konzentrierter NaOH-Lösung versetzt wurden. In der Regel entfärbten sich alle Lösungen schlagartig bei einem pH-Wert über 10. Die Reaktion war jedoch teilweise reversibel. Setzte man zu den farblosen Lösungen einige Tropfen HCl-Lösung zu, so kehrte die blaue Farbe teilweise zurück. Eine vollständige Reversibilität war jedoch nicht gegeben, was sich an der weniger intensiven Blaufärbung bzw. einer Grünfärbung der Lösungen auf Grund entstandener gelber Nebenprodukte zeigte.

Einzig bei den Pyridinfarbstoffen (Abb. 30, 3. und 5.) konnte eine Erhöhung der Basenstabilität verzeichnet werden. Diese Farbstoffe blieben in alkalischer Lösung noch mehrere Stunden blau, bis sie sich langsam entfärbten. Die Fluoreszenz der Pyridinfarbstoffe war jedoch deutlich schwächer, als die Fluoreszenz der Di-Indol-Farbstoffe. Die mono-indolischen Farbstoffe waren demnach keine gute Alternative zu den Di-Indol-Cyaninen.

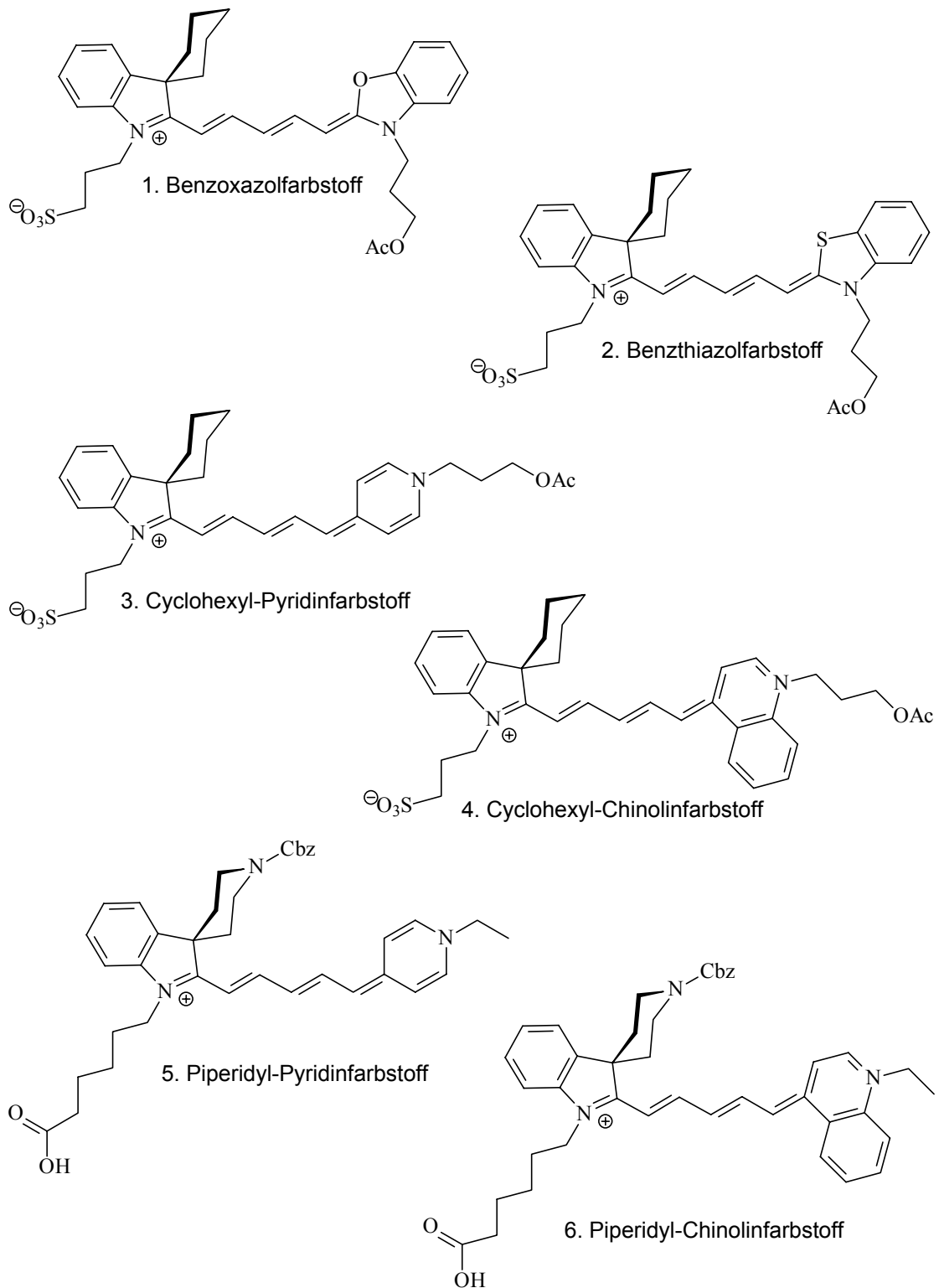


Abbildung 30: Farbstoffe mit anderen Kopfgruppen als Indolen.

3.2 Charakterisierung der Fluorophore und der DNA-Konjugate

3.2.1 Eigenschaften der spiro-Cyaninfarbstoffe

Die verschiedenen neuen Cyanine wurden auf einige für typische biologische Anwendungen wichtige Eigenschaften getestet, wie Wasserlöslichkeit oder Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften.

3.2.1.1 Wasserlöslichkeit

Fluorophore, die als Biomarker eingesetzt werden sollen, müssen diversen Kriterien genügen. Eine wichtige Grundvoraussetzung ist eine hohe Wasserlöslichkeit. Je hydrophiler ein Farbstoff ist, desto besser eignet er sich zur Markierung von Biomolekülen, da die meisten Assays, in denen fluorophormarkierte Biomoleküle eingesetzt werden, im wässrigen Milieu ablaufen. Cyaninfarbstoffe an sich zeigen eine geringe Wasserlöslichkeit, so dass in der Regel zusätzliche Gruppen eingeführt werden müssen, die das Molekül hydrophiler machen. Die Cy-Farbstoffe (Cy5, Cy3) besitzen beispielsweise Sulfonsäuregruppen, um die Wasserlöslichkeit der Farbstoffe erhöhen.

Die Piperidylfarbstoffe hingegen besitzen tertiäre Aminogruppen in den *spiro*-Ringen. Je nach pH-Wert liegen diese Gruppen in wässriger Lösung geladen vor und erhöhen somit die Wasserlöslichkeit des Farbstoffes deutlich, wie an Hand von Retentionszeiten in der HPLC nachgewiesen werden konnte. Dazu wurden die HPLC-Chromatogramme von Cy5, Oy656 und des Piperidylfarbstoffes Pip (Abb. 31) auf einer Kromasil C18 – Säule mit einem Acetonitril/Wasser-Gradienten vergleichend aufgenommen. Eine kürzere Retentionszeit zeigte eine größere Hydrophilie des Farbstoffs. Es ergaben sich Retentionszeiten von 16.1 min für Cy5, 18.8 min für Pip und 19.2 min für Oy656. Damit ist Pip deutlich hydrophiler als Oy656, obwohl dieser Piperidylfarbstoff nur eine Sulfonsäuregruppe trägt, Oy656 jedoch zwei. Offensichtlich hat die Aminofunktion im Piperidylring die Wasserlöslichkeit entsprechend erhöht. Schon aus diesem Grund ist es günstig, den hydrophoben *spiro*-Cyclohexylring des Oy656 gegen einen Piperidylring zu tauschen.

Cy5 mit zwei Sulfonsäuregruppen und ohne die hydrophoben *spiro*-Gruppen ist jedoch noch deutlich hydrophiler als Pip. Die Einführung von weiteren Sulfonsäuregruppen in das Piperidylmolekül sollte also auch hier zu erhöhter Wasserlöslichkeit führen. Da die Kopplung bei Pip über die 3-Position des Indols erfolgt, wäre es möglich, außer den Sulfonsäuregruppen in 5-Position direkt am Indol auch an der 1-Position über einen kurzen Linker Sulfonsäuregruppen einzuführen. Mit der Piperidylstruktur wäre es also möglich bis zu vier Sulfonsäuregruppen am Farbstoff zu realisieren. Auch andere hydrophile Gruppen, wie

weitere Aminofunktionen könnten angebracht werden. Das Piperidylgerüst bietet damit die Möglichkeit extrem hydrophile Farbstoffe zu synthetisieren.

Das Chromatogramm von Pip zeigt darüber hinaus, dass dieser Farbstoff im Vergleich zu kommerziell erhältlichen Farbstoffen wie Cy5 sehr rein vorliegt. Es findet sich nur ein nennenswerter Peak (4.3 %) neben dem eigentlichen Farbstoffpeak (91.2 %) (Abb. 31). Der hohe Reinheitsgrad des Farbstoffes wurde durch mehrfaches Reinigen mittels FPLC (RP-18) erreicht.

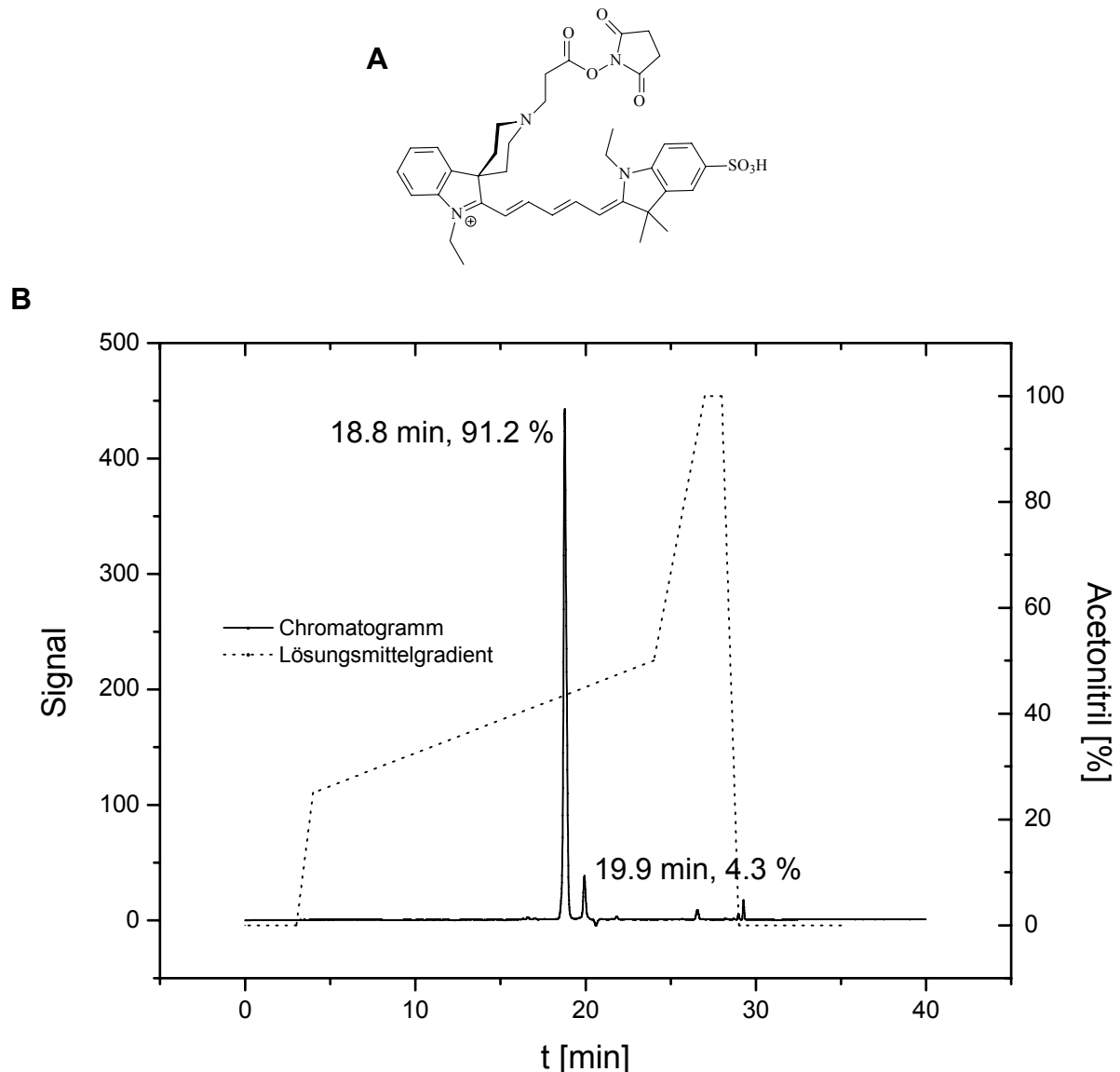


Abbildung 31: HPLC-Chromatogramm des Piperidylfarbstoffes Pip.

A: Struktur des Piperidylfarbstoffes Pip. B: HPLC-Chromatogramm und Lösungsmittelgradient. Es wurde ein Gradient aus Acetonitril und Wasser gewählt. Beiden Lösungsmitteln war jeweils 0.1 % Trifluoressigsäure zugesetzt.

3.2.1.2 Absorptions- und Emissionsmaxima

Die Absorptions- bzw. Emissionsmaxima der Fluorophore sind weitere wichtige Größen. In den meisten bioanalytischen Methoden werden Standardlaser verwendet. Die Farbstoffe müssen mit ihren Anregungsmaxima im Bereich der typischen Laserwellenlängen liegen. Die Cyanine können z.B. mit dem roten Diodenlaser bei 635 nm (für die blauen Farbstoffe) oder mit dem YAG-Laser bei 532 nm (für die roten Farbstoffe) angeregt werden. Je näher das Absorptionsmaximum des Fluoreszenzfarbstoffes an der Emissionswellenlänge des Lasers liegt, desto besser kann er angeregt werden und desto intensiver wird die resultierende Fluoreszenz sein. In Tabelle 1 sind die Absorptions- und Emissionswellenlängen einiger der synthetisierten Farbstoffe in Wasser oder Ethanol vergleichend gezeigt.

Wie wichtig ein möglichst kurzwelliges Absorptionsmaximum für die resultierende Fluoreszenzintensität ist, zeigt Abbildung 32. Für den Farbstoff Oy656 mit zwei *spiro*-Cyclohexylgruppen wurde beispielsweise bei Anregung mit 635 nm (roter Diodenlaser) nur 60 % der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Anregung am Absorptionsmaximum (656 nm) gefunden. Eine Optimierung der Synthese hinsichtlich möglichst kurzwelliger Absorptionsmaxima war demnach für das Erreichen hoher Fluoreszenzintensitäten der resultierenden Farbstoffe extrem wichtig.

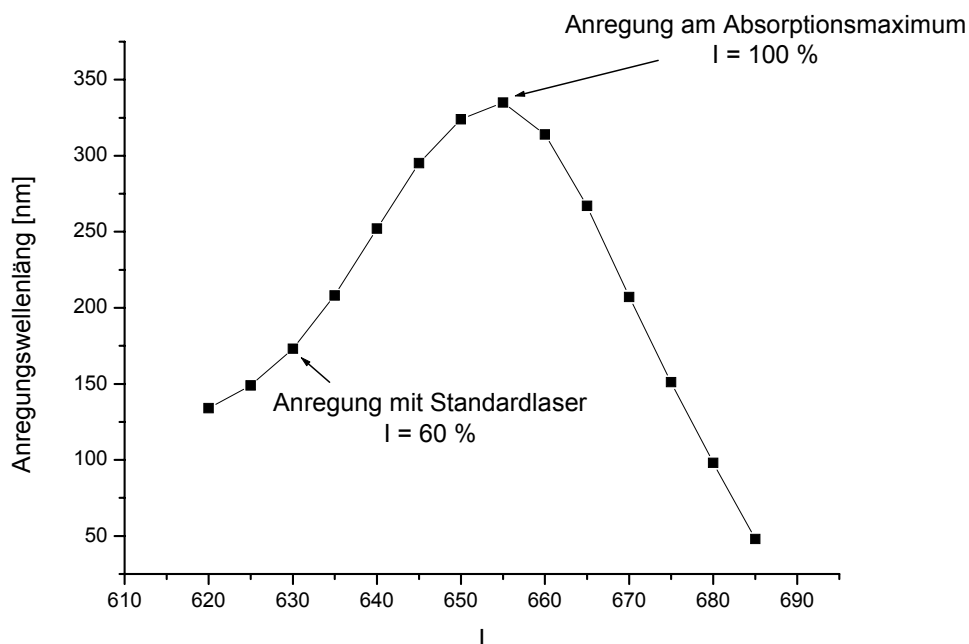
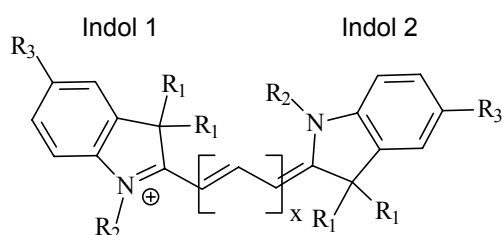


Abbildung 32: Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge bei Oy656.

Tabelle 1: Absorptions- und Emissionswellenlängen einiger synthetisierter Farbstoffe im Vergleich. (Zur genaueren Bezeichnung der Farbstoffe und deren Substituenten bitte die beigefügte Strukturformel beachten.)

Farbstoff: n - Indol 1: (RN), R1, R2, R3 / Indol 2: (RN), R1, R2, R3	Abs. in H ₂ O [nm]	Abs. in EtOH [nm]	Em. in H ₂ O [nm]	Em. in EtOH [nm]
Farbstoffe ohne spiro-Gruppen:				
5 - DM, (CH) ₅ COOH, SO ₃ H / DM, (CH) ₅ COOH, SO ₃ H (Cy5)	647	652	664	-
3 - DM, (CH) ₅ COOH, SO ₃ H / DM, (CH) ₅ COOH, SO ₃ H (Cy3)	549	-	-	-
Farbstoffe mit spiro-Cyclohexylgruppen:				
5 - CH, C ₂ H ₆ , SO ₃ H / DM, (CH) ₅ COOH, SO ₃ H	652	660	670	-
5 - CH, (CH) ₅ COOH I, SO ₃ H / CH, (CH) ₅ COOH, SO ₃ H (Oy656)	656	657	674	-
3 - CH, (CH) ₅ COOH I, SO ₃ H / CH, (CH) ₅ COOH, SO ₃ H (Oy556)	557	-	-	-
Farbstoffe mit spiro-Cyclopentylgruppen:				
5 - CP, CH ₃ , SO ₃ H / DM, CH ₃ , SO ₃ H	647	-	-	-
5 - CP, (CH) ₅ COOH, SO ₃ H / DM, CH ₃ , SO ₃ H	651	-	669	-
5 - CP, C ₂ H ₆ , SO ₃ H / DM, (CH) ₅ COOH, SO ₃ H	651	-	668	-
5 - CP, CH ₃ , SO ₃ H / CP, CH ₃ , SO ₃ H	651	-	669	-
5 - CP, C ₂ H ₆ , SO ₃ H / CP, (CH) ₅ COOH, SO ₃ H	653	-	674	-
3 - CP, (CH) ₅ COOH, SO ₃ H / DM, CH ₃ , SO ₃ H	547	-	-	-
3 - CP, CH ₃ , SO ₃ H / DM, CH ₃ , SO ₃ H	551	-	-	-
Farbstoffe mit spiro-Piperidylgruppen:				
5 - (C ₂ H ₆), Pip, C ₂ H ₆ / (C ₂ H ₆), Pip, C ₂ H ₆	645	-	617	-
5 - (CH ₂ COOH), Pip, C ₂ H ₆ / DM, C ₂ H ₆ , SO ₃ H	647	-	667	-
5 - (Cbz), Pip, (CH) ₅ COOH, SO ₃ H / CH, C ₂ H ₆ , SO ₃ H	-	660	-	683
5 - (Cbz), Pip, C ₂ H ₆ , SO ₃ H / (Cbz), Pip, C ₂ H ₆ , SO ₃ H	662	671	-	689
5 - (Cbz), Pip, C ₂ H ₆ / (Cbz), Pip, C ₂ H ₆	-	662	-	680
5 - (Cbz), Pip, C ₂ H ₆ / (Cbz), Pip, (CH) ₅ OH	-	665	-	687
5 - (Cbz), Pip, (CH) ₅ COOH / (Cbz), Pip, (CH) ₅ COOH	-	667	-	689
3 - (HBr), Pip, (CH) ₅ COOH / DM, C ₂ H ₆	549	554	-	574
3 - (Moz), Pip, C ₂ H ₆ / DM, C ₂ H ₆	552	-	572	-
3 - (Cbz), Pip, C ₂ H ₆ / (Cbz), Pip, C ₂ H ₆	-	562	-	-
Farbstoffe mit nicht indolischen Kopfgruppen:				
5 - CH, (CH) ₄ SO ₃ H / Benzoxazol	-	618	-	643
5 - CH, (CH) ₄ SO ₃ H / Benzthiazol	-	654	-	685
5 - CH, (CH) ₄ SO ₃ H / Pyridin	-	653	-	687
5 - CH, (CH) ₄ SO ₃ H / Chinolin	-	703	-	754



Bezeichnung der Farbstoffe:

n - Indol 1: (RN), R1, R2, R3 / Indol 2: (RN), R1, R2, R3

R1 = DM (Dimethyl), CH (Cyclohexyl), Pip (Piperidyl)

RN = Substituent am Piperidyl-Stickstoff

n = Anzahl der CH₂-Gruppen in der Polymethinkette

Beim Vergleich der Spektren der *spiro*-Farbstoffe mit denen der Farbstoffe ohne *spiro*-Gruppen (wie Cy5 oder Cy3) fällt auf, dass die *spiro*-Farbstoffe insgesamt längerwelligere Absorptionsmaxima besitzen, als die klassischen Cyanine ohne *spiro*-Gruppen. Hier zeigt sich, dass der sterische Anspruch der Substituenten an der 3-Position des Indols einen Einfluss auf die spektralen Eigenschaften des Fluorophors zu haben scheint, obwohl er nicht ins π -System einbezogen ist. Der Vorteil der sterischen Abschirmung der Farbstoffe vom Biomolekül und anderen Farbstoffmolekülen durch die voluminösen Gruppen geht also einher mit einer Rotverschiebung der Absorptions- und entsprechend auch der Emissionswellenlängen. Die *di-spiro*-Farbstoffe sind mit ihren Absorptionsmaxima schon relativ weit von den klassischen Lasern entfernt und können dementsprechend nicht optimal angeregt werden (z.B. Oy 656: $\lambda_{\text{abs}} = 656$ nm, roter Diodenlaser: $\lambda = 635$ nm, zum Vergleich: Cy5: $\lambda_{\text{abs}} = 647$ nm). Um dieses Problem zu lösen wurden diverse Farbstoffe synthetisiert, die nur auf einer Seite einen *spiro*-Substituenten tragen, auf der anderen Seite an der 3-Position des Indols jedoch mit zwei Methylgruppen substituiert sind. Diese Farbstoffe zeigen entsprechend kürzere Absorptionswellenlängen.

Der Zusammenhang zwischen dem sterischen Anspruch der Substituenten und der Rotverschiebung der Absorptionswellenlänge wird auch beim Vergleich der verschiedenen *spiro*-Farbstoffe untereinander deutlich. Der kleinere Cyclopentylrest führt z.B. zu nahezu keiner Rotverschiebung im Vergleich zu den Cy-Farbstoffen (Cyclopentyl: $\lambda_{\text{abs}} = 647 - 651$ nm), während der größere Cyclohexylrest zu einer merklichen Verschiebung der Absorptionswellenlänge führt (Cyclohexyl: $\lambda_{\text{abs}} = 652 - 656$ nm). Die Cyclopentylfarbstoffe sind demnach ein guter Ansatz, um für die Standardlaser besser passende Farbstoffe zu synthetisieren.

Die folgende Abbildung (Abb. 33) zeigt einen Vergleich der Absorptionsspektren von Farbstoffen mit unterschiedlich substituierten Cyaninen. Es wird deutlich, dass die Rotverschiebung des Absorptionsmaximums mit steigendem sterischen Anspruch der Substituenten an der 3-Position des Indols zunimmt.

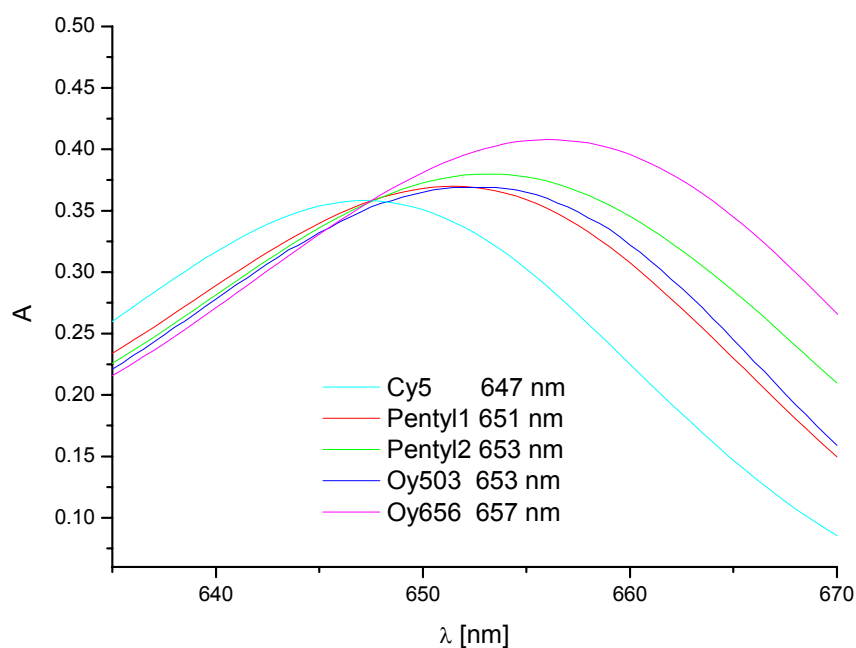


Abbildung 33: Das Absorptionsmaximum verschiebt sich in Abhängigkeit vom sterischen Anspruch der Substituenten.

Cy5: keine voluminösen Substituenten (647 nm), Pentyl1: 1 Cyclopentylrest (651 nm), Pentyl2: 2 Cyclopentylreste (653 nm), Oy503: 1 Cyclohexylrest (653 nm), Oy656: 2 Cyclohexylreste (657 nm). Alle Farbstoffe wurden in wässriger Lösung gemessen.

Auch innerhalb der Gruppe der Piperidylfarbstoffe zeigen sich die sterischen Einflüsse der Substituenten (Abb. 34). Farbstoffe, die noch die sperrige Cbz-Schutzgruppe tragen, besitzen wesentlich langwelligere Absorptionsmaxima ($\lambda_{\text{abs}} = 660 - 670 \text{ nm}$), als Farbstoffe, bei denen der Piperidylring mit Alkylgruppen substituiert ist ($\lambda_{\text{abs}} = 645 - 647 \text{ nm}$). Hier zeigt sich ein großer Vorteil der Piperidylfarbstoffe: Die Absorptionsmaxima der alkylsubstituierten Piperidylfarbstoffe sind deutlich kurzwelliger, als bei den ursprünglichen Oyster-Farbstoffen mit Cyclohexylresten. Teilweise werden sogar die Wellenlängen der Cy-Farbstoffe unterschritten, so dass diese Farbstoffklasse besser von den Standardlasern angeregt werden kann. Die Blauverschiebung im Vergleich zu den Oysterfarbstoffen hängt jedoch nicht mit dem sterischen Anspruch des Substituenten am Indol zusammen, da der substituierte Piperidylring sterisch vergleichbar mit dem Cyclohexylring sein sollte. Hier müssen noch andere Faktoren zum tragen kommen.

Um die Art des Einflusses des Substituenten an der 3-Position des Indols auf die spektralen Eigenschaften des Farbstoffes näher zu untersuchen wurden einige modellchemische Berechnungen durchgeführt (Kap 3.2.1.5).

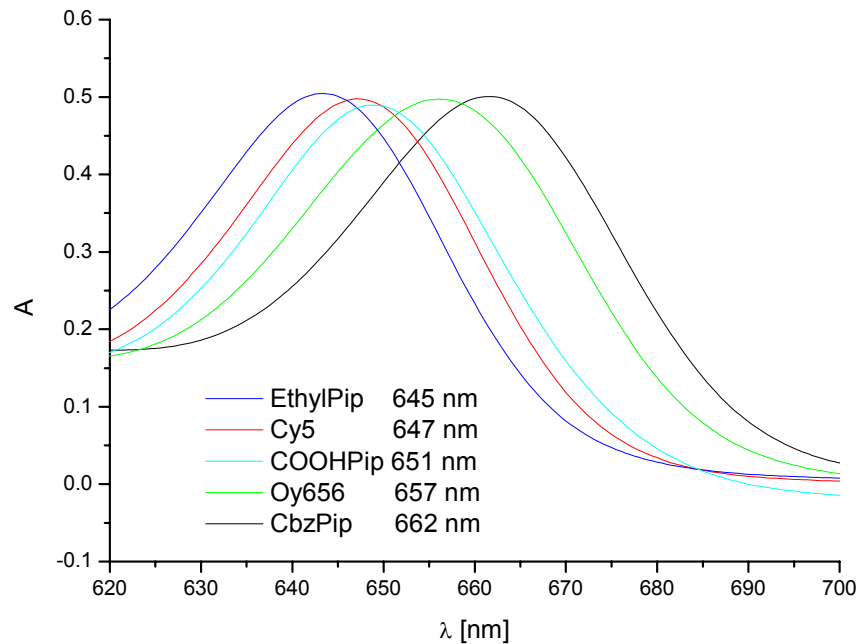


Abbildung 34: Absorptionsspektren verschiedener Piperidylfarbstoffe im Vergleich zu Cy5 (647 nm) und Oy656 (657 nm).

Die Wellenlänge hängt ab vom sterischen Anspruch der Substituenten am Piperidylamin. Ethylpip: Ethylgruppe am Piperidylamin (645 nm), COOHPip: Essigsäuregruppe am Piperidylamin (651 nm), CbzPip: Cbz-Schutzgruppe am Piperidylamin (662 nm).

Die Cyaninfarbstoffe, bei denen jeweils eine Kopfgruppe durch eine nicht indolische Struktur ausgetauscht wurde, zeigen sehr unterschiedliche Absorptionswellenlängen, von 618 nm (Benzoxazolfarbstoff) bis hin zu 703 nm (Chinolinfarbstoff) (Tab. 1). Bis auf den Chinolinfarbstoff lassen sich die nicht-indolischen Cyanine relativ gut vom roten Dioden Laser anregen. Da die resultierende Fluoreszenzintensität jedoch bei diesen Farbstoffen sehr gering ist wurden diese Strukturen nicht weiter verfolgt, zumal sie nicht die erhoffte erhöhte Basenstabilität zeigen.

In Bezug auf die zu den Standardlasern passende Absorptionswellenlänge waren die alkylsubstituierten Piperidylfarbstoffe und die Cyclopentylfarbstoffe die am besten geeigneten Strukturen.

3.2.1.3 Intrinsische Fluoreszenz

Ein weiteres Kriterium für einen guten Biomarker ist eine hohe Fluoreszenzausbeute im verwendeten Assay. In diesem Zusammenhang ist zunächst die intrinsische Fluoreszenz der Farbstoffe interessant. Für den Assay entscheidend ist aber letztendlich die Fluoreszenzausbeute des Konjugates aus Biomolekül und Farbstoff und das Verhalten des Konjugates im Bioassay. Je nach Anwendung können unterschiedliche Farbstoffe besser oder schlechter für eine bestimmte Anwendung geeignet sein, da nicht nur die Fluoreszenz,

sondern auch Eigenschaften wie Wasserlöslichkeit, Kopplungseffizienz mit dem Biomolekül und ähnliche Faktoren eine Rolle spielen.

Der Einfluß des sterischen Anspruchs der Substituenten an der 3-Position der Indole spiegelt sich nicht nur in der Lage der Absorptions- und Emissionsmaxima wieder, sondern auch in der Fluoreszenzausbeute der Farbstoffe. Auch bei Anregung mit der jeweils optimalen Anregungswellenlänge zeigen Farbstoffe mit mehr sterisch anspruchsvollen *spiro*-Gruppen geringere Fluoreszenzintensitäten (Abb 35). Beispielsweise wurden drei bis auf die Substituenten in 3-Position der Indole identische Farbstoffe mit keiner (Cy5), einer (Oy503) oder zwei (Oy656) *spiro*-Cyclohexylgruppen vergleichend gemessen. Der Farbstoff Cy5, der keine *spiro*-Gruppen trägt, zeigt die höchste Fluoreszenzintensität. Oy503 mit nur einer *spiro*-Cyclohexylgruppe und Oy656 mit zwei *spiro*-Cyclohexylgruppen zeigen nur 84 bzw. 78 % der Fluoreszenzintensität von Cy5. Alle Spektren wurden in PBS-Puffer gemessen, die Anregung erfolgte jeweils 20 nm kurzwelliger als das Absorptionsmaximum des entsprechenden Farbstoffes liegt. Um annähernd gleich konzentrierte Lösungen vorliegen zu haben, wurden die Farbstofflösungen vor der Fluoreszenzmessung auf dieselbe Absorption (z.B. $A = 0.1$) eingestellt. Da jedoch auch der Extinktionskoeffizient nach LAMBERT-BEER in die Konzentration eingeht, ist dieses Verfahren prinzipiell mit einem Fehler behaftet, da die Extinktionskoeffizienten der verschiedenen Farbstoffe zwar vermutlich ähnlich, aber nicht gleich sind. Zur Abschätzung der Fluoreszenzeigenschaften ist das Verfahren aber durchaus geeignet.

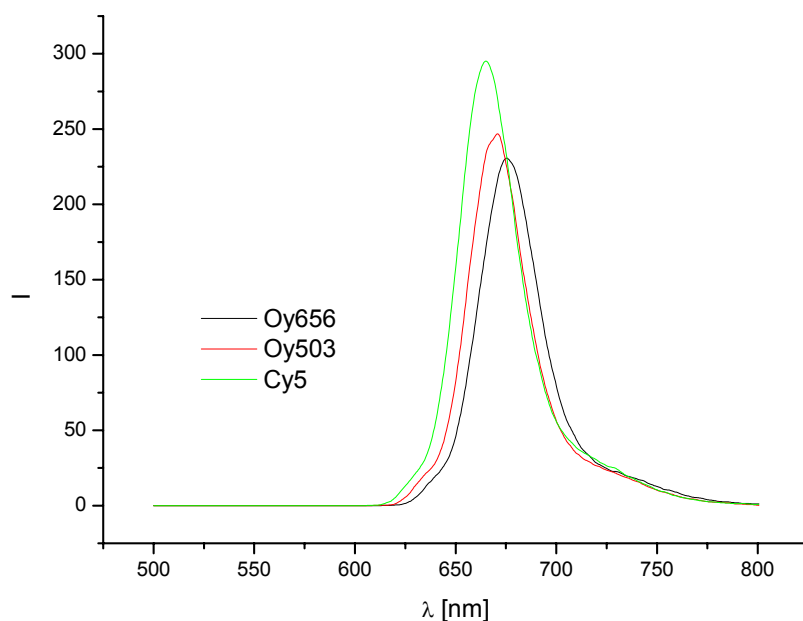


Abbildung 35: Zusammenhang zwischen Zahl der *spiro*-Substituenten und der resultierenden Fluoreszenzintensität.

Neben der Absorptionswellenlänge wird also auch die resultierende Fluoreszenzausbeute des Farbstoffes durch den sterischen Anspruch des Substituenten in 3-Position des Indols beeinflusst. Es wurden daher im wesentlichen Farbstoffe mit nur einem *spiro*-Substituenten synthetisiert, die kurzwelligere Anregungsmaxima und höhere Fluoreszenzausbeuten zeigen.

Die Cyclopentylfarbstoffe mit ihren sterisch weniger anspruchsvollen *spiro*-Cyclopentylgruppen zeigen wie erwartet auch höhere Fluoreszenzintensitäten als die *spiro*-Cyclohexylfarbstoffe. Die folgende Abbildung (Abb. 36) zeigt einen Vergleich zweier Cyclopentylfarbstoffe mit jeweils einer (Pen1) bzw. zwei (Pen2) *spiro*-Cyclopentylgruppen mit Oy656. Die Cyclopentylfarbstoffe zeigen eindeutig höhere Fluoreszenzintensitäten als der Cyclohexylfarbstoff. Hier zeigte sich ebenfalls, dass sterisch weniger anspruchsvolle Gruppen nicht nur eine Blauverschiebung der Absorptionsbande sondern auch eine damit einhergehende Erhöhung der Fluoreszenz bewirken. Die Cyclopentylfarbstoffe sind demnach ein guter Ansatz zur Synthese von *spiro*-Cyaninen mit guten Fluoreszenzeigenschaften.

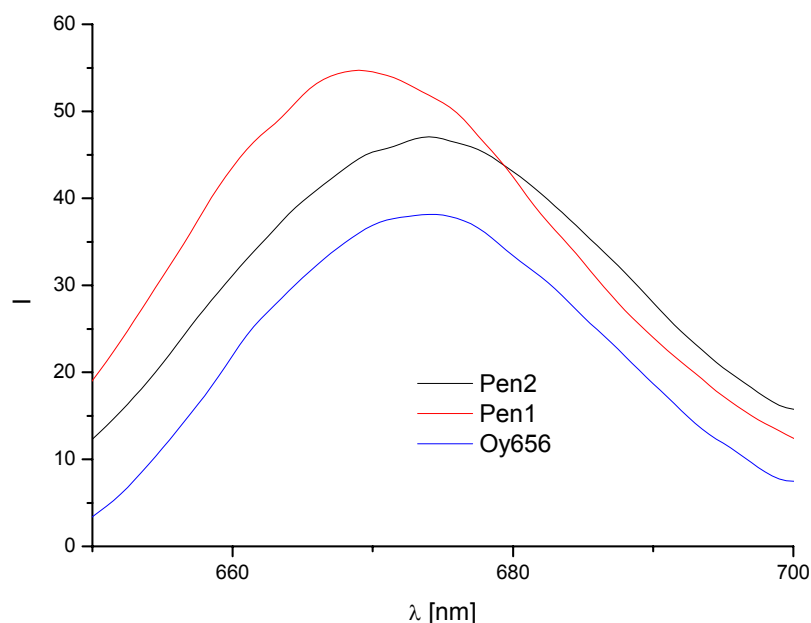


Abbildung 36: Fluoreszenzintensität zweier Pentylfarbstoffe und Oy656 im Vergleich.

Pen2: Zwei Cyclopentylsubstituenten, *Pen1*: Ein Cyclopentylsubstituent, *Oy656*: Zwei Cyclohexylsubstituenten. Alle Spektren wurden in Wasser gemessen, die Lösungen wurden vor der Messung auf die gleiche Absorption eingestellt. Die Anregung erfolgte jeweils 20 nm kurzwelliger als das Absorptionsmaximum des Farbstoffes liegt.

Die Piperidylfarbstoffe zeigen, je nach Substituent am Piperidylring, sehr unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaften. Zunächst wurden die Cbz-geschützten Piperidylfarbstoffe untersucht. Diese Farbstoffe zeigen in der Regel geringere Fluoreszenzintensitäten, als die Cyclohexylfarbstoffe. Dies steht im Einklang mit der Erfahrung, dass größere sterische

Hinderung zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität des Farbstoffes führt. Ein Vergleich von Cy5 (keine *spiro*-Gruppen), Oy656 (zwei *spiro*-Cyclohexylgruppen) und CbzPip (zwei *spiro*-Piperidylgruppen, Cbz-geschützt) findet sich in Abbildung 37. Der Piperidylfarbstoff fluoresziert etwa 10 % schlechter als der Oy656-Farbstoff und 30 % schlechter als Cy5.

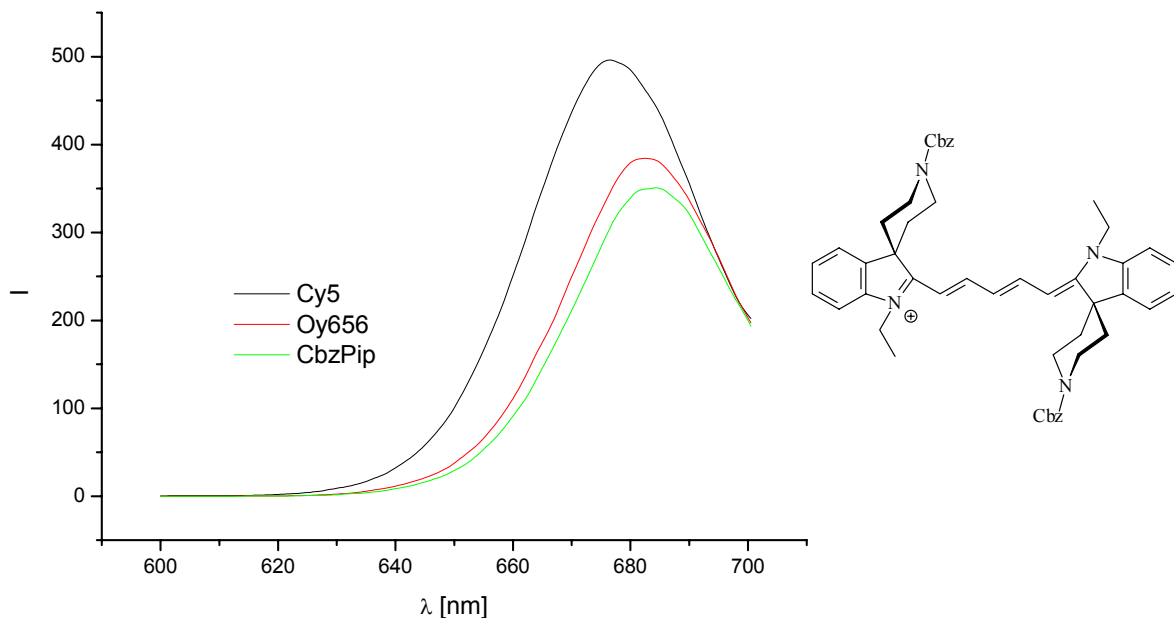


Abbildung 37: Vergleich der Fluoreszenzintensität eines Cbz-geschützten Piperidylfarbstoffes mit Cy5 und Oy656.

Die Spektren wurden in Ethanol gemessen, die Lösungen wurden vor der Messung auf die selbe Absorption eingestellt. Die Anregungswellenlänge betrug jeweils 20 nm weniger als das Absorptionsmaximum des Farbstoffes. Die Struktur des Piperidylfarbstoffes ist nebenstehend abgebildet.

Mit einem Ethyl-substituierten Piperidylfarbstoff wurden hingegen recht gute Ergebnisse erhalten. Dieser Farbstoff zeichnet sich auch schon durch sehr kurzwellige Absorptions- und Emissionsmaxima aus (643 nm / 661 nm), die sogar kurzwelliger sind, als bei Cy5. Für diesen Farbstoff wurde trotz des Vorhandenseins einer *spiro*-Gruppe im Farbstoffmolekül eine nur noch 15 % geringere Fluoreszenzintensität im Vergleich zu Cy5 gefunden (Abb. 38), womit dieser Farbstoff besser fluoresziert als Oy656, der in der Regel eine ca. 25 % geringere Fluoreszenz als Cy5 zeigt.

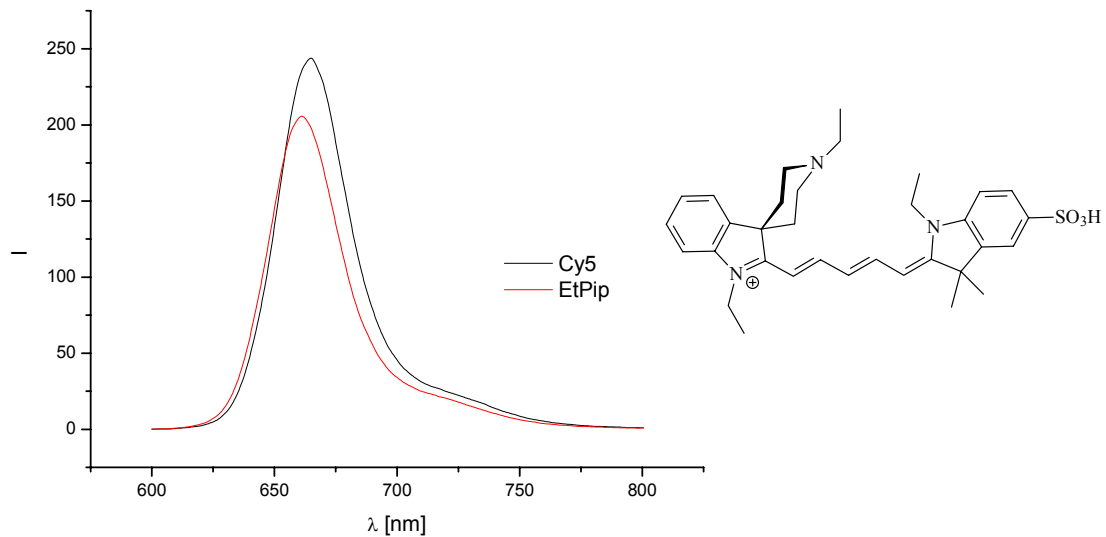


Abbildung 38: Fluoreszenzintensität eines Ethyl-substituierten Piperidylfarbstoffes.

Die Spektren wurden in Wasser gemessen, die Lösungen wurden vor der Messung auf dieselbe Absorption eingestellt. Die Anregungswellenlänge betrug 20 nm weniger als das Absorptionsmaximum des Farbstoffes. Die Struktur des Piperidylfarbstoffes ist nebenstehend abgebildet.

Auf Grund dieser Beobachtung wurden im Folgenden kopplungsfähige Derivate dieser Grundstruktur synthetisiert, die über eine Carboxyfunktion verfügen. Die kopplungsfähigen Alkyl-Piperidylfarbstoffe zeigen überraschender Weise jedoch eine geringere intrinsische Fluoreszenz. Die Fluoreszenz eines unsymmetrischen, am Amin funktionalisierten Piperidylfarbstoffes ist im Folgenden im Vergleich mit Oy656 dargestellt (Abb. 39). Es zeigt sich, dass der Piperidylfarbstoff eine etwa 30 % geringere Fluoreszenzintensität besitzt, als Oy656 und damit weit unterhalb der Fluoreszenzintensität von Cv5 liegt.

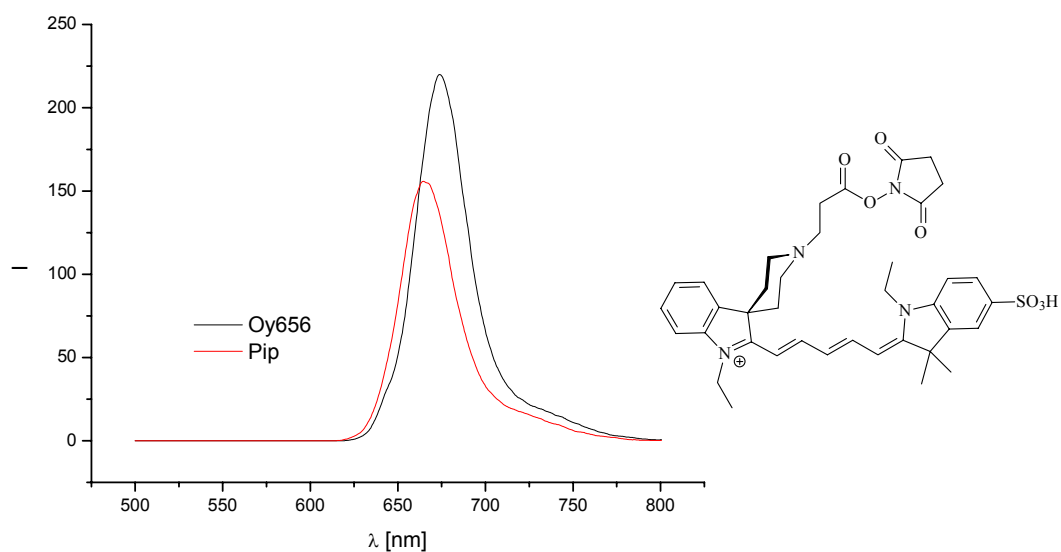


Abbildung 39: Fluoreszenzintensität eines Piperidylfarbstoffes und Oy656 im Vergleich.

Die nebenstehende Strukturformel zeigt, um welchen Piperidylfarbstoff es sich handelt. Die Spektren wurden in Wasser gemessen, die Absorption der Farbstofflösungen wurde zuvor auf die gleiche Absorption eingestellt. Die Anregung erfolgte bei 635 nm.

Die Synthese der verschiedenen Cyanin-Farbstoffe machte wiederholt deutlich, dass die Fluoreszenzeigenschaften der Farbstoffe sehr schwer vorherzusagen sind. Das Verändern verschiedenener Substituenten führte oft zu unerwarteten Ergebnissen.

3.2.1.4 Solvatochromie

Die Polarität der Umgebung des Fluoreszenzfarbstoffes hat einen großen Einfluss auf die Lage des Absorptionsmaximums, daher zeigen die Cyanine eine deutliche Solvatochromie. Das Interessante bei den synthetisierten Cyaninen war, dass sie eine so genannte negative Solvatochromie aufwiesen. Die Absorptionsmaxima wurden also bei sinkender Polarität des Lösungsmittels bathochrom verschoben. Bei den meisten andern bekannten Fluorophoren ist das Gegenteil der Fall. Die Absorptionswellenlänge eines Piperidylfarbstoffes (2 Piperidylgruppen, jeweils Cbz-substituiert) sinkt beispielsweise in Abhängigkeit von der Polarität des Lösungsmittels in der folgenden Reihenfolge:

Dichlormethan (670 nm) > Tetrahydrofuran (664 nm) > Ethylacetat (663 nm) > Isopropanol (662 nm) = Ethanol (662 nm) > Methanol (657 nm)

3.2.1.5 Modellchemische Berechnungen

Es wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Stefan Grimme (Institut für Organische Chemie, WWU Münster) einige modellchemische Berechnungen der Farbstoffmoleküle Cy5 und Oy656 durchgeführt, um Aufschlüsse über den Einfluss des *spiro*-Substituenten auf die Eigenschaften der Farbstoffe zu erhalten. Die Geometrien der Moleküle wurden mit dem MMX-Kraftfeld optimiert, wobei sich das π -System planar zeigte. Die vertikalen Anregungsenergien wurden mit der TDPMP-Methode berechnet, dabei wurden nur die π -Elektronen berücksichtigt. Für Oy656 ergab sich eine Anregungsenergie von 2.32 eV, für Cy5 wurden 2.34 eV berechnet. Der Unterschied von 0.02 eV entspricht exakt der Verschiebung der Absorptionsspektren der beiden Farbstoffe von 649 nach 657 nm.

Die beobachtete Verschiebung der Anregungswellenlänge bei Einführung der *spiro*-Cyclohexylgruppen ist nicht auf eine Verdrillung des Chromophores zurück zu führen, sondern kann durch leicht geänderte C-C-Bindungslängen im Polyenteil erklärt werden, die auf verschiedenen sterischen Ansprüchen der Dimethyl- und *spiro*-Cyclohexylsubstituenten beruhen.

3.2.2 Kopplung von Fluorophoren an Amino-modifizierte DNA

DNA-Farbstoff-Konjugate wurden durch die Markierung der DNA mit den gewünschten Fluorophoren mittels Amino-Modifizierung der DNA und anschließender Reaktion mit den Farbstoffen hergestellt und anschließend charakterisiert.

Die Amino-Modifikation der DNA wurde mit einer PCR erreicht. Während der Amplifikation wurde im dNTP-Mix 50 % des dTTP gegen Aminoallyl-dUTP ausgetauscht, welches von der Taq-Polymerase in das PCR-Produkt eingebaut wurde. Dabei wurde DNA mit einer statistisch verteilten Anzahl reaktiver Aminogruppen erhalten, an die nach Aufreinigung mittels Säulentechnik die gewünschten Farbstoffe gekoppelt werden konnten. Die Farbstoffe lagen zunächst als Carbonsäurederivate vor und wurden zum NHS-Ester aktiviert (z.B. mit N-Hydroxysuccinimid (NHS) und Dicyclohexylcarbodiimid (DCC)). Die aktivierte Säuregruppe des Farbstoffes konnte dann in wässriger Hydrogencarbonat-Lösung bei Raumtemperatur mit der Aminofunktion der DNA reagieren. Überschüssiger Farbstoff wurde erneut mittels Säulentechnik abgetrennt, so dass die markierte DNA in wässriger Lösung erhalten wurde. Die Konzentration des Farbstoffes und der DNA in Lösung und der daraus berechnete Markierungsgrad, das Verhältnis von Farbstoffkonzentration zu DNA-Konzentration, wurden mittels Absorptionsspektroskopie nach LAMBERT BEER ermittelt (Abb. 41).

Bei den Kopplungen wurde einer der neu synthetisierten Piperidylfarbstoffe, der großes Potential als Biomarker versprach (Abb. 40), im folgenden Pip genannt, im Vergleich zu Oy656 und Cy5 getestet. Dieser Farbstoff unterscheidet sich im Wesentlichen durch die Kopplungsposition von Cy5 und Oy656. Die Kopplung an die DNA erfolgt hier nicht über die 1-Position, sondern über die 3-Position des Indols. Die Aminofunktion im Piperidylring wurde über einen kurzen Linker mit einer Carbonsäuregruppe derivatisiert, die nach Aktivierung zum NHS-Ester mit der Amino-modifizierten DNA reagieren kann.

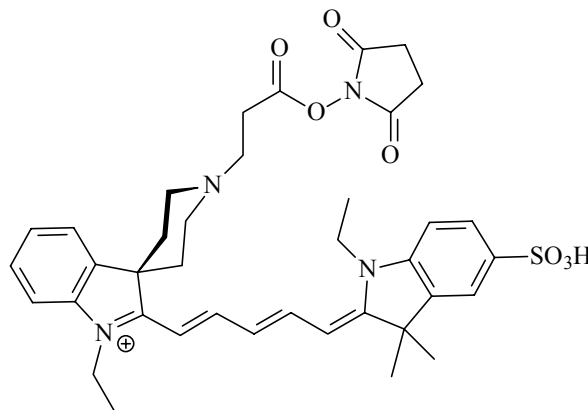


Abbildung 40: NHS-aktivierter Piperidylfarbstoff (Pip) für die Markierung von DNA.

Die folgende Tabelle zeigt typische Ergebnisse der Markierungen:

Tabelle 2: Typischer Markierungsgrad mit verschiedenen Farbstoffen.

Farbstoff	DNA-Konzentration	Farbstoffkonzentration	Labelgrad (LG)
Cy5	25 – 68 nM	390 – 790 nM	11.7 – 15.4
Oy656	44 – 51 nM	58 – 134 nM	1.3 – 2.4
Pip	60 – 72 nM	116 – 233 nM	2.0 – 3.2

$n = 3$ bis 5 Markierungen je Farbstoff. Zur Berechnung der Farbstoff-Konzentration wurde $\varepsilon = 250000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ verwendet.

Es wird deutlich, dass die mit den *spiro*-Farbstoffen erreichten Markierungsgrade deutlich schlechter sind, als mit Cy5. Allerdings zeigte sich, dass der Piperidylfarbstoff geringfügig bessere Markierungsgrade aufweist, als Oy656. Versuche zur Optimierung der Kopplungsbedingungen (Erhöhung der Reaktionszeit von 1 h auf bis zu 12 h und Erhöhung der Reaktionstemperatur von Raumtemperatur auf bis zu 35 °C) lieferten keine wesentlich besseren Ergebnisse. Offensichtlich sind die *spiro*-Farbstoffe gegenüber der Amino-DNA weniger reaktiv als Cy5. Sterische Hinderung könnte ein Grund für die schlechtere Kopplungseffizienz der *spiro*-Farbstoffe sein.

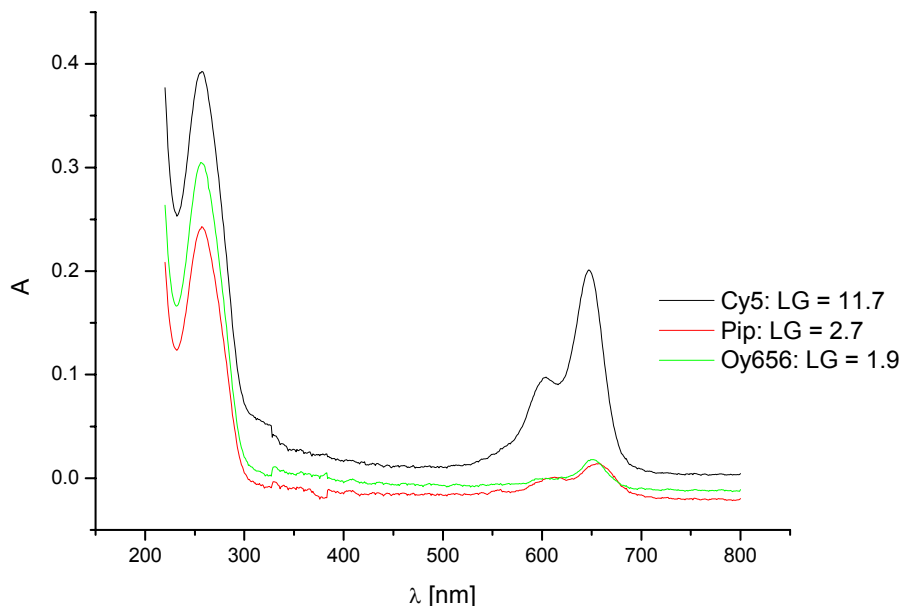


Abbildung 41: Absorptionsspektren verschiedener DNA-Farbstoffkonjugate.

3.2.3 Eigenschaften der DNA-Farbstoff-Konjugate

3.2.3.1 Eigenschaften der DNA-Farbstoff-Konjugate in Lösung

Als wichtiger Parameter wurde im Folgenden die Fluoreszenz der Konjugate mit der Fluoreszenz der freien Farbstoffe verglichen. Dazu wurden wässrige Lösungen der Farbstoffe und der Konjugate hergestellt und auf dieselbe Absorption eingestellt, um die Unterschiede in den Markierungsgraden auszugleichen. Die Lösungen sollten nun annähernd gleiche Farbstoffkonzentrationen besitzen. Da aber auch die Absorptionskoeffizienten, die bei den verschiedenen Farbstoffen vermutlich zwar ähnlich, nicht jedoch völlig gleich sind, über das LAMBERT BEERSCHE - Gesetz mit der Konzentration zusammenhängen, ist diese Art der Messung natürlich immer mit einem gewissen Fehler behaftet. Um die generellen Tendenzen abschätzen zu können ist dieses Verfahren jedoch gut geeignet.

Die Fluoreszenzspektren der Konjugate zeigen sämtlich eine bathochrome Verschiebung der Emissionsmaxima um knapp 2 nm im Vergleich zu den freien Farbstoffen. Diese typische Verschiebung kommt durch Wechselwirkungen zwischen DNA und Farbstoffmolekülen zustande. Abbildung 42 zeigt den Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der freien Farbstoffe in Lösung und der DNA-Konjugate.

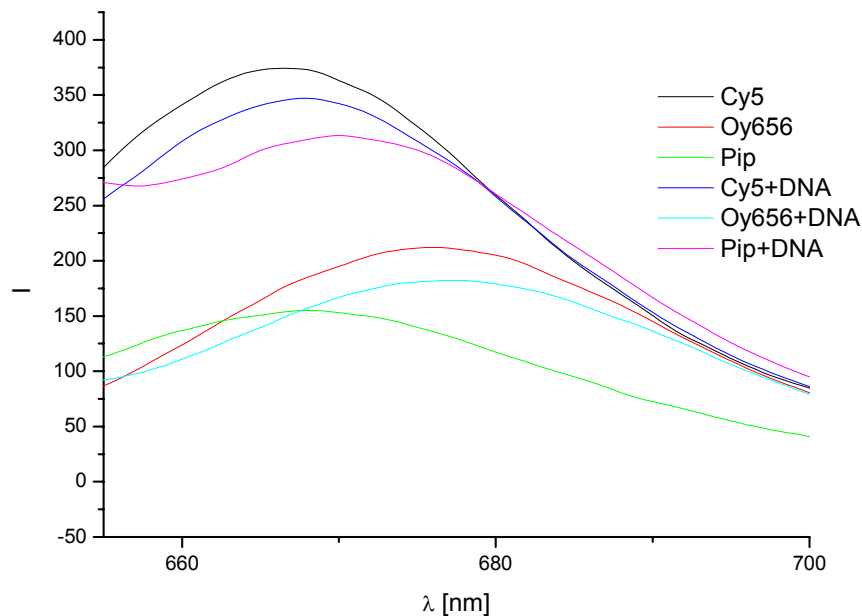


Abbildung 42: Fluoreszenzspektren der freien Farbstoffe und der DNA-Konjugate im Vergleich.

Es zeigte sich ein unerwartetes Ergebnis. Während die Lösungen der freien Farbstoffe und der Konjugate bei den Farbstoffen Cy5 und Oy656 jeweils im Rahmen der Messgenauigkeit vergleichbar große Fluoreszenzintensitäten zeigten, trat bei dem Piperidylfarbstoff eine starke Erhöhung der Fluoreszenz bei Kopplung an DNA auf. Das DNA-Farbstoff-Konjugat des Piperidylfarbstoffes fluoreszierte annähernd so gut, wie das von Cy5 und wesentlich besser als das von Oy656, obwohl der freie Pip-Farbstoff eine deutlich geringere Fluoreszenzintensität aufwies. Die Fluoreszenz des Piperidylfarbstoffes stieg nach Kopplung an DNA in der Regel um etwa 40 - 50 % an. Bei den anderen beiden Farbstoffen war im Rahmen der Messgenauigkeit kein nennenswerter Unterschied in der Fluoreszenzintensität zwischen freiem Farbstoff und Konjugat festzustellen (Abb. 43).

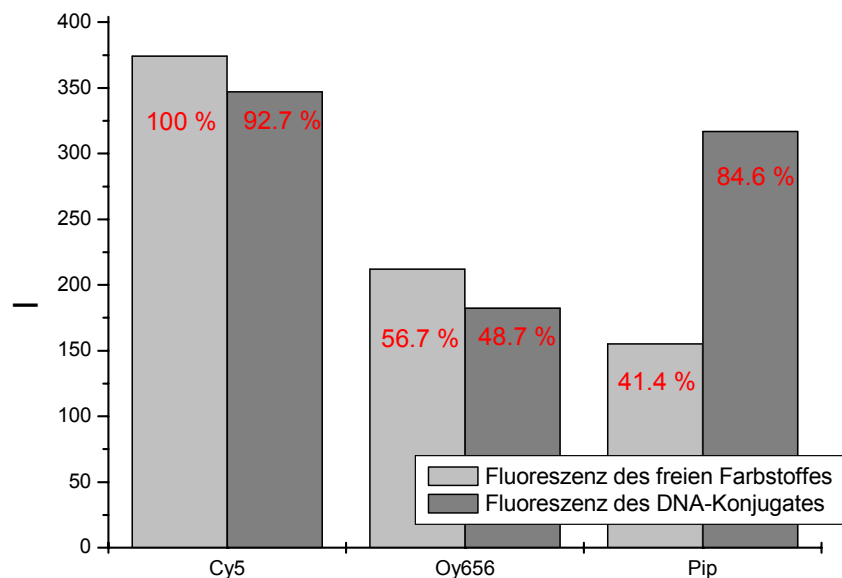


Abbildung 43: Fluoreszenzintensität der freien Farbstoffe und der Konjugate im Vergleich ($n = 1$).

3.2.3.2 Festphasenfluoreszenz der DNA-Farbstoff-Konjugate

Für viele bioanalytische Methoden ist neben der Fluoreszenz in Lösung auch die Festphasenfluoreszenz der Konjugate von Bedeutung, z.B. bei Chip-Experimenten. Daher wurde im Folgenden die Festphasenfluoreszenz der freien Farbstoffe und der DNA-Konjugate vergleichend betrachtet. Dazu wurden erneut Lösungen mit gleicher Absorption hergestellt und mittels eines Dispensers (Gesim) auf gereinigte, fluoreszenzarme Objektträger in Form eines Arrays mit hoher Redundanz gespottet. Die Objektträger wurden über Nacht zum Trocknen stehen gelassen und am folgenden Tag mit einem Arrayscanner direkt ausgelesen. Aus den Bildern ließ sich mit Hilfe einer speziellen Software (vergl. Kap. 6.5.3) die Fluoreszenzintensität der verschiedenen Spots ermitteln. Abbildung 44 zeigt ein typisches Bild des Arrayscanners und das Dispensiermuster der Chips.

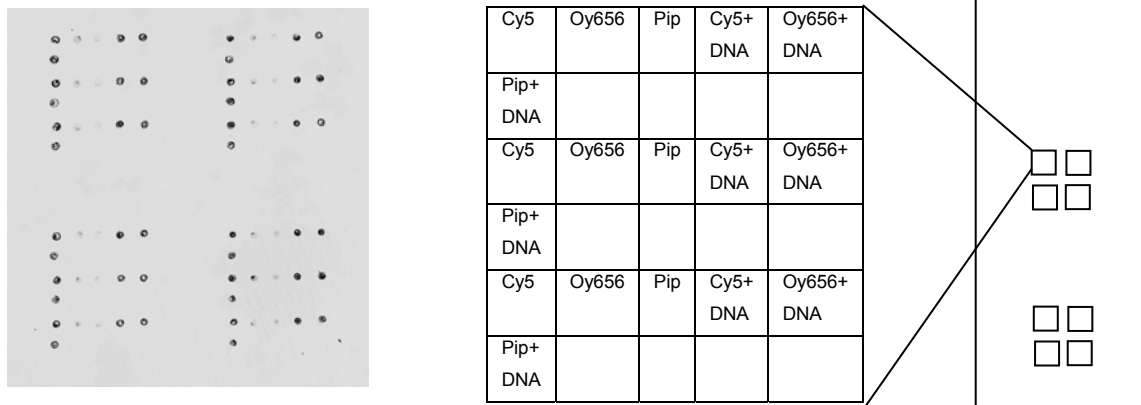


Abbildung 44: Messung der Festphasenfluoreszenz der freien Farbstoffe und der Konjugate im Vergleich nach Spotten auf Objektträger.

Links: Typisches Bild, wie es mit dem Arrayscanner erhalten wurde. Rechts: Dispensiermuster und Belegung innerhalb eines Arrays. Auf jedem Objektträger wurden zwei Meta-Arrays bestehend aus vier einzelnen Arrays aufgebracht, in denen jede Lösung dreimal aufgebracht wurde.

Es wurden insgesamt drei Chips mit jeweils 2 Meta-Arrays ausgewertet. Die Fluoreszenzintensitäten an den jeweils 72 Spots pro Farbstoff- bzw. DNA-Konjugatlösung wurden berechnet und verglichen (Abb. 45).

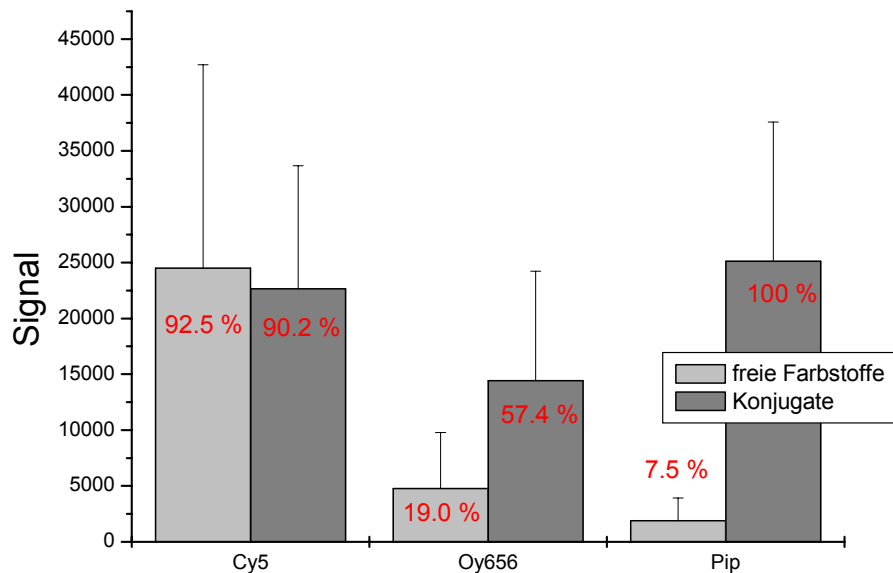


Abbildung 45: Festphasenfluoreszenz der freien Farbstoffe und der DNA-Konjugate im Vergleich.

Es zeigt sich erneut, dass der Piperidylfarbstoff in freier Form eher schlecht fluoresziert. Als DNA-Konjugat weist Pip jedoch wiederum einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenz von ca. 80 – 90 % im Vergleich zum freien Farbstoff auf, so dass das Pip-Konjugat vergleichbar gut fluoresziert, wie das Cy5-Konjugat und deutlich besser (ca. 40 %) als das Oy656-Konjugat.

Bei Cy5 ist erneut kein nennenswerter Unterschied zwischen dem freien Farbstoff und dem Konjugat hinsichtlich der Fluoreszenzintensität festzustellen. Der Oy656-Farbstoff zeigt hier jedoch ebenfalls einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenz bei Kopplung an DNA.

Die relativ großen Fehlerbalken im Diagramm werden dadurch hervorgerufen, dass verschiedene Objektträger miteinander verglichen wurden. Hier kann es zu größeren Unterschieden in der detektierten Fluoreszenz kommen. Da jedoch insgesamt sehr viele Spots pro Lösung untersucht wurden (je 72), sollten die Ergebnisse die Tendenzen im Fluoreszenzverhalten richtig widerspiegeln. Auch bei dieser Messung ist weiterhin zu berücksichtigen, dass ein gewisser Fehler dadurch entsteht, dass die Extinktionskoeffizienten der verschiedenen Farbstoffe und Konjugate vermutlich nur ähnlich, nicht aber genau gleich sind, so dass die Konzentrationen etwas schwanken können.

Es bleibt zusammenfassend festzuhalten, dass der Piperidylfarbstoff in Lösung zwar eine geringe intrinsische Fluoreszenz zeigt, die bei Kopplung des Farbstoffes an DNA jedoch um etwa 50 % ansteigt. Für Oy656 und Cy5 konnte kein Fluoreszenzanstieg nach Kopplung an DNA für Konjugate in Lösung festgestellt werden. Die Festphasenfluoreszenz des Pip-Konjugates ist im Gegensatz zum freien Farbstoff noch sehr viel besser, da hier ein bis zu 90 %iger Anstieg der Fluoreszenz des Farbstoffes nach Kopplung an DNA erfolgt. Auch für Oy656 lässt sich ein Anstieg der Fluoreszenz des Konjugates im Vergleich zum freien Farbstoff bei Betrachtung der Festphasenfluoreszenz feststellen. Die *spiro*-Farbstoffe, insbesondere der Pip-Farbstoff, sind daher sehr gut geeignet für Techniken, in denen die Fluoreszenz in fester Phase gemessen wird, wie z.B. bei konventionellen DNA-Chips. Durch seine besseren Fluoreszenzeigenschaften und höheren Fluoreszenzausbeuten ist Pip dem Oy656 jedoch deutlich überlegen.

3.3 Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifikation und Markierung von DNA

Unterschiedliche tierische DNA-Extrakte, die entweder aus den laufenden Untersuchungen des Chemischen und Veterinär Landesuntersuchungsamt (CVUA) oder aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Münster stammten, wurden sowohl im DNA-Biosensor, als auch auf konventionellen DNA-Chips gemessen. Dazu wurde zunächst die mitochondriale Cytochrom B - DNA mittels einer Konsensus-PCR amplifiziert.

Bei dieser Art der PCR werden Primer verwendet, die an Regionen des CytB-Gens anbinden, die innerhalb der interessierenden Spezies relativ konserviert sind. Die dazwischen liegenden, bei den verschiedenen Spezies sehr variablen Regionen, werden amplifiziert. So kann mit Hilfe eines einzigen Primerpaars eine Vielzahl von Spezies parallel amplifiziert werden, wobei für jede Spezies ein charakteristisches PCR-Produkt erhalten wird. Da auf Grund der hohen Homologie der CytB-Gensequenzen keine Insertionen oder Deletionen auftraten, waren die erhaltenen PCR-Produkte alle gleich lang. Hier wurden die Primer CytB403 (*sense*) und Cy5CytB779 (*antisense*) verwendet, deren 5'-Enden an den Positionen 403 und 779 des CytB-Gens anbinden (Sequenzen siehe Anhang). Das resultierende PCR-Produkt besteht demnach aus 376 Basenpaaren. Der *antisense*-Primer war zusätzlich mit dem Farbstoff Cy5 markiert. So erfolgte während der PCR gleichzeitig die Markierung mit dem Fluorophor, wobei jedes DNA-Molekül genau mit einem Farbstoffmolekül markiert wurde. Der Markierungsgrad der PCR-Produkte betrug demnach in der Regel eins, was an Hand absorptionsspektroskopischer Untersuchungen einiger gereinigter PCR-Produkte überprüft wurde.

Folgende Spezies wurden als Referenzen vom CVUA bzw. dem Institut für Rechtsmedizin erhalten und der oben beschriebenen PCR unterworfen:

- Nutztiere: Rind, Schwein, Pferd, Ziege, Schaf, Huhn, Pute, Gans, Hauskaninchen, Büffel
- Wildtiere: Reh, Damhirsch, Rothirsch, Sikahirsch, Wildschwein, Wildkaninchen, Hase, Wildente, Springbock, Sitatunga-Antilope, Riesenkänguruh
- Weitere: Mensch, Hund

Die Referenzproben des CVUA waren in der Regel aus Muskelfleisch der betreffenden Spezies gewonnen und lagen in einem sehr hohen Reinheitsgrad vor. Die Referenz-DNA der Rechtsmedizin wurde aus Haar-, Blut- oder Speichelproben extrahiert und lag teilweise noch

stark verunreinigt durch Beimengungen anderer Zellbestandteile wie z.B. Hämoglobin bei Blutproben vor.

Neben diesen Referenz-DNA-Proben wurden aus beiden Instituten auch Realproben erhalten. Beim CVUA handelte es sich um DNA-Extrakte aus Fleisch- und Käseprodukten, aus dem Institut für Rechtsmedizin wurden DNA-Spuren verschiedener forensischer Ermittlungen erhalten. Die Realproben bestanden häufig aus Gemischen von DNA verschiedener Spezies. In Kapitel 6.1.3 finden sich Tabellen mit weiteren Informationen zu den Referenz- und Realproben.

Die PCR wurde standardmäßig mit 35 Zyklen bei einer Annealingtemperatur von 60 °C durchgeführt. Die meisten der Referenz- und Realproben ließen sich unter diesen Bedingungen gut amplifizieren. Die folgende Abbildung zeigt exemplarisch das Ergebnis einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) der PCR-Produkte verschiedener Referenz-DNA-Extrakte (Abb. 46). Es ist gut zu sehen, dass die PCR-Produkte alle die gleiche, erwartete Länge besitzen.

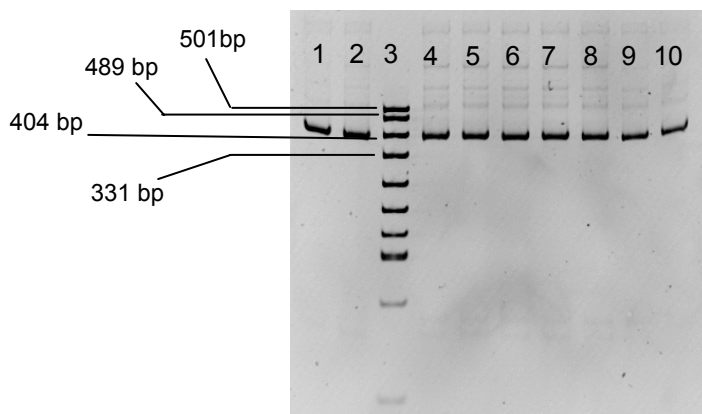


Abbildung 46: Gelelektrophorese der PCR-Produkte verschiedener DNA-Extrakte.

Probenverteilung auf den einzelnen Bahnen: 1: R-10, 2: R-11, 3: pUC-DNA-Marker, 4: R-9, 5: R-8, 6: R-2, 7: R-4, 8: R-5, 9: R-6, 10: R-1, Zur Bezeichnung der Proben vergl. Tabellen in Kap. 6.1.3.

Menschliche DNA ließ sich unter diesen Bedingungen jedoch nur relativ schwach amplifizieren, auch Ziegen-DNA lieferte gelegentlich nur sehr wenig PCR-Produkt. Springbock, Sitatunga-Antilope und Riesenmärmurh waren mit diesen Konsensus-Primern nicht zu amplifizieren. Schlechte bzw. keine Amplifikation der Proben-DNA bei diesen Spezies sind auf Fehlpaarungen der Primer mit der Template-DNA zurückzuführen. Nicht alle Spezies können mit den Konsensusprimern gleich gut amplifiziert werden.

Versuche, bei denen verschiedene andere Annealingtemperaturen sukzessive von 57 bis 68 °C getestet wurden zeigten, dass noch bis zu einer Temperatur von 64 °C PCR-Produkt

erhalten wurde, bei noch höheren Temperaturen konnte nicht mehr amplifiziert werden. Es ist allerdings nicht ratsam mit der Annealingtemperatur ganz bis an die oberste Grenze der Stringenz zu gehen, da dann Template-DNA von Spezies, die eventuell Fehlpaarungen mit einem der Primer zeigt, nicht mehr ausreichend mit amplifiziert wird. Gelegentlich, wenn geringe Spuren bestimmter Spezies detektiert werden sollten, wurde die PCR daher noch weniger spezifisch bei 57 °C mit 45 Zyklen durchgeführt. Ein Beispiel hier für ist die Detektion von geringen Spuren von Ziegen-DNA in Käseproben. Bei weniger stringenten PCR-Bedingungen konnten diese Spuren teilweise noch erfasst werden, bei 60 °C waren sie oft nicht messbar.

Weiterhin ist bei der PCR und der anschließenden Analyse zu berücksichtigen, dass die Zusammensetzung der Proben vor und nach der Amplifikation nicht mehr dieselbe sein muss. DNA-Bestandteile der Probe, die als Hauptbestandteile vorliegen, erreichen bei der Amplifikation eher die Plateau-Phase der PCR, während die Amplifikation von DNA-Spuren in der Probe dann noch längere Zeit weitergehen kann. Dies führt dazu, dass DNA-Spuren in einer Probe unter Umständen überproportional amplifiziert werden und sich die Zusammensetzung der Probe damit durch die PCR ändert. Es zeigt sich aber auch der Vorteil, dass so noch sehr geringe DNA-Spuren in den anschließenden Messverfahren detektiert werden konnten. Messverfahren, die sich an eine PCR anschließen können daher prinzipiell immer nur semiquantitative Ergebnisse liefern.

Zu den Proben der Rechtsmedizin wurde standardmässig während der PCR zusätzlich BSA zugegeben, da diese teilweise so stark verunreinigt waren, dass die PCR inhibiert war. Das folgende PAGE-Gel zeigt die Aufhebung der Inhibition der PCR einer Blutspur durch Zugabe von BSA (Abb. 47):

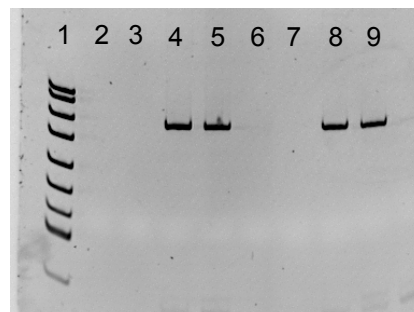


Abbildung 47: PAGE-Gel der PCR einer Blutspur des Instituts für Rechtsmedizin mit und ohne Zugabe von BSA.

Probenverteilung auf den einzelnen Bahnen: 1: pUC-DNA-Marker, 2,3: PCR ohne Zusatz von BSA, 4,5: PCR mit Zusatz von BSA, jeweils 60 °C, 35 Zyklen, 6,7: PCR ohne Zusatz von BSA, 8,9: PCR mit Zusatz von BSA, jeweils 57 °C, 45 Zyklen.

3.4 Tierartendifferenzierung mittels Realzeithybridisierung im DNA-Biosensor

Die neuen Farbstoffe sollten unter anderem für den Einsatz im DNA-Biosensor des ICB getestet werden. Hierfür wurde zunächst ein biologisches Modellsystem entwickelt. Dabei wurde an die von PETER begonnene Tierartendifferenzierung mittels DNA-Biosensor angeknüpft [135]. Im Folgenden werden die in dieser Arbeit erfolgten Weiterentwicklungen der Methode, sowie Anwendungen in der Lebensmittelanalytik und Forensik beschrieben.

3.4.1 Charakteristische Eigenschaften des DNA-Biosensors

Auf der Basis der Tierartendifferenzierung wurden zunächst einige charakteristische Daten des DNA-Biosensors bestimmt. Dazu standen für die Spezies Huhn und Rind genau komplementäre, fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide (vergl. Anhang), die so genannten Targets zur Verfügung. In Kalibrationen konnten charakteristische Daten wie Nachweisgrenze und Sensitivität bestimmt werden. Weiterhin wurden die Reproduzierbarkeit bei Mehrfachmessungen und die Vergleichbarkeit von Messwerten an verschiedenen Spots an unterschiedlichen Positionen im Array betrachtet. Mit genomischer Referenz-DNA konnte gezeigt werden, dass das System auch für die Messung von PCR-Produkten geeignet ist.

Kalibrationen

Im Folgenden ist exemplarisch eine Kalibrationsgerade für Rind-Target-DNA gezeigt (Abb. 48).

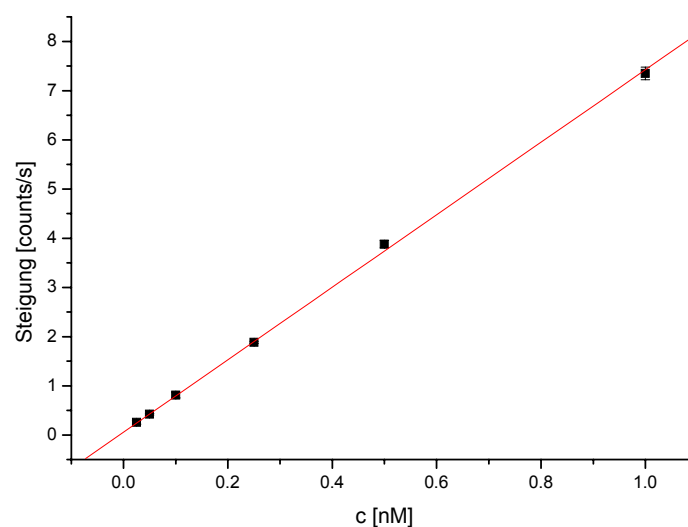


Abbildung 48: Kalibration mit Rind-Target-DNA.

Es wurde nur ein zentraler Spot des Arrays ausgewertet ($n = 3$).

Die Kalibrationsgeraden zeigten in der Regel hervorragende Linearität und geringe Standardabweichungen. Die Steigung des Messsignals (dR/dt) an einem bestimmten Sondenspot war demnach tatsächlich proportional zur DNA-Konzentration der Targetlösung und bestätigte somit die Gültigkeit der kinetischen Beschreibung (Gl. 8), eine wichtige Voraussetzung für die Quantifizierung der Messungen. Es ergab sich auf der Basis der dreifachen Standardabweichung für Rind-Target-DNA eine typische Nachweisgrenze (NG) von 15 pM bei einer Sensitivität (S) von 7 counts/(s*nM). Die Sensitivität spiegelt die Hybridisierungseffizienz wieder und ist für verschiedene Spezies unterschiedlich. Die Sensitivität war beispielsweise für Rind-Target-DNA stets größer, als für Huhn-Target-DNA (z.B.: S = 10 counts/(s*nM), NG = 17 pM). Gründe dafür liegen in der speziellen Struktur des jeweiligen DNA-Moleküls. So können der GC-Gehalt und damit der Schmelzpunkt, die Abfolge der Basen oder die Sekundärstruktur der DNA die Hybridisierung beeinflussen.

Auf Grund der Erfahrungen mit den unterschiedlichen Kalibrationen wurde ein so genannter cut-off-Wert eingeführt, eine minimale Signalsteigung, die noch als signifikant betrachtet wurde. Der cut-off wurde mit 0.2 counts/s definiert, was je nach Spezies einer ungefähren DNA-Konzentration von 25 pM entspricht. Steigungen, die größer als 0.2 counts/s waren wurden dementsprechend als positives Signal gewertet, geringere Steigungen als Hintergrund.

Messung von DNA-Mischungen

Mit den synthetischen Rind- und Huhn-Targets wurden einige Versuche zur parallelen Messung verschiedener DNA nebeneinander durchgeführt, wobei ermittelt werden sollte, wie viel DNA einer Spezies als Nebenkomponente in einer Probe noch sicher detektiert werden kann. Dazu wurden aus 1 nM Lösungen der Rind- und Huhn-Targets Mischungen hergestellt, in denen jeweils eine Spezies als Haupt- und eine als Nebenkomponente vorlag. Es wurden Lösungen mit Beimengungen von 0.1 bis 10 % Huhn-DNA in Rind-DNA bzw. Rind-DNA in Huhn-DNA bei einer relativ hohen DNA-Gesamtkonzentration von 1 nM gemessen. Abbildung 49 zeigt die Signalsteigungen an den Rind-Spots der Lösungen mit Rind-DNA als Beimischung in Huhn-DNA.

Erst eine Beimengung von 5 % Rind-DNA führte zu einem sicher zu detektierendem Signal, das deutlich über dem cut-off von 0.2 counts/s lag. Beimengungen von 1 und 0.5 % zeigten zwar im Vergleich zum Hintergrund leicht erhöhte Signalsteigungen (ca. 0.1 counts/s) konnten aber per Definition noch nicht als sicher detektierbar gewertet werden. Auch Huhn-DNA als Beimischung in Rind-DNA konnte erst ab 5 % sicher detektiert werden. Im Realfall werden die DNA-Mischproben, die z.B. aus Lebensmitteln extrahiert werden, vor der Messung noch einer PCR unterworfen. Hierbei werden die in geringerer Menge vorliegenden Spezies überproportional amplifiziert, so dass in Bezug auf die Ausgangsprobe auch

geringere Beimengungen als 5 % noch sicher erfasst werden konnten. Ein Beispiel hierzu findet sich weiter unten.

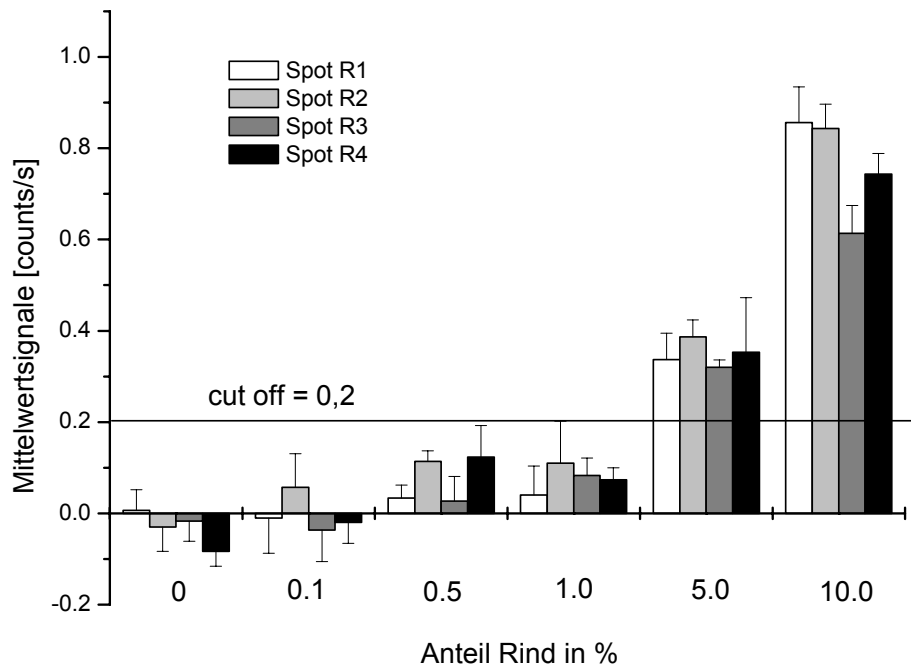


Abbildung 49: DNA-Biosensormessung von Rind-DNA als Beimengung in Huhn-DNA.

Gesamt-DNA-Konzentration = 1 nM; 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 % Rind-DNA in Huhn-DNA. Die Lösungen wurden auf Chips mit 6x6 Arrays, je 4 Spots pro Spezies (Rindspots: R1 – R4) gemessen. Die Mittelwerte aus $n = 3$ Messungen wurden im Balkendiagramm für jeden Spot aufgetragen. Neben Rind- und Huhn waren noch weitere, hier nicht relevante Sonden im Array vorhanden, die keine Signale über dem cut-off-Wert lieferten.

Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Weiterhin sollte die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse überprüft werden. Dazu wurde eine DNA-Lösung (Huhn-Target-DNA, 1 nM) vierzigmal hintereinander auf demselben Chip gemessen. Die gemessenen Signalsteigungen sind in Abbildung 50 dargestellt. Es zeigte sich, dass die Signale mit der Zeit schwächer wurden, da der Chip nach häufigem Regenerieren mit NaOH-Lösung nicht mehr dieselbe Empfindlichkeit zeigte, wie zu Beginn der Messung. Bei den durchgeführten 40 Messungen ergab sich im Mittel an den untersuchten vier Spots ein Signalverlust von -0.04 counts/s, weniger als 1 % Signalverlust pro Messung. Der letzte Messwert betrug im Mittel noch 75 % des Anfangswertes. Auf einem Chip können demnach mit geringem Signalverlust problemlos ca. 15 bis 20 Messungen durchgeführt werden. Dies zeigt einen der großen Vorteile im Vergleich zur konventionellen Chiptechnologie, bei der jeder Chip nur einmal gemessen werden kann. Man erhält hier eine sehr gute Vergleichbarkeit unterschiedlicher Proben miteinander.

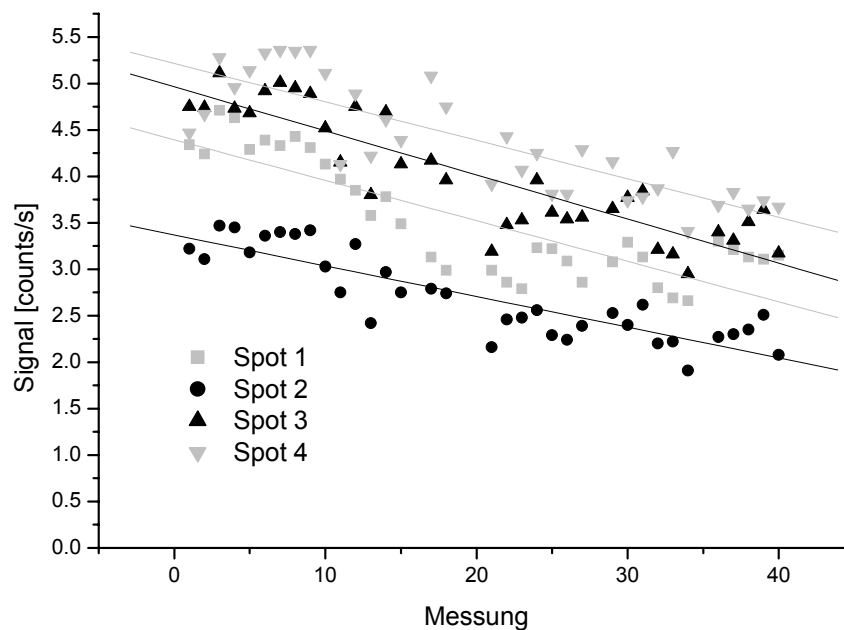


Abbildung 50: Reproduzierbarkeit der Messergebnisse.

Die Messlösungen wurden 40 mal hintereinander auf einem 6x6 Array mit 4 Spots je Spezies gemessen. Es sind die Signalsteigungen an den vier Rindspots gezeigt.

Ausleuchtungsprofil des Lasers

In sämtlichen Messungen (vergl. z.B. Abb. 50) zeigte sich, dass die Signalintensität an einem bestimmten Spot davon abhängt, wo im Array er gelegen ist. Spots, die mehr im Zentrum des Arrays lagen, lieferten in der Regel höhere Signale, als Spots, die sich am Rand des Arrays befanden. Grund für dieses Verhalten ist das ovale Ausleuchtungsprofil des Lasers. Die größte Anregungsintensität lag im Zentrum des Arrays, so dass die Fluorophore dort entsprechend stärker angeregt wurden. Abbildung 51 zeigt Bilder einer Messung eines 10x10-Arrays mit 1 mm Spotabstand. Man sieht deutlich, dass die höchsten Signalintensitäten in der Regel im Zentrum des Arrays liegen. Innerhalb des Bereiches eines typischen 6x6 – Arrays sinkt das Steigungssignal am Rand auf bis zu 38 % des Steigungssignals im Zentrum des Arrays ab. Um diesen Effekt teilweise zu kompensieren, wurden alle Sonden mehrfach an unterschiedlichen Positionen im Array aufgebracht. Es konnten dann entweder die Mittelwerte der Spots betrachtet werden, oder nur der jeweils intensivste Spot ausgewertet werden, während die anderen Spots dann der Absicherung des Ergebnisses dienten.

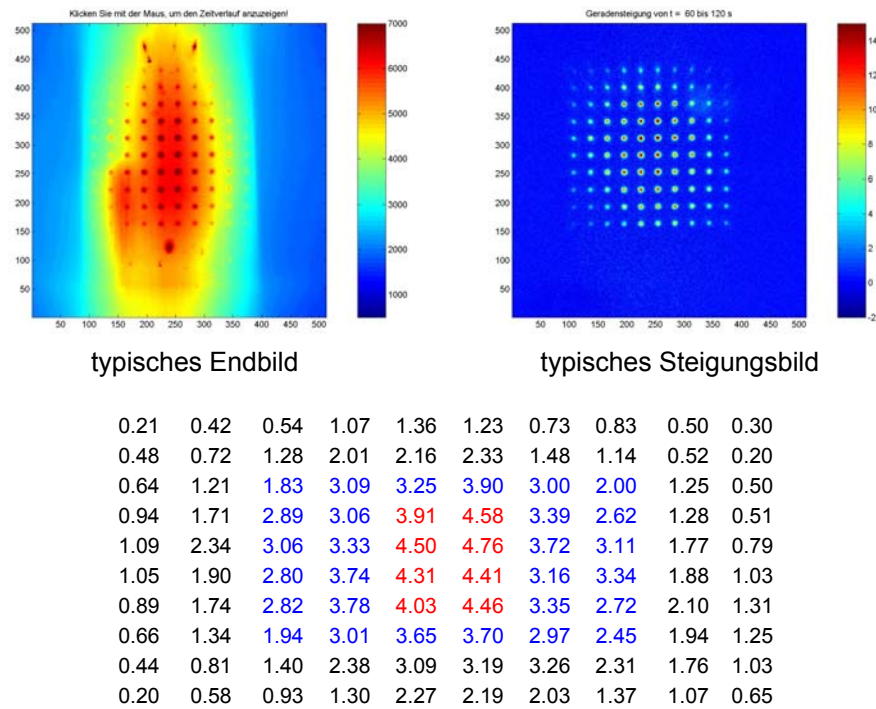


Abbildung 51: End- und Steigungsbild eines 10x10 Huhn-Arrays mit 1 mm Spotabstand und zugehörige numerische Ergebnismatrix nach Messung einer Huhn-Targetlösung (1nM).

In der Ergebnismatrix ist der Bereich, in dem ein typischer 6x6 Array liegen würde, blau markiert. Das Maximum der Fluoreszenzintensität und der beobachteten Steigung (rot) liegt in etwa im Zentrum des Arrays. Das Endbild zeigt deutlich das ovale Ausleuchtungsprofil des Lasers.

Dissoziation der Targets

Zur Auswertung der Messungen wurde ausschließlich der Signalanstieg dR/dt während der ersten zwei Minuten der Messung, also das Anbinden der Targets an die Sonden herangezogen. Die Dissoziation kann jedoch ebenfalls für gewisse Auswertungen genutzt werden, zeigt jedoch in der Regel keine lineare, sondern eine exponentielle Abhängigkeit von der Konzentration. Um die Dissoziation der Targets zu betrachten, wurde zunächst ein Rind-Huhn-Targetmix (1 nM, 120 μ l) über den Chip gepumpt und der Signalanstieg wie gewohnt beobachtet. Direkt im Anschluss wurde Hybridisierungspuffer ohne DNA-Targets über den Chip gepumpt (120 μ l) und erst danach der Chip regeneriert und gewaschen. In Abbildung 52 sind die Steigungsbilder der Assoziationsphase und der Dissoziationsphase vergleichend gezeigt. Weiterhin ist die Signalsteigung an einem Pixel in einem Spot über Assoziation und Dissoziation aufgetragen. Die Dissoziation zeigte hier ebenfalls einen nahezu linearen Verlauf, was auf die unter diesen Bedingungen nur sehr schwache Dissoziation zurückzuführen ist. Bei den gewählten Stringenzbedingungen ist die Hybridisierung relativ stabil. Die Auswertung der Dissoziationsphase kann zur Bestimmung

der Konstante k_{off} genutzt werden, bzw. erlaubt die direkte Diskriminierung von *perfect match*- und *mismatch*-Targets.

Für die Spezifität der Messungen ist es günstig, dass im gewählten Hybridisierungspuffer (50 % Formamid) schon wieder teilweise Dissoziation stattfindet. Das System wird demnach mit sehr hoher Stringenz gefahren, so dass die DNA zwar noch stabil, aber sehr spezifisch hybridisiert und es zu wenigen Kreuzhybridisierungen kommt.

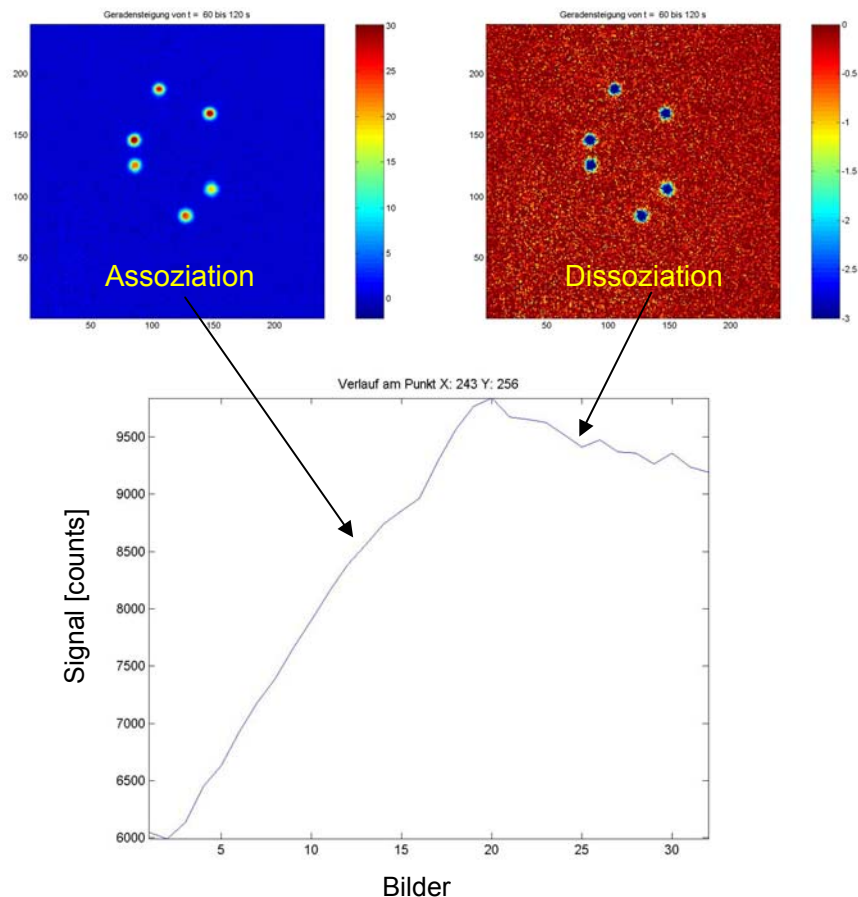


Abbildung 52: Assoziations- und Dissoziationsphase der Hybridisierung der Targets an die Sonden.

Der Huhn/Rind-Targetmix (1 nM) wurde auf einem 6x6-Array mit je 3 Huhn und 3 Rindspots gemessen. Es sind die Steigungsbilder für Assoziation und Dissoziation gezeigt und der Verlauf des Signals an einem Pixel innerhalb eines Rind-Spots.

Messung von PCR-Produkten

Nach den Modelltargets sollten nun reale PCR-Produkte gemessen werden. Dazu stand eine Reihe von Referenz-DNA-Extrakten des Chemischen und Veterinär Landesuntersuchungsamtes (CVUA) Münster zur Verfügung. Die DNA-Extrakte wurden mittels Konsensus-PCR amplifiziert und gleichzeitig über einen fluorophormarkierten Primer markiert. Die Messung der PCR-Produkte erfolgte in der Regel nach alkalischer oder thermischer Denaturierung in Hybridisierungspuffer mit 50 % Formamid.

Zunächst wurde geprüft, ob bei den PCR-Produkten ebenfalls ein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Signalsteigung bestand. Dazu wurden analog zu den Target-Messungen Kalibrationen aufgenommen. Da die PCR-Produkte normalerweise nicht aufgereinigt zur Messung kommen ist eine photometrische Quantifizierung der DNA in der Probe nicht möglich, da bei 260 nm nicht nur die amplifizierte DNA sondern sämtliche noch in der Lösung befindlichen Nucleotide absorbieren würden. Ähnliches gilt für die Absorption bei 650 nm, da hier auch freie Primer mit Cy5-Markierung absorbieren würden. Daher wurde als Bezugseinheit das Volumen an PCR-Produkt gewählt, das für eine Messung eingesetzt wurde. Die folgende Kalibration für Damhirsch-DNA (Abb. 53) wurde beispielsweise aus der Messung von Lösungen erstellt, in denen 0.1 bis 8 μl PCR-Produkt auf 120 μl Gesamtvolumen verdünnt wurden.

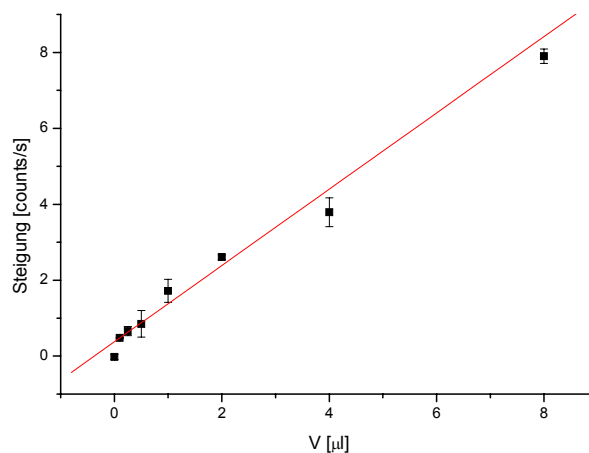


Abbildung 53: Kalibrationsgerade für Damhirsch-PCR-Produkt.

Die Fehlerbalken beziehen sich auf eine dreimalige Messung der Lösungen. Für die Kalibrationsgerade wurde nur die Signalsteigung an einem zentralen Spot des Arrays benutzt.

Die Kalibrationsgeraden mit den PCR-Produkten zeigten ebenfalls Linearität, wenngleich die Korrelationskoeffizienten hier nicht ganz so hoch, wie bei den synthetischen Targets waren. Es ergab sich auf der Basis der dreifachen Standardabweichung z.B. für das Damhirsch-PCR-Produkt, das eine typische Bandenintensität in der Gelelektrophorese auswies, eine Nachweisgrenze (NG) von 0.03 μl PCR-Produkt auf 120 μl Messlösung. Da ein PCR-Ansatz aus 25 μl PCR-Produkt besteht, können demnach sehr viele Messungen mit einer PCR-Probe vergleichend durchgeführt werden. Standardmäßig wurden in den folgenden Messungen 4 μl PCR-Produkt verwendet, um auch in sehr geringer Menge vorhandene DNA-Spuren in der Ausgangsprobe und entsprechend weniger Amplifikat mit zu erfassen. Die Sensitivität (S) betrug typischerweise 1 count/(s* μl), auch hier abhängig von der gemessenen Spezies.

Es wurde überprüft, ob die PCR, wie vermutet, die prozentuale Zusammensetzung von DNA-Mischproben verändert, da in geringerer Menge vorliegende DNA überamplifiziert werden könnte. Es wurden dazu drei Gemische aus Reh- und Damhirsch-DNA hergestellt, in denen sich 50, 10 und 2 % Damhirsch-DNA befanden. Die Lösungen wurden den Standard-PCR-Bedingungen unterworfen und dann im DNA-Biosensor gemessen. Dabei stellte sich heraus, dass die in geringerer Menge vorliegende Damhirsch-DNA tatsächlich überamplifiziert wurde. Während die Messung mit 50 % Damhirsch annähernd gleiche Signalsteigungen für beide DNA-Sorten zeigte, wurde bei 10 % Damhirsch-DNA trotzdem ein Dh-Signal in Höhe von 60 % des Rehsignals erhalten. Auch 2 % Beimengung waren noch sehr gut zu erkennen und lieferten ein Signal von 17 % der Hauptkomponente. Im Vergleich dazu konnte die Minorkomponente bei der Messung synthetischer Targets ohne vorausgeschaltete PCR erst ab 5 % detektiert werden. Die PCR führte also dazu, dass die Gesamtmethode nur semiquantitativ blieb. Im Gegenzug brachte die PCR jedoch eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber geringfügigen Beimengungen mit sich.

3.4.2 Entwicklung neuer Sonden

Zu Beginn dieser Arbeit lag bereits ein Satz von einigen Nutztiersonden (Rind, Schwein, Schaf, Huhn, Pute, Ziege (mit Einschränkungen)) für die Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln vor [135]. Dieser Sondensatz wurde optimiert und erweitert, so dass das System besser und differenzierter für den Einsatz in der Lebensmittelanalytik einsetzbar wurde. Als weiteres Anwendungsgebiet des DNA-Biosensors neben der Lebensmittelanalytik wurde in dieser Arbeit die forensische Tierartendifferenzierung erschlossen.

3.4.2.1 Sequenzdatenverarbeitung

Um geeignete Sonden für verschiedene Spezies zu entwickeln wurden die CytB-Sequenzen sämtlicher zu untersuchender Spezies im Bereich des PCR-Produktes miteinander verglichen. Geeignete Sonden sollten keine Fehlpaarungen mit der jeweiligen Target-DNA aufweisen, jedoch möglichst viele Fehlpaarungen mit allen anderen in Frage kommenden Spezies. Weiterhin musste ein möglichst hoher GC-Gehalt im Sondenbereich erzielt werden. Die Optimierung von Sonden erfolgte unter anderem mit verschiedenen im Internet erhältlichen Sequenzdatenverarbeitungsprogrammen (ClustalX, Blast).

Zur Unterstützung des bei mehreren Spezies schon recht komplexen Sondendesigns wurde im Arbeitskreis Prof. Cammann von E. FRAUENDORFER ein spezielles Programm auf der Basis von Matlab entwickelt („scoreseq“). In diesem Programm werden Punktzahlen (scores) von 0 bis 10 für die verschiedenen Fehlpaarungen vergeben, und zwar in

Abhängigkeit von der Position der Fehlpaarung innerhalb des Sondenbereiches. Damit wird dem Umstand Rechnung getragen, dass sich eine zentrale Fehlpaarung wesentlich stärker auf die Hybridisierung auswirkt, als eine am Rand liegende. Eine Fehlpaarung genau in der Mitte der Sonde erhielt demnach zehn Punkte, die direkt danebenliegende neun Punkte und eine Fehlpaarung ganz am Rand erhielten nur noch einen Punkt. Die Punkte der verschiedenen Fehlpaarungen wurden aufsummiert und die Summe gab Aufschlüsse über die Qualität der Sonde. Durch Verschieben eines Fensters der Länge der Sonde wurde dann die optimale Sonde gesucht, welche eine hohe Anzahl von Punkten in den paarweisen Vergleichen mit allen Spezies, die nicht an ihr binden sollen, aufweisen sollte. Dies bedeutet, dass entweder wenige, sehr zentrale Fehlpaarungen oder viele Fehlpaarungen in den Randbereichen mit den nicht zu detektierenden Spezies vorhanden sein sollten. Im vorliegenden Fall wurden nur Sonden in Betracht gezogen, die mindestens eine Punktzahl von 15 (z.B. eine sehr zentrale Fehlpaarung und eine weniger zentrale Fehlpaarungen) mit allen anderen Spezies aufwiesen. Dabei stellte sich heraus, dass es oft nur wenige Bereiche im CytB-Gen gab, die diese Anforderungen im Vergleich mit sämtlichen Spezies erfüllten und gleichzeitig auch einen ausreichend hohen GC-Gehalt von mindestens 45 % (Erfahrungswert für gute Anbindung) aufwiesen. Der GC-Gehalt der Sonden wurde ebenfalls mit der beschriebenen Matlabroutine berechnet. Zur Unterstützung des Sondendesigns wurden die Scorefunktionen der relevanten Spezies sowie der GC-Gehalt graphisch dargestellt. Im Folgenden ist das Sondendesign der Kaninchensonde mit Hilfe der Matlabroutine exemplarisch erläutert.

Zunächst wurde die Sequenz des CytB-PCR-Produktes von Kaninchen vergleichend mit ihm besonders nah verwandten Spezies (Hase, Mensch, Pferd etc.) betrachtet. Aus Gründen der Übersichtlichkeit war es ratsam, sich auf die Diskriminierung von diesen Tierarten zu konzentrieren. Im Nachhinein wurden sämtliche anderen in Frage kommenden Spezies mit der entwickelten Sonde verglichen, wobei bei den weniger nah verwandten Arten selten nachher noch Probleme auftraten. Für die Beurteilung des Verwandtschaftsgrads wurde ein Alignment der betrachteten Sequenzen (im Bereich der PCR-Produkte) mit dem Programm ClustalX durchgeführt und die Möglichkeit, aus diesen Daten phylogenetische Bäume zu erstellen, genutzt.

Die Ergebnisse der durch das Programm automatisch durchgeführten paarweisen Vergleiche zur Ermittlung der *scores* wurden als Matrix erhalten und zum schnelleren Auffinden günstiger Bereiche graphisch aufgetragen (Abb. 54). Dabei wurden auch die beiden Schwellwerte dargestellt, 15 für die minimale Punktzahl und 45 % für den minimalen GC-Gehalt der Sonde. In dieser Graphik fand sich z.B. ein günstiger Bereich bei ca. Base 300 (grüner Pfeil). Nur in diesem Bereich war keine der *score*-Funktionen geringer als 15 und der

GC-Gehalt gleichzeitig ausreichend hoch. Die Details im Ausschnitt der Ergebnismatrix in Tabelle 3 zeigen, dass an Position 287 eine vermutlich gut geeignete Kaninchen-Sonde mit hohem GC-Gehalt und hohen Punktzahlen liegen sollte. Genau dieser Sondenbereich wurde nun mit allen anderen für die Messungen in Frage kommenden Spezies verglichen, um zu sehen, ob hier noch unerwartete Probleme auftraten. Auch hier kamen wieder die üblichen Programme wie ClustalX und Blast zum Einsatz. Stellten sich keine weiteren theoretischen Probleme dar, wurde die Sonde auf Chips gespottet und im Praxistest im Biosensor auf ihre Spezifität mit sämtlicher zur Verfügung stehender Tierarten-DNA getestet.

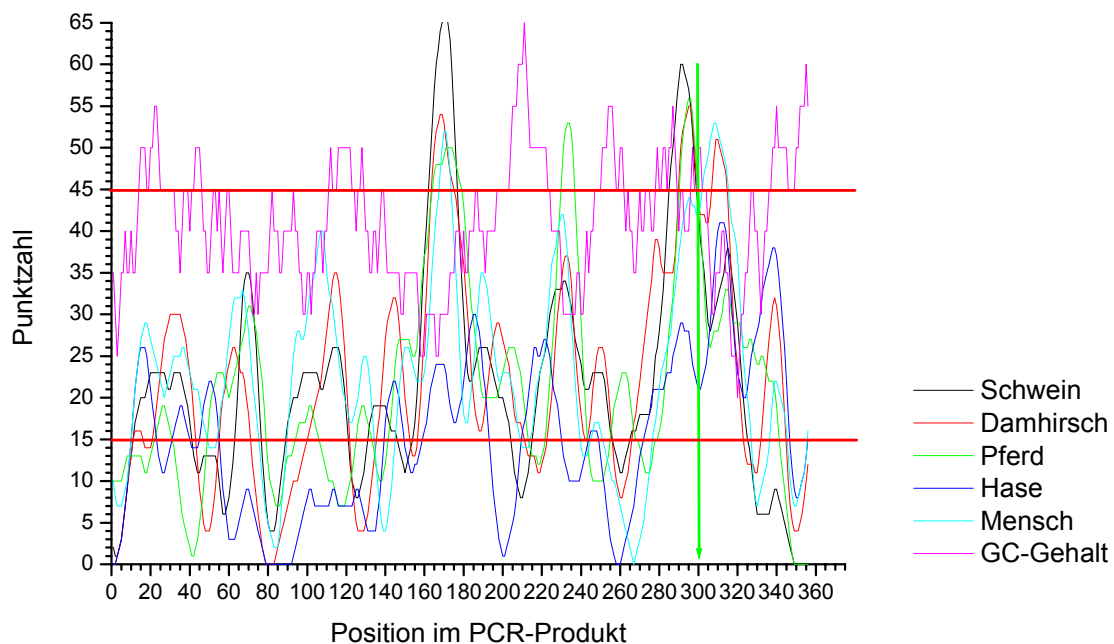


Abbildung 54: Entwicklung einer Kaninchen-Sonde mit Hilfe der Matlabroutine.

Die Punktzahl für den Vergleich einer Kaninchen-Sonde mit den genannten Spezies an jeder Position des PCR-Produktes ist gezeigt. Die violette Kurve zeigt den GC-Gehalt in %. Die Schwellenwerte von 15 Punkten und 45 % GC-Gehalt sind durch Linien gekennzeichnet.

Tabelle 3: Ausschnitt aus der Ergebnismatrix der Kaninchen-Sondenentwicklung.

Schwein	Damhirsch	Pferd	Hase	Mensch	GC-Gehalt	Position im PCR-Produkt
33	35	19	21	24	50	282
37	35	22	22	25	50	283
41	35	25	23	26	45	284
45	35	28	23	27	50	285
48	35	30	23	28	50	286
50	35	32	25	31	55	287
53	37	36	26	33	50	288
56	41	40	27	35	45	289
52	53	54	24	43	50	297
48	50	51	23	43	45	298
45	46	48	22	42	45	299
42	43	45	21	42	50	300
39	42	41	21	43	50	301

Folgende Sonden wurden nach oben beschriebener Vorgehensweise neu entwickelt (die eindeutige Kennzeichnung der Sonden erfolgt über die Position im CytB-Gen und nicht im PCR-Produkt):

- Nutztiere: Pferd (Pf684), Ziege (Z690), Büffel (Bf690)
- Wildtiere: Damhirsch (Dh690), Reh (Re690 und Re629), Sikahirsch (Sh690), Rothirsch (Rh629), Hase (Ha709), Kaninchen (Ka686),
- Sonstige: Mensch (Me684), Hund (Hu690)

3.4.2.2 Spezifität der neuen Sonden

Um die Spezifität der neuen Sonden zu testen, wurden diese auf Chips dispensiert und im DNA-Biosensor mit PCR-Produkten aller verfügbaren Spezies (Referenz-DNA des CVUA und der Rechtsmedizin, vergl. Kap. 6.1.3) sowohl auf gute Anbindung der Target-DNA, als auch auf unerwartete Kreuzhybridisierungen mit anderer DNA getestet. Folgende Tierarten standen zur Verfügung und wurden auf ihre Wechselwirkungen mit jeder Sonde untersucht:

- Nutztiere: Rind, Schwein, Pferd, Ziege, Schaf, Huhn, Pute, Gans, Hauskaninchen, Büffel
- Wildtiere: Reh, Damhirsch, Rothirsch, Sikahirsch, Wildschwein, Wildkaninchen, Hase, Wildente
- Weitere: Mensch, Hund

Viele der neu entwickelten Sonden konnten problemlos verwendet werden. Sie zeigten hervorragende Ergebnisse mit der Target-DNA und keine Kreuzhybridisierungen mit der DNA der anderen Spezies. Bei einigen Sonden wurden jedoch Besonderheiten beobachtet, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll.

Entwicklung einer neuen Ziegesonde:

Ein Problem des ursprünglich entwickelten SONDENSATZES stellte der Nachweis von Ziegen-DNA dar [135]. Zum einen ist die Differenzierung der nah verwandten Spezies Schaf und Ziege sehr anspruchsvoll, zum anderen traten auch unerwartete Kreuzhybridisierungen mit anderen Spezies auf. Mehrere Ziegesonden wurden bereits getestet, lieferten jedoch nicht zufrieden stellende Ergebnisse. Die zuletzt verwendete Sonde (Z684) konnte zwar Schaf und Ziege differenzieren, zeigte aber eine Kreuzhybridisierung mit Schwein-DNA, so dass jede Probe, die Schwein enthielt, fälschlicherweise zusätzlich ein Ziegesignal lieferte.

In der vorliegenden Arbeit wurde nun nach der in Abschnitt 3.4.2.1 dargestellten systematischen Vorgehensweise eine neue Ziegesonde entwickelt (Z690), die die Schaf-Ziege-Differenzierung erlaubte und dabei keinerlei Kreuzhybridisierungen mit der DNA anderer getesteter Tierarten zeigte. Abbildung 55 zeigt die Ergebnisse mit der neuen Ziegesonde im Vergleich zur alten Sonde (Z684) bei Messung mit Ziegen- und Schwein-Referenz-DNA. Die neue Ziegesonde (Z690) differenzierte erfolgreich Ziege und Schaf und zeigte dabei vergleichbar hohe Signale, wie die alte Ziegesonde. Wurde Schweine-PCR-Produkt auf den Chip gegeben, wies die alte Ziegesonde bis zu 10 % Kreuzhybridisierung bezogen auf das Schweinsignal auf (Signalsteigungen von 0.22 bis 0.36 counts/s). Dies täuscht etwa 20 % Ziegen-DNA in der Probe vor. An der neuen Ziegesonde wurde keine Kreuzhybridisierung mit Schwein-DNA beobachtet (-0.05 bis 0.06 counts/s).

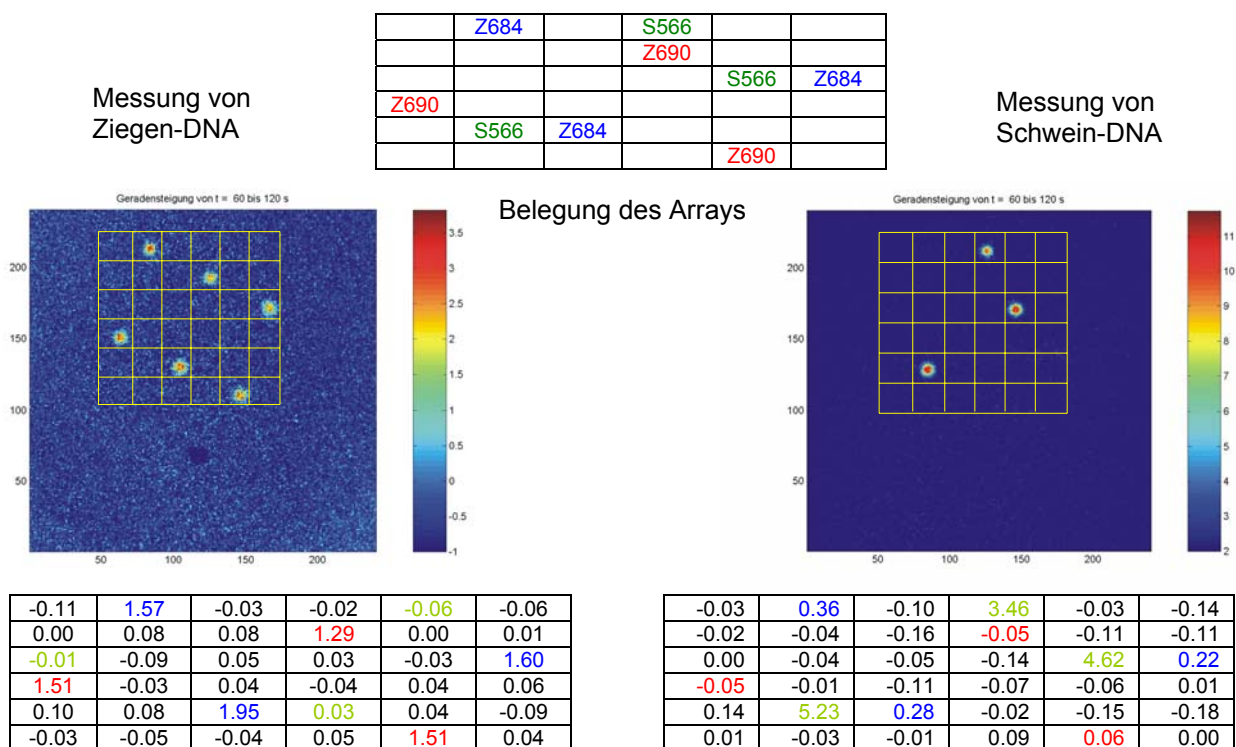


Abbildung 55: Charakterisierung der neuen Ziege-Sonde (Z690) mit Referenz-DNA.

Die Steigungsbilder und die Hintergrund-korrigierten Steigungswerte (Ergebnismatrices) sind abgebildet. Es wurden jeweils 4 µl PCR-Produkt auf 120 µl Gesamtprobenvolumen gemessen.

Entwicklung von Sonden für Reh, Damhirsch, Rothirsch und Sikahirsch:

Die Reh- und Hirschspezies sind sehr nah miteinander verwandt und unterscheiden sich nur sehr wenig in ihren CytB-Sequenzen. Zudem weisen sie häufig in den variablen Bereichen nur geringe GC-Gehalte auf. Weiterhin besteht eine nahe Verwandtschaft zu Schaf, Ziege und Pferd, wo mit weiteren Kreuzhybridisierungen zu rechnen ist. Daher war die

Sondenentwicklung hier besonders anspruchsvoll. Ein Vergleich des CytB-Bereiches, in dem das PCR-Produkt liegt, führte zunächst zu der Entwicklung von drei Sonden: Re690, Rh690, Dh690 (alle 45 % GC-Gehalt) für Reh, Rothirsch und Damhirsch. Der Test mit der entsprechenden Referenz-DNA lieferte jedoch nur für Damhirsch zufrieden stellende Ergebnisse. Die Rothirschsonde zeigte insgesamt nur sehr schwache Signale und an der Rehsonde war bei Standardbedingungen (50 % Formamid) keine Anbindung von Target-DNA zu messen. Es wurden daher Versuche mit geringerer Stringenz (geringerem FA-Gehalt) durchgeführt, um auf diese Art eventuell bessere Anbindung der Targets an die Sonden zu erreichen. Abbildung 56 zeigt Messungen, die mit PCR-Pools von Reh, Rothirsch und Damhirsch bei unterschiedlichen Formamidkonzentrationen durchgeführt wurden. Dabei zeigte sich deutlich, dass unter Standardbedingungen (50 % FA, RT) nur die Damhirschsonde geeignet war. Die Rothirschsonde zeigte bei Formamidgehalten von unter 40 % gute Ergebnisse, die Rehsonde jedoch erst bei sehr viel weniger stringenten Bedingungen, wie bei unter 30 % Formamid.

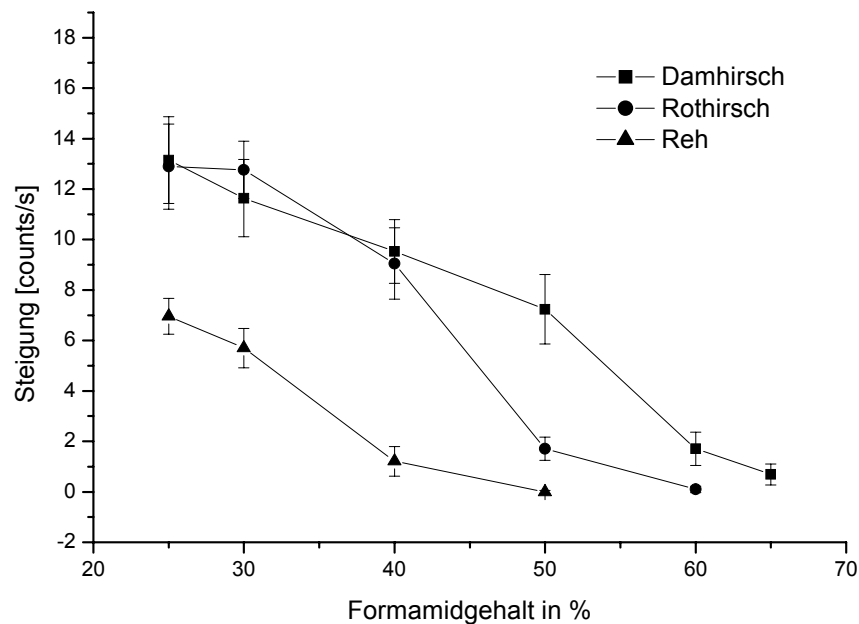


Abbildung 56: Variation des Formamidgehaltes bei der Messung von Wildtier-PCR-Produkten.

Es wurden 4 μ l Damhirsch, bzw. 8 μ l Rothirsch und Reh PCR-Produkt auf 120 μ l Probenvolumen jeweils zweimal gemessen. Für jede Spezies wurden alle drei Spots im Array ausgewertet.

Das Arbeiten mit der Rothirschsonde Rh690 bei 40 % Formamid wäre gut möglich, da auch bei diesen etwas weniger stringenten Bedingungen noch keine Kreuzhybridisierungen zu beobachten waren. Die Rehsonde Re690 ist für das Messen von Reh-DNA jedoch nicht gut geeignet, da sie nur bei unter 30 % FA einsetzbar wäre und auch dann deutlich schwächere

Signale zeigt, als Damhirsch und Rothirsch. Bei zu wenig stringenten Bedingungen kann aber eine spezifische Hybridisierung nicht mehr in allen Fällen gewährleistet werden.

Es gibt zwei Phänomene, die für die schlechte Hybridisierung an Reh- und Rothirschsonde verantwortlich sein können: Schlechte Hybridisierungseigenschaften oder eine falsche Basensequenz der Sonde. Der GC-Gehalt der Sonden ist vergleichsweise gering, was zu einer schlechteren Anbindung führen kann, bzw. die Hybridisierung kann durch andere Faktoren wie z.B. ungünstige Sekundärstruktur gehemmt sein. Außerdem kann es sein, dass die Target-DNA nicht genau mit der Sequenz übereinstimmt, die zur Entwicklung der Sonde vorlag. Um dies auszuschließen wurde eine PCR durchgeführt, in der der Primer CytB403 durch die jeweilige Sonde ersetzt wurde. Es entstehen kürzere PCR-Produkte als gewöhnlich, die aber auf jeden Fall im betreffenden Bereich zu der Sequenz der Sonde genau komplementär sind. Mit diesen PCR-Produkten wurde getestet, ob sich die schlechte Anbindung auf die Hybridisierungseigenschaften der Sonde zurückführen lassen, oder ob Sequenzunterschiede vorliegen. Die Rothirschsonde zeigte nun unter Standardbedingungen sehr gute Ergebnisse (6 - 7 counts/s). Hier liegt demnach keine Hemmung der Hybridisierung vor, auch der GC-Gehalt ist anscheinend nicht zu niedrig. Es kann also nur ein Unterschied in der Sequenz von Sonde und Target, eine Fehlpaarung genau im Bereich der Sonde, für die schlechten Signale dieser Sonde verantwortlich sein. Dies konnte nach erneuter, umfassender Recherche der Sequenzdatenbanken bestätigt werden. Die Rehsonde zeigte mit diesen PCR-Produkten ebenfalls Signale, die aber immer noch sehr schwach waren (1.5 – 2 counts/s). Hier scheint die Hybridisierung gehemmt zu sein. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass auch hier eine Abweichung der Sequenz von Sonde und Target vorliegt.

Vor diesem Hintergrund wurden neue Sonden für Reh und Rothirsch entwickelt (Re629, Rh629) und getestet. Mit diesen Sonden wurden bessere Ergebnisse erhalten. Die Ziel-DNA band nun sehr gut an die entsprechenden Sonden an. Bei der Rothirschsonde zeigte sich nun aber eine schwache Kreuzhybridisierung mit den sehr artverwandten Spezies Schaf und Ziege von 7 bzw. 9 % bezogen auf das Rothirschsignal (Abb. 57).

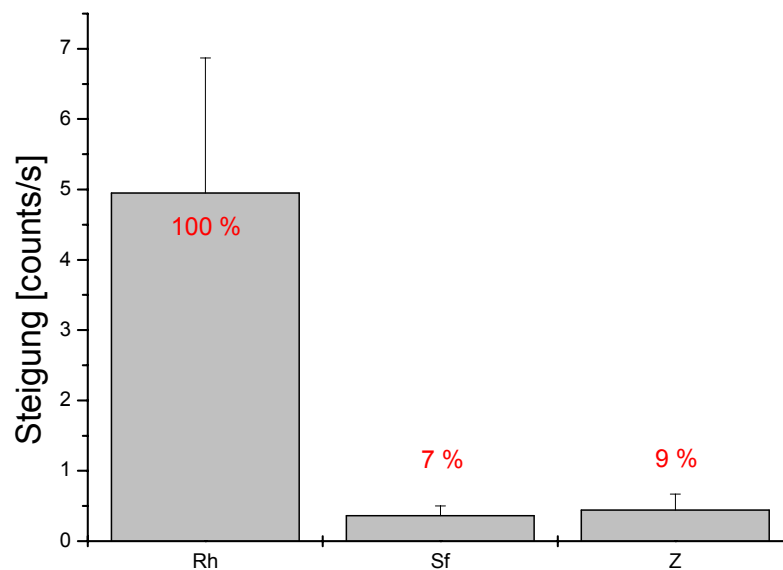


Abbildung 57: Kreuzhybridisierung von Schaf- und Ziege-PCR-Produkten an der Rothirschsonde Rh629.

Es wurden 4 μl PCR-Produkt auf 120 μl Gesamtvolumen je einmal gemessen. Die Fehlerbalken beziehen sich auf den Mittelwert der Steigungswerte aus je drei Spots eines Chips.

Eine Messung von Sika-Hirsch-Referenz-DNA zeigte eine sehr gute Anbindung an die zuerst entwickelte Rothirschsonde (Rh690). Eine erneute Recherche in Sequenzdatenbanken und ein Abgleich der Sequenzen zeigte, dass die erste Rothirschsonde Rh690 genau komplementär zum entsprechenden Bereich der Sika-Hirsch-DNA ist, mit Rothirsch jedoch eine Fehlpaarung aufweist. Somit eignet sich diese Sonde als Sikahirschsonde, die eine schwache Kreuzhybridisierung mit Rothirsch zeigt und wird im Folgenden entsprechend Sh690 für Sikahirsch genannt. Somit bestehen nun Sonden für die Diskriminierung von Reh (Re629), Rothirsch (Rh629), Damhirsch (Dh690) und Sikahirsch (Sh690). Tests mit sämtlichen anderen Spezies zeigten keine weiteren Kreuzhybridisierungen.

Messung von Hase-, Haus- und Wildkaninchen-DNA:

Es wurden eine Hase- und eine Kaninchensonde entwickelt (Ha709, Ka686). Vom CVUA standen neben der Hase-Referenz-DNA zwei verschiedene Kaninchen-DNA-Extrakte zur Verfügung, Haus- und Wildkaninchen. Mit den Sonden konnte sehr gut zwischen Hase und Kaninchen differenziert werden. Mit der Sonde Ka686 wurde sowohl Haus-, als auch Wildkaninchen-DNA sehr gut detektiert. Es gibt in den Sequenzdatenbanken keinen Hinweis darauf, dass die beiden Kaninchenarten sich in ihren CytB-Sequenzen unterscheiden. Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse mit den beiden Sonden für Hase und Kaninchen. Gezeigt ist jeweils die Steigung am zentralen Spot des Arrays.

Tabelle 4: Charakterisierung der Hase- und Kaninchensonden.

Referenz-DNA	Ha709 [counts/s]	Ka686 [counts/s]
Hase	8.92	-0.01
Hauskaninchen	0.03	7.92
Wildkaninchen	-0.11	7.21

Messung von Hausschwein- und Wildschwein-DNA:

Die Schweinsonde S566, entwickelt für die Detektion von Hausschwein-DNA, wurde auf ihre Wechselwirkung mit Wildschwein-DNA getestet. Wie erwartet wurde Wildschwein-DNA ebenfalls sehr gut von dieser Sonde erkannt (Signalsteigungen von 3 bis 5 counts/s bei 4 µl PCR Produkt pro Messung). Eine Diskriminierung dieser extrem ähnlichen Spezies ist mit dieser Sonde nicht möglich.

Messung von Gans- und Wildenten-DNA:

Um mögliche Kreuzhybridisierungen der Geflügelsonden (H684 und P684 für Huhn und Pute) zu erkennen, wurde hier auch Gans- und Wildenten-DNA gemessen. Es waren keine Kreuzhybridisierungen festzustellen, die Signalsteigungen an beiden Sonden lagen deutlich unter dem cut-off Wert von 0.2 counts/s.

3.4.3 Messung von Realproben im DNA-Biosensor

Um beispielhaft den Einsatz des DNA-Biosensors in der Praxis zu demonstrieren wurden Realproben aus der Lebensmittelanalytik und der Forensik analysiert. Mit der großen Anzahl neu entwickelter Sonden konnten die Lebensmittelproben wesentlich differenzierter gemessen werden, als mit dem DNA-Chip der ersten Generation. Hierfür standen eine Vielzahl von DNA-Extrakten aus Fleisch- und insbesondere Milchprodukten des CVUA zur Verfügung. Weiterhin wurden Proben aus der Rechtsmedizin analysiert.

3.4.3.1 Messung von Fleischprodukten

Im Folgenden sind tabellarisch die Ergebnisse der Messungen von Fleischprodukt-Realproben gezeigt. In der Regel reichten schon 4 µl PCR-Produkt auf 120 µl Probe bei einem Formamidgehalt von 50 % zur Messung aus. Zunächst wurden schon vorhandene und bereits mit dem alten SONDENSATZ bestimmte, Proben mit den neuen Sonden erneut gemessen (Tab. 5). Weiterhin standen einige Proben aus der Pferd-Thematik (Tab. 6) und der Wildtier-Thematik (Tab. 7) zur Verfügung.

Tabelle 5: Analyse von Fleischprodukten der allgemeinen Nutztier-Thematik.

Nr.	Bezeichnung	Ergebnisse CVUA	Ergebnisse ICB	Übereinstimmung
F-1	Hähnchen-Döner	Huhn	Huhn	100 %
F-2	Hähnchen-Döner	Huhn	Huhn	100 %
F-3	Hähnchen-Döner	Huhn	Huhn	100 %
F-4	Döner-Kebap	Huhn	Huhn	100 %
F-5	Putenmedaillons	Pute	Pute	100 %
F-6	Mettwurst	Schwein	Schwein	100 %
F-7	Fleischwurst	Schwein	Schwein	100 %
F-8	Rostbratwurst	Schwein	Schwein	100 %
F-9	Würstchen	Schwein	Schwein	100 %
F-10	Döner Kebap	Rind	Rind	100 %
F-11	Lammbratwurst	Rind, Schaf	Rind, Schaf	100 %
F-12	Truthahnbrust	Pute	Pute	100 %
F-13	Thüringer Mett	Rind, Schwein	Rind, Schwein	100 %
F-14	Hot Dog	Schwein, Huhn	Schwein, Huhn	100 %
F-15	Fleischwurst	Rind, Schwein, Huhn, Pute	Rind, Schwein, Huhn	75 %
F-16	Rostbratwurst	Schwein, Pute	Schwein, Pute	100 %
F-17	Putenbratwurst	Rind, Schwein, Pute	Rind, Schwein, Pute	100 %
F-23	Brühwurst A	Schwein	Schwein	100 %
F-24	Brühwurst B	Rind, Schwein, Huhn, Pute	Rind, Schwein, Huhn, Pute	100 %
F-25	Leberwurst A	Rind, Schwein, Pute	Rind, Schwein, Pute	100 %
F-26	Leberwurst B	Schwein	Schwein	100 %

Tabelle 6: Analyse von Fleischprodukten aus der Pferde-Thematik.

Nr.	Bezeichnung	Ergebnisse CVUA	Ergebnisse ICB ¹⁾	Übereinstimmung
F-27	Echt ungarische Salami	Pferd negativ	Schwein	ja
F-28	Knoblauchwurst	Pferd negativ	Rind, Schaf	ja
F-29	Truthahn Salami	Pferd negativ	Rind, Pute	ja
F-30	org. fr. Ringsalami	Pferd negativ	Schwein	ja
F-31	Fleischwurst	Pferd negativ	Schwein, Pute	ja
F-32	Kordelsalami	Pferd negativ	Schwein	ja
F-33	Geflügelleberwurst	Pferd negativ	Huhn	ja
F-34	Salami pur porc	Pferd negativ	Schwein, (Huhn)	ja
F-35	Pferdesalami	Pferd positiv	Pferd	ja

¹⁾ Spezies in Klammern konnten nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Tabelle 7: Analyse verschiedener Fleischprodukte aus der Wildtier-Thematik.

Nr.	Bezeichnung	Ergebnisse CVUA	Ergebnisse ICB	Übereinstimmung
F-37	Rehkeule	Reh	Reh	ja
F-38	Wildschweinbraten	Wildschwein	Schwein	ja
F-39	Hasenkeule	Hase	Hase	ja
F-40	Hirschmedallions	Rothirsch	Rothirsch	ja
F-41	Hirschkeule	Rothirsch	Rothirsch	ja

Die Messung der DNA-Extrakte aus Fleischprodukten war insgesamt unproblematisch. Die Sonden waren sehr gut geeignet, die verschiedenen Spezies zu diskriminieren und mehrere Spezies in einer Probe konnten problemlos parallel gemessen werden. Da ein Chip bis zu 15-mal verwendet werden kann, konnten in der Regel die Proben aus einer Untersuchungsreihe alle auf demselben Chip gemessen werden, was die Ergebnisse sehr gut vergleichbar machte. Eine semiquantitative Aussage in Form von Hauptkomponente oder Nebenbestandteil an Hand der Steigungswerte war ebenfalls möglich. Probe F-13 (Thüringer Mett vom Schwein) enthielt beispielsweise als Hauptkomponente Schwein (12.05 counts/s), als Nebenkomponente Rind (5.81 counts/s) und war damit eindeutig verfälscht.

Die erneute Messung verschiedener alter Fleischprodukt-Extrakte (Tab. 5) mit dem neuen SONDENSATZ bestätigte die Ergebnisse von C. PETER [135]. Es wurden keine weiteren Bestandteile gefunden. Die Messung verlief damit weitgehend in Übereinstimmung mit der Referenzanalytik des CVUA, mit Ausnahme von Probe F-15, in der auch in früheren Experimenten Pute nicht nachgewiesen werden konnte [135]. Als großer Vorteil des neuen SONDENSATZES bestätigte sich, dass es nun nicht mehr zu unerwünschten Kreuzhybridisierungen von Schwein-DNA an die Ziegelsonde kommt, so dass die Ergebnisse nun eindeutig waren und somit keine Interpretation mehr notwendig war.

Die neue Pferdsonde konnte erfolgreich an einer Pferdesalami getestet werden (Tab. 6). Bei einer Kampagne des CVUA zur Verfälschung von Fleischprodukten mit Pferdefleisch wurde in acht Proben durch die Referenzmethode PCR-RFLP keine Beanstandung festgestellt. Mit dem DNA-Biosensor wurde die Abwesenheit von Pferd-DNA ebenfalls korrekt bestimmt. Darüber hinaus wurde hier aber in derselben Analyse die tatsächliche Zusammensetzung der Probe geliefert.

Die Diskriminierung zwischen Reh- und Rothirschproben war unproblematisch. Auch die Hasen- und Wildschweinproben konnten richtig bestimmt werden (Tab. 7). Verfälschungen durch andere Fleischsorten konnten in den untersuchten Wildprodukten in Übereinstimmung mit dem CVUA nicht festgestellt werden.

Abbildung 58 zeigt beispielhaft die Messung der zwei Realproben Knoblauchwurst (F-28) und Truthahnsalami (F-29). In beiden Proben wurde tatsächlich kein Pferd detektiert. In der Truthahnsalami wurde jedoch neben Puten- auch Rind-DNA detektiert, was ebenfalls zu Beanstandungen auf Grund falscher Deklaration führen sollte. Dies wurde in der Analytik des CVUA, die nur Verfälschungen durch Pferd untersuchte, nicht erfasst.

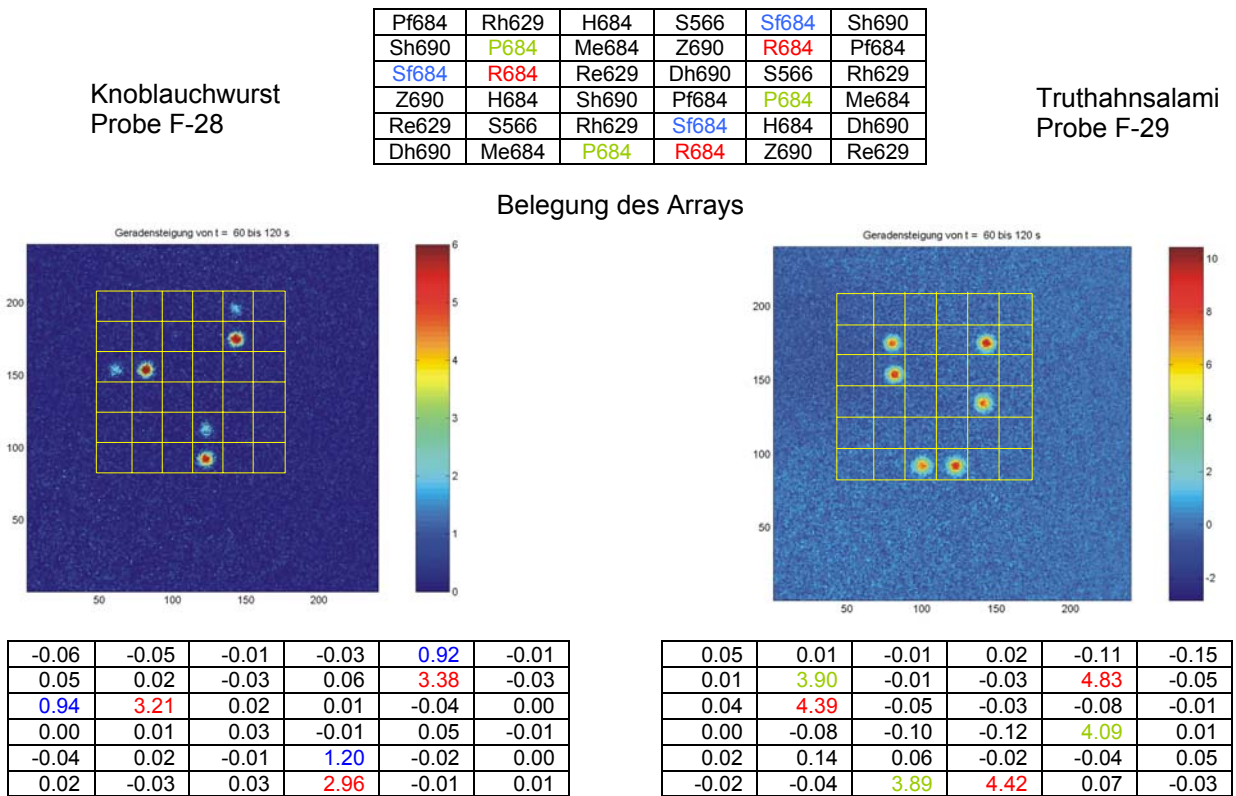


Abbildung 58: Analyse von Fleischprodukt-Realproben.

Es wurden jeweils 4 µl PCR-Produkt auf 120 µl Probe nach thermischer Denaturierung gemessen. Zusätzlich zu den Steigungsbildern sind die korrigierten Steigungswerte der beiden Proben gezeigt.

3.4.3.2 Messung von Milchprodukten

Mit den neuen Sonden für Ziege und Büffel und den bereits bestehenden Sonden für Rind und Schaf war der DNA-Biosensor nun besonders geeignet diverse Käseprodukte zu untersuchen.

In Tabelle 8 sind die Ergebnisse der Analyse diverser Käseproben zusammengefasst. Die Bestimmungen waren in den meisten Fällen unproblematisch und die Ergebnisse stimmten mit der Referenzanalytik des CVUA überein. Mit der neuen Büffelsonde konnte nun auch Mozzarella (Probe K-7) richtig analysiert werden, wobei die Differenzierung der nah verwandten Spezies Rind und Büffel erfolgreich war. Für die Probe K-7 wurde beispielsweise

eine Signalsteigerung von 5.55 counts/s an der Büffelsonde gefunden, während an der Rindsonde kein Signal über dem cut-off Wert detektiert wurde (-0.02 counts/s).

Tabelle 8: Analyse von verschiedenen Käseprodukten.

Nr.	Bezeichnung	Ergebnisse CVUA	Ergebnisse ICB	Übereinstimmung ¹⁾
K-1	Schafskäse 1	Rind, Ziege	Rind, Ziege	100 %
K-2	Schafskäse 2	Rind	Rind	100 %
K-3	Schafskäse 3	Rind, Schaf, (Ziege)	Rind, Schaf	100 %
K-4	Picodon	Rind, Ziege	Rind, Ziege	100 %
K-5	Ziegenfeta	Ziege	Ziege, (Büffel)	100 %
K-6	Ziegenfeta + 10 % Kuhmilch	Ziege, Rind nicht nachgewiesen	Ziege, Rind, (Büffel)	100 %
K-7	Mozzarella	Büffel	Büffel	100 %
K-8	gr. Schafskäse	Schaf	Schaf	100 %
K-9	Feta aus Schafs- und Ziegenmilch	Schaf, Ziege, Rind	Schaf, Ziege, Rind	100 %
K-10	orig. Feta in Salzlake	Schaf, Ziege, Rind	Schaf, Ziege, Rind	100 %
K-11	Schafskäsecreme	Schaf, Rind, Ziege	Schaf, Rind, Ziege	100 %
K-12	Schafskäse 4	Rind	Rind	100 %
K-13	sp. Schafskäse	Schaf, (Ziege), (Rind)	Schaf	100 %
K-14	Ziegenkäse	Ziege, Rind, Schaf	Ziege, Rind, Schaf	100 %
K-15	sard. Schafskäse	Schaf	Schaf	100 %

¹⁾ Die Angaben beziehen sich nur auf sicher detektierte Spezies. Spezies in Klammern konnten nicht sicher nachgewiesen werden.

Die Messung von Mischproben, in denen nur eine sehr geringe Menge an Ziegen-DNA vorlag, war teilweise nicht nach dem Standardverfahren (PCR mit 60 °C Annealingtemperatur bei 35 Zyklen) möglich. Wie oben erwähnt (Kap. 3.3), zeigte einer der Konsensusprimer eine Fehlpaarung mit der Ziegen-DNA. Ziege wird demnach in der PCR etwas schlechter amplifiziert. Dies machte sich bemerkbar, wenn sehr geringe Spuren von Ziegen-DNA in einem Gemisch bestimmt werden sollten und führte dazu, dass Ziege in einigen Proben nicht auf Anhieb detektiert wurde (Proben K-9, K-11, K-13). Um geringe Mengen Ziegen-DNA ebenfalls zu erfassen, wurde die PCR etwas unspezifischer (57 °C Annealingtemperatur, 45 Zyklen) durchgeführt. In den Proben K-9 und K-11 wurde dann Ziegen-DNA sicher nachgewiesen (Abb. 59), in Probe K-13 war nach wie vor keine Ziegen-DNA zu detektieren, die Referenzanalytik des CVUA hatte in diesem Fall jedoch auch keine eindeutigen Ergebnisse geliefert.

In Probe K-9 wurden weiterhin unter Standardbedingungen sehr geringe Spuren von Rind-DNA nicht detektiert, die aber unter den weniger spezifischen PCR-Bedingungen ebenfalls erfasst wurden.

In den Proben K-5 und K-6 fand sich ein Verdacht auf Büffel-DNA. In der Referenzanalytik wurde Büffel nicht untersucht, so dass keine Vergleichsdaten vorliegen. Es bleibt zu klären, ob diese Spuren tatsächlich durch Kontamination mit Büffelmaterial, oder durch Kreuzreaktivitäten der Sonde verursacht wurden.

Bei schwierigen, nicht eindeutig messbaren Proben wurde die Analyse mehrfach durchgeführt und ggf. mehr PCR-Produkt eingesetzt. Dabei wurden die ursprünglich erhaltenen Ergebnisse bestätigt.

Abbildung 59 zeigt exemplarisch die Ergebnisse zweier Messungen von Käseproben. Die Steigungswerte in der Ergebnismatrix von Probe K-11 machen deutlich, dass auch noch sehr geringe DNA-Spuren neben sehr hohen Signalen sicher detektiert werden können. Beispielsweise sind die Ziegesignale mit 0.57 bis 0.79 counts/s noch sehr gut neben den hohen Rindsignalen von 4.25 bis 9.35 counts/s zu erkennen.

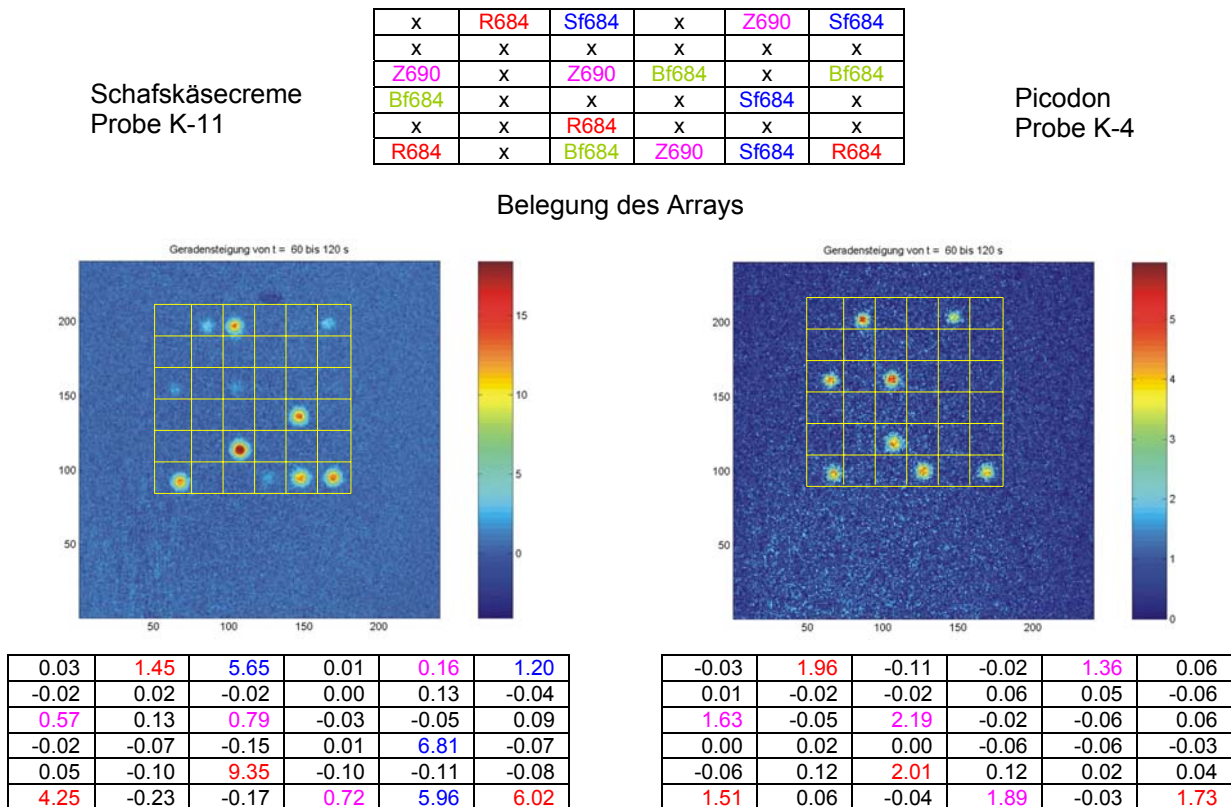


Abbildung 59: Messung von Käseproben K-11 (Schafskäsecreme) und K-4 (Picodon).

Es sind jeweils die Steigungsbilder und die korrigierten Steigungswerte der Proben gezeigt. Es wurden je 4 µl PCR-Produkt auf 120 µl Gesamtvolumen eingesetzt. Probe K-11 wurde bei 57 °C Annealingtemperatur mit 45 Zyklen amplifiziert, um Spuren von Ziegen-DNA mitzuerfassen. Probe K-4 wurde unter Standardbedingungen amplifiziert (60 °C, 35 Zyklen).

3.4.3.3 Messung von Proben aus der Forensik

Das Institut für Rechtsmedizin stellte verschiedene DNA-Spuren aus unterschiedlichen forensischen Ermittlungen und diverse Referenz-DNA zur Verfügung. Im Gegensatz zu den Lebensmittelproben gab es für diese Proben nur bedingt eine Referenzanalytik. In der Regel stand Referenz-DNA zur Verfügung. Die Realproben und die Referenz-DNA wurden mit dem DNA-Biosensor untersucht und alle Informationen Fallweise zusammengestellt.

Fall 1, Probe RM-7, Haarprobe aus einem Verkehrsunfall:

Ein hochwertiges KFZ erleidet einen Verkehrsunfall mit Totalschaden. Am Fahrzeug werden Haarspuren gefunden, die darauf hin deuten, dass der Unfall durch den Zusammenstoß mit einem Tier verursacht wurde. Die versicherungstechnische Frage war, ob ein Wildtier oder ein entlaufenes Nutztier (Verdacht: Ziege) Verursacher des Unfalls war. Von einem Jäger wird Referenzmaterial geliefert: Reh- und Hirschhaar, Reh- und Hirschblut, Ziegenspeichel, Ziegenhaar (Proben RM-1 bis RM-6). Die Referenz-DNA konnte nach Amplifikation jeweils richtig mit dem DNA-Biosensor bestimmt werden, wobei sich zeigte, dass das Hirschblut vom Damhirsch stammte, das Hirschhaar vom Rothirsch. Die Messung der Haarprobe aus dem Verkehrsunfall lieferte ein überraschendes Ergebnis. Es wurde Damhirsch als Hauptbestandteil mit Spuren von Reh gefunden. Erwartet wurde jedoch keine Mischprobe sondern eine einzige Spezies, da nur ein Tier Unfallverursacher sein kann (ggf. Kontamination der Probe durch Reh bei der Probennahme möglich). Zur Absicherung des Ergebnisses wurde die Probe auch mittels Sequenzierung des CytB-PCR-Produktes bestimmt, wobei nach Abgleich mit BLAST ebenfalls Damhirsch als Ergebnis erhalten wurde. Die Referenzanalytik im Institut für Rechtsmedizin wurde ebenfalls mittels Sequenzierung durchgeführt, lieferte bisher jedoch noch kein eindeutiges Ergebnis.

Fall 2, Probe RM-8, Gewebeprobe, Muskelfleisch:

Ein Mann tötet eine Frau mit einem Messer. An seiner Socke wurde eine Gewebespur, vermutlich Muskelfleisch gefunden. Die Pathologie stellte fest, dass weder dem Mann, noch der Frau ein entsprechendes Gewebeteil fehlte. Der Verdacht lag nahe, dass es sich um ein Lebensmittel handelt. Die Messung der Probe mit dem DNA-Biosensor lieferte als Ergebnis Schwein-DNA und bestätigte somit den Verdacht. Die Referenzanalytik beschränkte sich auf die Differenzierung zwischen Mensch und Tier. Mittels human-ACTBP2-PCR konnte ein negatives Ergebnis für Mensch geliefert werden, wobei es hierbei nicht möglich ist, zu entscheiden, ob die PCR auf Grund der Abwesenheit von menschlicher DNA negativ ist, oder ob zwar menschliche DNA vorliegt, diese aber für eine Amplifikation zu stark degradiert vorliegt.

Fall 3, Probe RM-9, Blutprobe:

Eine typische forensische Fragestellung ist die Untersuchung von Blutspuren. In diesem Zusammenhang sollte eine Blutprobe aus einer Blutlache untersucht werden. Dabei ist vorwiegend von Interesse, ob es sich um menschliches Blut handelt. Zu Aufklärungszwecken ist jedoch häufig bei tierischem Blut auch die Kenntnis der Spezies interessant. Mit dem Biosensor wurde die Blutprobe als nicht menschlich und darüber hinaus gleichzeitig als Schafblut identifiziert. Die Referenzanalytik bestimmte ebenfalls Mensch negativ (ACTBP2-PCR) und konnte serologisch ebenfalls die Spezies Schaf bestimmen.

Fall 4, Probe RM-10, Blutprobe:

Eine weitere Blutprobe (Blutspur an einem Turnschuh) wurde analysiert. In diesem Fall war bereits bekannt, dass es sich nicht um menschliches Blut handelte, sondern um das Blut eines Tieres. Die Spezies sollte bestimmt werden, um Hinweise auf einen Täter zu gewinnen. Auch diese Blutprobe stellte sich nach Messung mit dem DNA-Biosensor als Schafblut heraus. Eine serologische Bestimmung der Spezies in der Referenzanalytik war nicht möglich.

Fall 5, Probe RM-11, Gewebeprobe aus Erbrochenem:

Ein Säugling war verstorben. In einer Spur von Erbrochenem an einem Kleidungsstück des Kindes wurde eine Gewebeprobe entnommen. Starb der Säugling, weil er mit für ihn nicht geeignetem Fleisch gefüttert wurde? Diese Probe konnte in der CytB-Konsensus-PCR nicht amplifiziert werden, da die DNA offensichtlich schon zu stark degradiert war. Somit konnte keine Messung erfolgen. In der Referenzanalytik war eine immunologische Bestimmung der Probe ebenfalls nicht möglich.

Referenz-DNA Hunde-Speichel:

Die Analyse von Hund-DNA ist beispielsweise interessant im Zusammenhang mit Untersuchungen an Bisswunden lebender Menschen (Wundabrieb), bzw. bei Tierfraß an Toten (hier auch Vergleich mit Ratte). Auch als Verursacher von Verkehrsunfällen kommen Hunde in Frage. Da eine Realprobe aus einer forensischen Ermittlung mit Verdacht auf Hund leider nicht vorlag, wurden Messungen mit DNA aus Hundespeichel durchgeführt. Die klaren Ergebnisse zeigen, dass bei Bedarf der SONDENSATZ leicht um weitere Spezies erweitert werden kann.

Tabelle 9 fasst die Ergebnisse der Analyse der Forensikproben zusammen.

Tabelle 9: Analyse von Forensikproben.

Sonde	RM-2	RM-6	RM-7	RM-8	RM-9	RM-10	Hundespeichel
Rh629	-	-	-	-	0.35	0.37	-
Ha709	-	-	-	-	-	-	-
Hu690	-	-	-	-	-	-	8.86
Re629	16.23	-	1.63	-	-	-	-
Dh690	-	10.26	10.38	-	-	-	-
Me684	-	-	-	-	-	-	-
Sf684	-	-	-	-	9.61	10.82	-
Ka686	-	-	-	-	-	-	-
R684	-	-	-	-	-	-	-
Z690	-	-	-	-	-	-	-
Pf684	-	-	-	-	-	-	-
S566	-	-	-	3.02	-	-	-

Es ist jeweils nur der Steigungswert am zentralen Spot des Arrays in counts/s gezeigt. Werte, die unterhalb des cut-off von 0.2 counts/s lagen sind nicht dargestellt

Abbildung 60 zeigt beispielhaft Ergebnisse für einige Forensikproben.

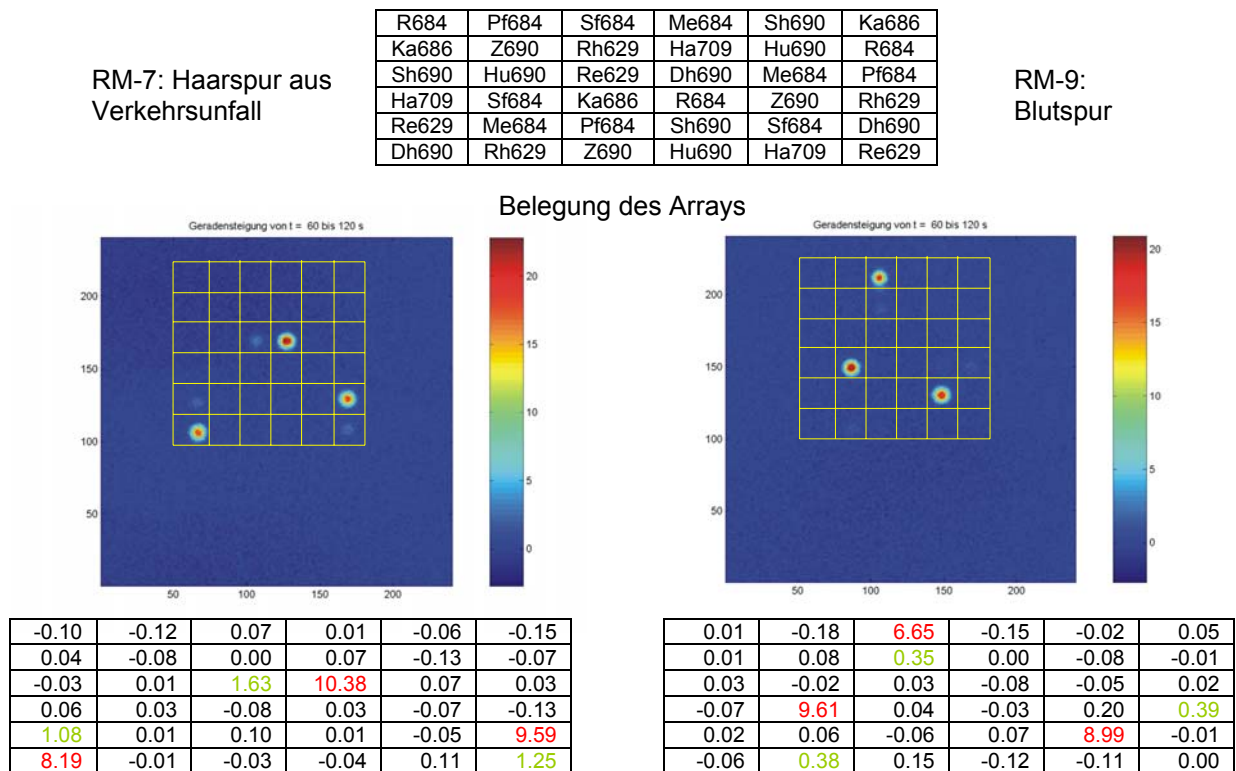


Abbildung 60: Messung von Realproben aus der Forensik.

Es sind jeweils die Steigungsbilder und die korrigierten Steigungswerte der Proben gezeigt. Es wurden je 4 µl PCR-Produkt auf 120 µl Gesamtprobenvolumen eingesetzt.

Die Haarspur RM-7 wurde als Damhirsch identifiziert, aber es sind geringe Beimengungen Reh (1.08 – 1.63 counts/s) zu sehen (event. Kontamination). Die Blutspuren stammen beide von Schafblut. Weiterhin findet man die bekannte schwache Kreuzhybridisierung von Schaf an die Rothirschsonde Rh629 (0.35 – 0.39 counts/s).

Die Beispiele zeigen, dass mit dem DNA-Biosensor auch Proben gemessen werden konnten, die in schlechterer Reinheit oder teilweise degradiert vorlagen, solange die DNA noch in der PCR amplifiziert werden konnte. Auch das Messen von DNA aus Haar- und Speichelproben war möglich. Bisher waren mit dem Biosensor im wesentlichen Proben aus Muskelfleisch oder Lebensmitteln gemessen worden, aus denen die DNA relativ aufwändig unter Verwendung von Reinigungskits isoliert worden war.

3.4.4 Charakterisierung des neuen DNA-Biosensor-Chipreaders

Der neue DNA-Biosensor-Chipreader wurde ebenfalls auf der Basis des biologischen Modellsystems Tierartendifferenzierung charakterisiert und mit dem alten DNA-Biosensor-Chipreader verglichen. In Abbildung 61 ist exemplarisch eine Kalibrationsgerade für Rind-Target gezeigt.

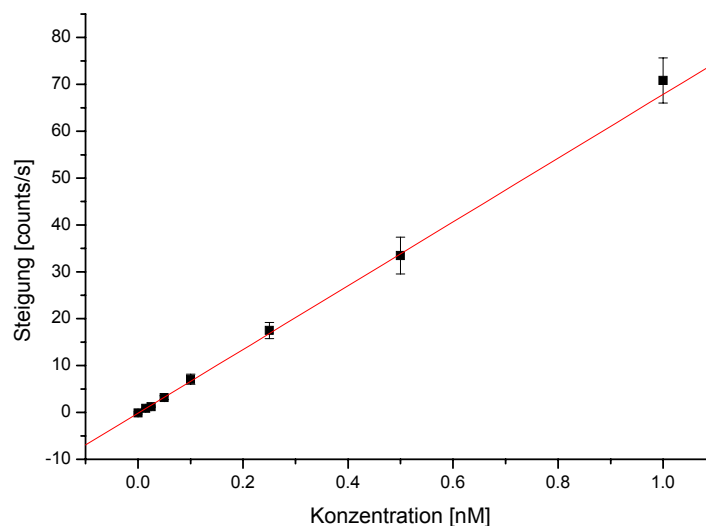


Abbildung 61: Kalibration mit Rind-Target am neuen DNA-Biosensor-Chipreader.

Die Fehlerbalken beziehen sich auf eine Dreifachmessung jeder Probe.

Die Linearität in den Kalibrationen war sehr gut und die Fehlerbalken gering. Im Mittel betrug der Variationskoeffizient 10 % des Steigungssignals, verglichen mit 5 % beim alten DNA-Chip-Gerät. Auf der Basis der dreifachen Standardabweichung wurde eine Nachweisgrenze von 5 - 10 pM bestimmt, während die Nachweisgrenzen beim alten Gerät im Bereich 10 – 20 pM lagen. Mit dem neuen Gerät ließen sich demnach geringfügig kleinere DNA-

Konzentrationen als beim alten Gerät noch sicher detektieren, da die Empfindlichkeit des Messsystems auf Grund des stärkeren Lasers und der empfindlicheren CCD-Kamera gesteigert wurde. Weitere Optimierungen (z.B. des Fließsystems) bieten Spielraum für die Detektion noch wesentlich geringerer Konzentrationen an DNA.

Die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse wurde mit den Modelltargets an Rind- und Huhn-Spots untersucht (Abb. 62). Während der hier betrachteten 7 Messungen blieben die Signale fast gleich. Beispielsweise betrug die relative Standardabweichung an den Huhnsspots im Mittel 8 %. Im Vergleich dazu betrug die mittlere Standardabweichung bei 7 Messungen an Huhn-Spots beim alten Gerät 4 %. Die geringfügig schlechtere Reproduzierbarkeit der Messungen ist wahrscheinlich mit der automatisierten Probennahme zu erklären. Die Messlösungen wurden auf Grund ihrer hohen Viskosität nicht immer unter identischen Bedingungen über den Chip gesaugt. Hier besteht noch Optimierungsbedarf, was zu besserer Reproduzierbarkeit führen sollte.

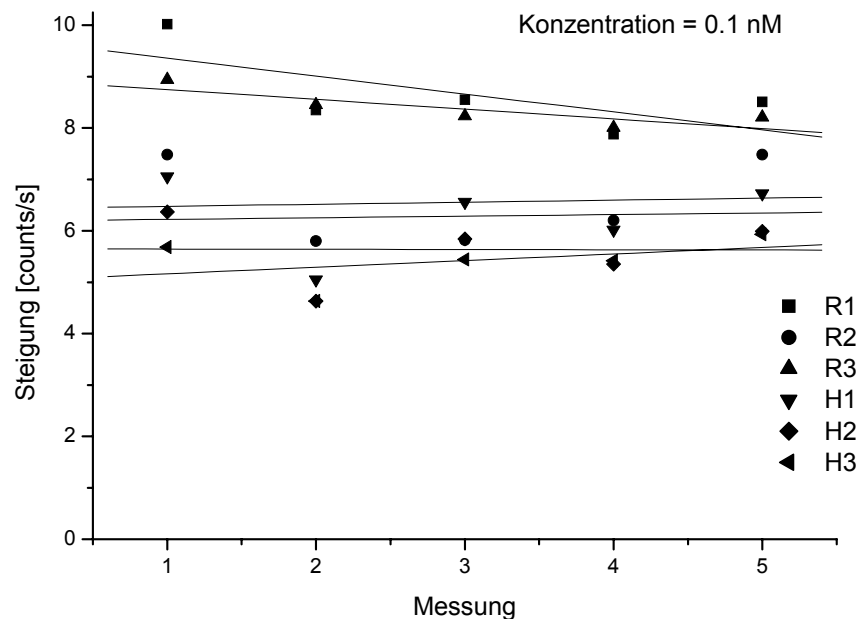


Abbildung 62: Reproduzierbarkeit der Messergebnisse über 7 Messungen an Rind- (R1-R3) und Huhnsspots (H1-H3) am neuen DNA-Biosensor-Chipreader.

Es wurde eine Lösung mit 0.1 nM Huhn- und Rind-DNA gemessen.

Das neue DNA-Biosensorgerät zeigte ein ähnliches Ausleuchtungsprofil, wie das alte Gerät. Auch hier befanden sich systembedingt nicht alle Spots im Zentrum des Laserfokus, so dass die Signalintensität von der Lage der Spots im Array abhing. Abbildung 63 zeigt das charakteristische Ausleuchtungsprofil. Innerhalb eines typischen 6x6-Arrays sanken die Signalsteigungen am Rand auf bis zu 39 % des maximalen Steigungswertes im Zentrum des Arrays ab.

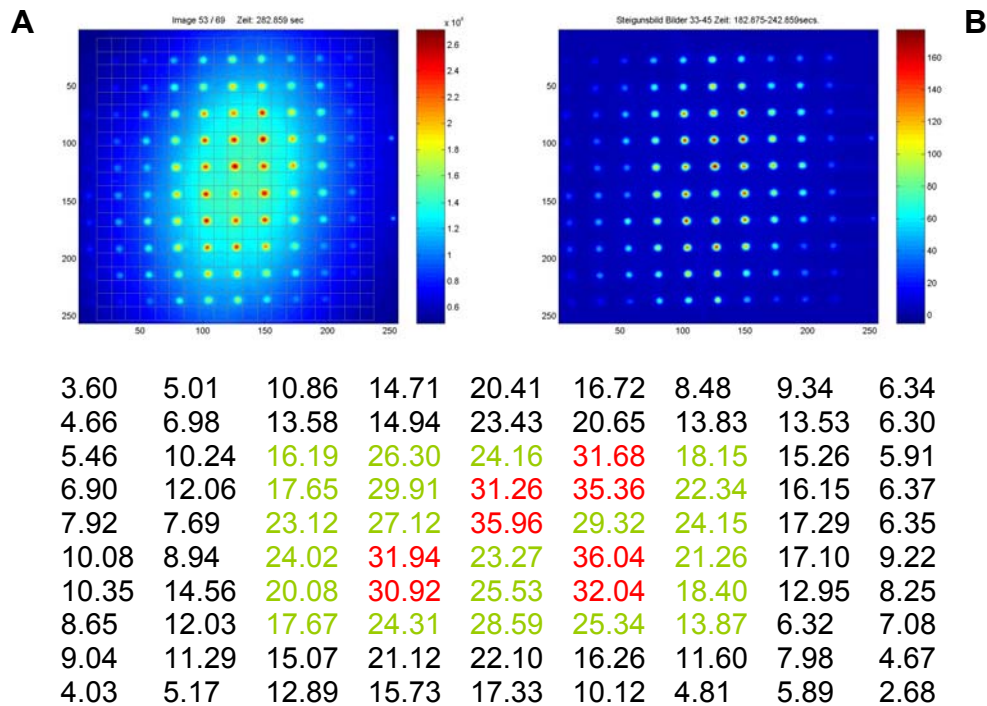


Abbildung 63: Ausleuchtungsprofil des neuen DNA-Biosensor-Chipreaders.

Oben: Typisches End (A)- und Steigungsbild (B) mit Spotabstand 1 mm. Unten: Ergebnismatrix, der Bereich in dem ein typisches 6x6-Array (Spotabstand 0.7 mm) liegt ist grün markiert. Die maximalen Steigungswerte (rot) liegen im Zentrum des Arrays.

Es wurde schließlich gezeigt, dass auch der neue DNA-Biosensor-Chipreader für die Analyse typischer PCR-Produkte geeignet ist. Sowohl Referenz-DNA, als auch Realproben-DNA ließen sich erfolgreich untersuchen. Im Folgenden (Abb. 64) ist exemplarisch das Ergebnis einer Realprobe (Thüringer Mett vom Schwein) gezeigt. Zu sehen ist hier erneut die Problematik mit der alten Ziegelsonde, die eine Kreuzhybridisierung mit der Schwein-DNA zeigte, während die neue Sonde Steigungswerte unterhalb des cut-offs von 0.2 counts/s zeigte.

Weiterhin ist zu erkennen, dass das Steigungsbild keinen sehr einheitlichen Hintergrund besitzt, sondern ein diagonales Wellenprofil aufweist. Dieses Phänomen wurde immer wieder gefunden, wobei sich die Art und Ausrichtung des Wellenprofils ändert. Vermutlich sind Interferenzmuster für den Hintergrund verantwortlich, die sich aus dem Zusammenspiel von Einstrahlwinkel und Brechungsindices von Glasprisma und Glaschip ergaben.

Zusammenfassend ergibt sich, dass der neue Chipreader schon sehr gut einsetzbar ist und etwas empfindlicher messen kann, als das alte Gerät. Die erhoffte deutliche Verbesserung der Empfindlichkeit durch Wahl leistungsstärkerer Komponenten wurde auf Grund des ebenfalls erhöhten Hintergrundes nicht erreicht. Die automatisierte Probenaufgabe brachte

jedoch eine große Zeitersparnis mit sich und machte den Umgang mit dem Gerät insgesamt einfacher. Weitere Optimierungen des Fließsystems und der Optik sollten zu noch besseren Messergebnissen führen.

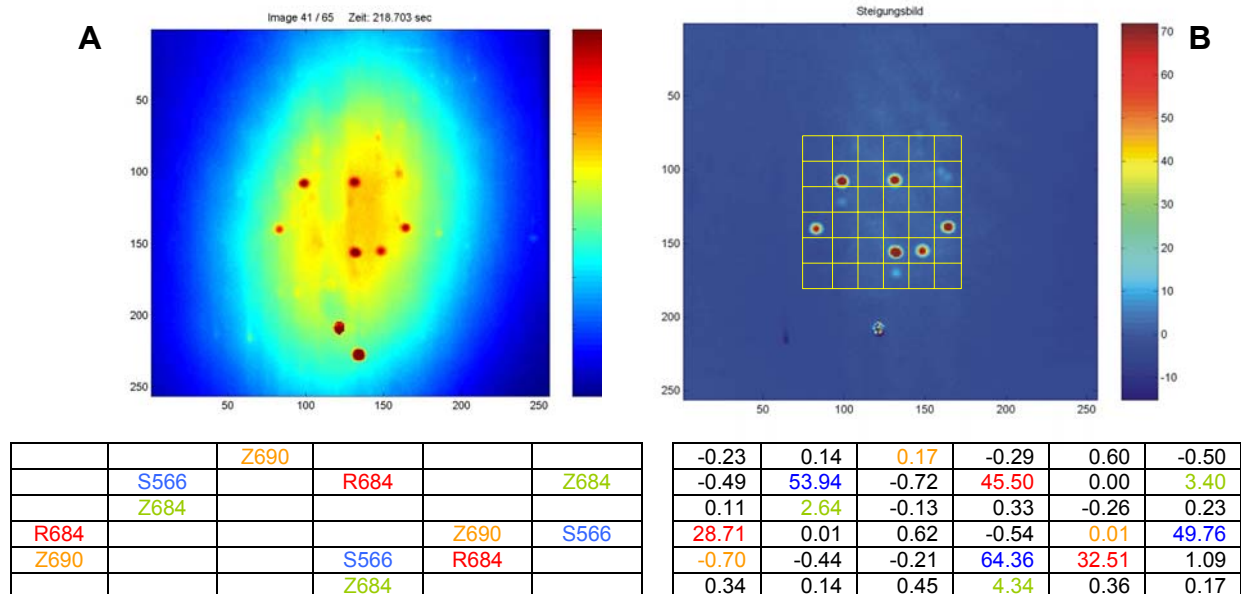


Abbildung 64: Messung einer Realprobe am neuen DNA-Biosensor-Gerät

A: Endbild, B: Steigungsbild, unten: Belegung des Arrays und korrigierte Steigungswerte.

Es wurde Probe F-13 (Thüringer Mett vom Schwein) mit 4 µl PCR-Produkt auf 120 µl Gesamtvolumen gemessen. Die Probe enthielt Schwein und Rind. Die alte Ziegesonde (Z684, grün) zeigt hier die bekannte Kreuzhybridisierung mit Schwein-DNA, während die neue Ziegesonde (Z690, orange) keine Kreuzhybridisierung aufweist. Die anderen Positionen im Array waren mit weiteren Tierarten belegt.

3.5 Tierartendifferenzierung mit konventioneller DNA-Chiptechnologie

Die Methode der Tierartendifferenzierung mit dem neu entwickelten Satz an Sonden wurde im Folgenden auch auf konventionelle DNA-Chips übertragen. Dazu wurde zunächst die Spezifität der neuen Sonden unter den etwas anderen Bedingungen, nämlich der bis zum Gleichgewicht durchgeführten Hybridisierung, getestet. Im Anschluss wurden exemplarisch einige Realproben analysiert.

3.5.1 Spezifität der Sonden

Die neuen und einige der alten Sonden wurden jeweils mit der passenden Referenz-DNA und mit Referenz-DNA diverser anderer Spezies auf ihre Hybridisierungseigenschaften mit dem passenden Target und eventuelle Kreuzhybridisierungen getestet. Folgende Sonden wurden untersucht:

- Wildtiere: Dh690, Sh690, Re690, Re629, Rh629, Ka686, Ha709
- Nutztiere: Z690, Sf684, R684, Pf684, S566, H684, Bf690
- Sonstige: Me684, Hu690

Insgesamt konnten zufrieden stellende Ergebnisse mit den neuen Sonden erzielt werden, obwohl auf den konventionellen Chips auf Grund der Endpunktsbestimmung allgemein etwas mehr Kreuzhybridisierungen auftraten. Dies war zu erwarten und ist typisch für die Methode. Die Kreuzhybridisierungen waren jedoch sämtlich so gering, dass sie die Messung der Proben nicht beeinträchtigten. Im Folgenden werden diese Kreuzhybridisierungen kurz erläutert.

Das Mensch-PCR-Produkt zeigte unerwarteter Weise eine Kreuzhybridisierung an der Pferdsonde (Pf684), wobei durch Mensch-DNA 3.1 % Pferdsignal vorgetäuscht wurde. Diese Kreuzhybridisierung war zuvor im DNA-Biosensor nicht aufgetreten. Auch mit dem Pferd-PCR-Produkt wurden zwei unerwartete Kreuzhybridisierungen gefunden, sowohl an der alten Rothirschsonde Rh690 (bzw. der neuen Sikahirschsonde Sh690) von 3.1 %, als auch an der Schweinsonde von 5.5 %. Mit Schaf-PCR-Produkt wurde die bekannte Kreuzhybridisierung an Rh629 wiedergefunden, die hier 3.3 % bezogen auf das Schafsinal betrug. Weiterhin zeigte Schaf-DNA auch eine Kreuzhybridisierung an der Ziegesonde (1.1 %) und an der Büffelsonde (2.3 %), die im Biosensor nicht gefunden wurden.

Abbildung 65 macht deutlich, dass zwar mehr Kreuzhybridisierungen, als beim DNA-Biosensor auftraten, dass diese jedoch alle deutlich unter 10 % des Target-Signals lagen. Kreuzhybridisierungen in dieser geringen Größenordnung sind für die Methode der konventionellen Chiphybridisierung vergleichsweise sehr gering und sind darauf zurück zu führen, dass die gewählten Standardhybridisierungsbedingungen nicht für alle Sonden gleich optimal sind. Es empfiehlt sich daher, wie auch beim Biosensor, einen cut-off Wert einzuführen. Auf Grund der Erfahrungen mit den Messungen wurde ein cut-off von 500 counts gewählt. Alle Signale, die unter diesem cut-off lagen werden demnach nicht als positiv bewertet. Von den beobachteten Kreuzhybridisierungen befanden sich dann nur noch die des Pferd PCR-Produkts an die Schweinsonde S566 (725 counts) und an die Rothirschsonde Rh629 (1540 counts) deutlich über dem cut-off Wert. Die anderen Kreuzhybridisierungen lagen an, bzw. deutlich unterhalb der Nachweisgrenze von 500 counts.

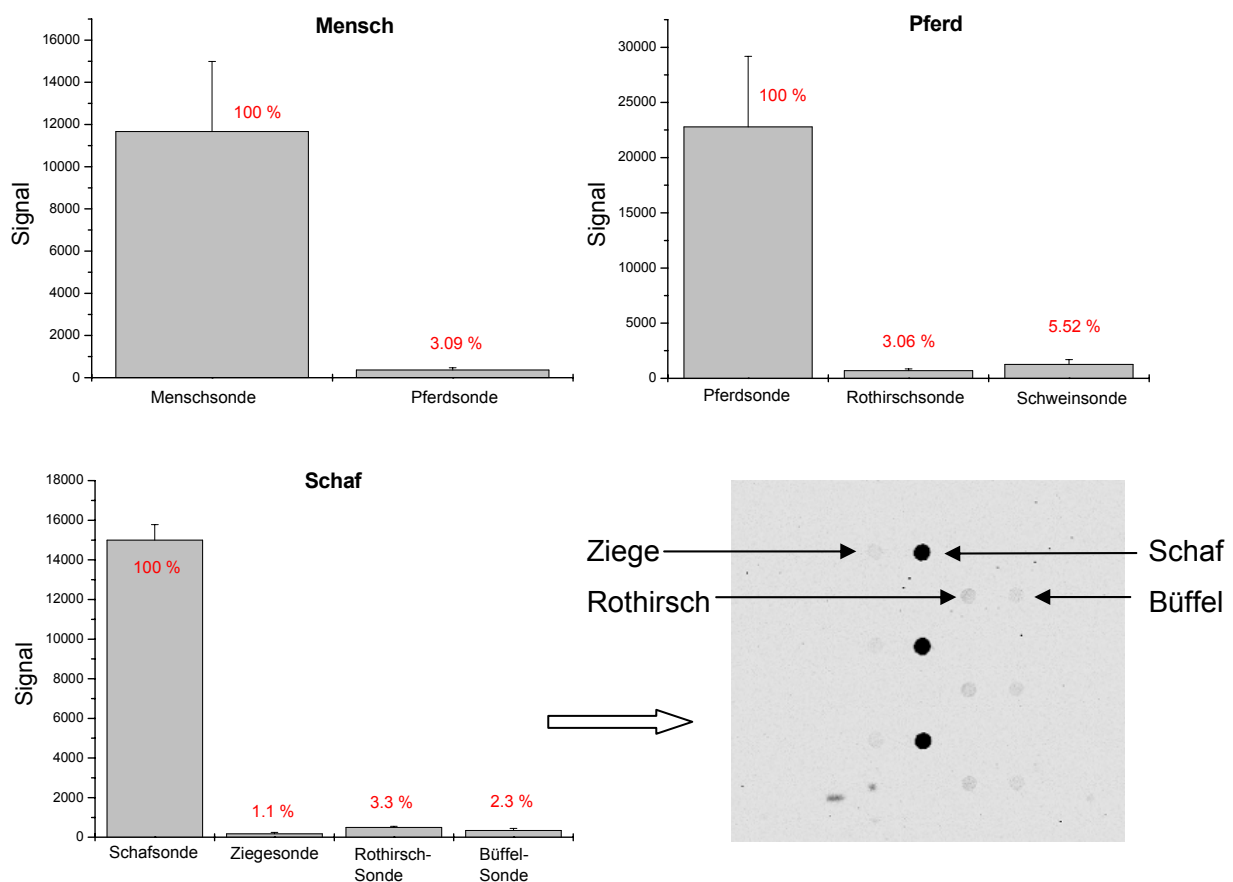


Abbildung 65: Spezifität der Sonden auf konventionellen Chips.

Die Grafiken zeigen die Kreuzhybridisierungen in % bezogen auf das Signal des passenden Targets. Jede Sonde war dreimal pro Array bei 4 Arrays pro Metaarray gespottet. Die Fehlerbalken beziehen sich auf die Auswertung aller 12 Spots pro Sonde. Unten rechts ist das Bild des Arrayscanners der Schafprobe gezeigt, wobei nur der Ausschnitt eines Arrays gezeigt ist. Es wurden jeweils $3.25 \mu\text{l}$ PCR-Produkt bei $13 \mu\text{l}$ Gesamtprobenvolumen auf den Chip gegeben. Der Formamidgehalt betrug 37.5 %.

Die Reh und Rothirschsonden an den Positionen 690 (erste Sondenentwicklung) und 629 (zweite Sondenentwicklung) wurden vergleichend auch auf konventionellen Chips getestet. Es zeigte sich erneut, dass die neuen Sonden deutlich bessere Hybridisierungseigenschaften besitzen. Die alte Rehsonde Re690 zeigte bei der gewählten Stringenz nur 2.6 % des Signals der neuen Rehsonde Re629. Die alte Rothirschsonde Rh690 zeigte ebenso nur 5.1 % des Signals der neuen Rothirschsonde Rh629. Eine zu vernachlässigende Kreuzhybridisierung von 0.6 % des Reh-PCR-Produktes an die neue Rothirschsonde trat auf. Demnach waren die neuen Sonden auch auf konventionellen Chips deutlich besser zur Detektion der Ziel-DNA geeignet (Abb. 66).

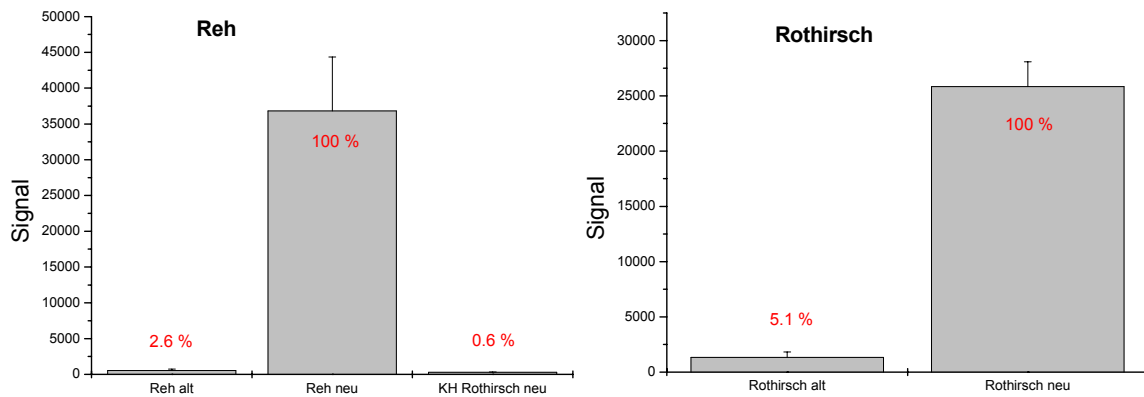


Abbildung 66: Spezifität der Reh- und Rothirschsonden auf konventionellen Chips.

Kreuzhybridisierungen in % bezogen auf das Signal des passenden Targets. Die Fehlerbalken beziehen sich auf die Auswertung aller 12 Spots pro Sonde. Es wurden jeweils $3.25 \mu\text{l}$ PCR-Produkt bei $13 \mu\text{l}$ Gesamtprobenvolumen auf den Chip gegeben. Der Formamidgehalt betrug 37.5 %.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die neuen Sonden trotz einiger geringer Kreuzhybridisierungen gut für Messungen auf konventionellen DNA-Chips geeignet sind.

3.5.2 Messung von Realproben auf konventionellen Chips

Diverse Realproben aus der Käsethematik und der Forensik wurden mit den neuen Sonden auf konventionellen DNA-Chips gemessen. Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der Analyse der Käseproben verglichen mit dem Biosensor.

Tabelle 10: Messung von Käseproben auf konventionellen DNA-Chips.

Nr.	Probe	Befund DNA-Chips	Befund Biosensor	Übereinstimmung
K-4	Picodon	Ziege, Rind	Ziege, Rind	100 %
K-5	Ziegenfeta	Ziege, Büffel, Rothirsch	Ziege, Büffel	66 %
K-7	Mozzarella	Büffel	Büffel	100%
K-9	Feta aus Schaf- und Ziege	Schaf, Ziege, Rind	Schaf, Ziege, Rind	100%
K-11	Schafskäsecreme	Rind, Schaf, Ziege	Schaf, Rind, Ziege	100%
K-12	Schafskäse	Rind	Rind	100%
K-13	spanischer Schafskäse	Schaf	Schaf	100%
K-14	Ziegenkäse	Ziege, Rind, Schaf	Ziege, Rind, Schaf	100%

Bei der Auswertung der Chips mussten die bekannten Kreuzhybridisierungen des Schaf-PCR-Produktes berücksichtigt werden, die etwa 1 % Ziege-, 2 % Büffel- und 3 % Rothirschsignal bezogen auf das Schafsignal ausmachen können. Es zeigte sich aber, dass diese Kreuzhybridisierungen bei der Messung der Realproben keine Rolle spielten, da die Signale zu gering waren und deutlich unter dem cut-off-Wert von 500 counts lagen. Der Vergleich mit den Ergebnissen des Biosensors und der Referenz-Analytik des CVUA zeigte, dass die Proben im Wesentlichen richtig bestimmt wurden. Nur bei Probe K-5 wurde ein

unerwartet hohes Rothirschsignal gefunden, obwohl keine Schaf-DNA in der Probe vorhanden war. Da diese Kreuzhybridisierung bei anderen Proben jedoch nicht auftrat kann es sich hier nur um eine Kontamination der Probe handeln. Im Folgenden sind die Ergebnisse für eine Käseprobe (K-9, Feta aus Schafs- und Ziegenmilch) gezeigt (Abb. 67). Schaf wurde als Haupt- und Ziege als Nebenkomponekte bestimmt. Weiterhin konnte auch die nur als Spur vorhandene Rind-DNA nach Amplifikation unter Standardbedingungen (60 °C Annealing, 35 Zyklen) direkt richtig bestimmt werden. Im DNA-Biosensor konnte Rind erst nach Amplifikation der Probe unter weniger stringenten Bedingungen detektiert werden. Die höhere Empfindlichkeit der Methode ist auf die Endpunktshybridisierung zurück zu führen. Die beobachtete Kreuzhybridisierung an der Rothirschsonde Rh629 lag mit 251 counts deutlich unter dem cut-off Wert.

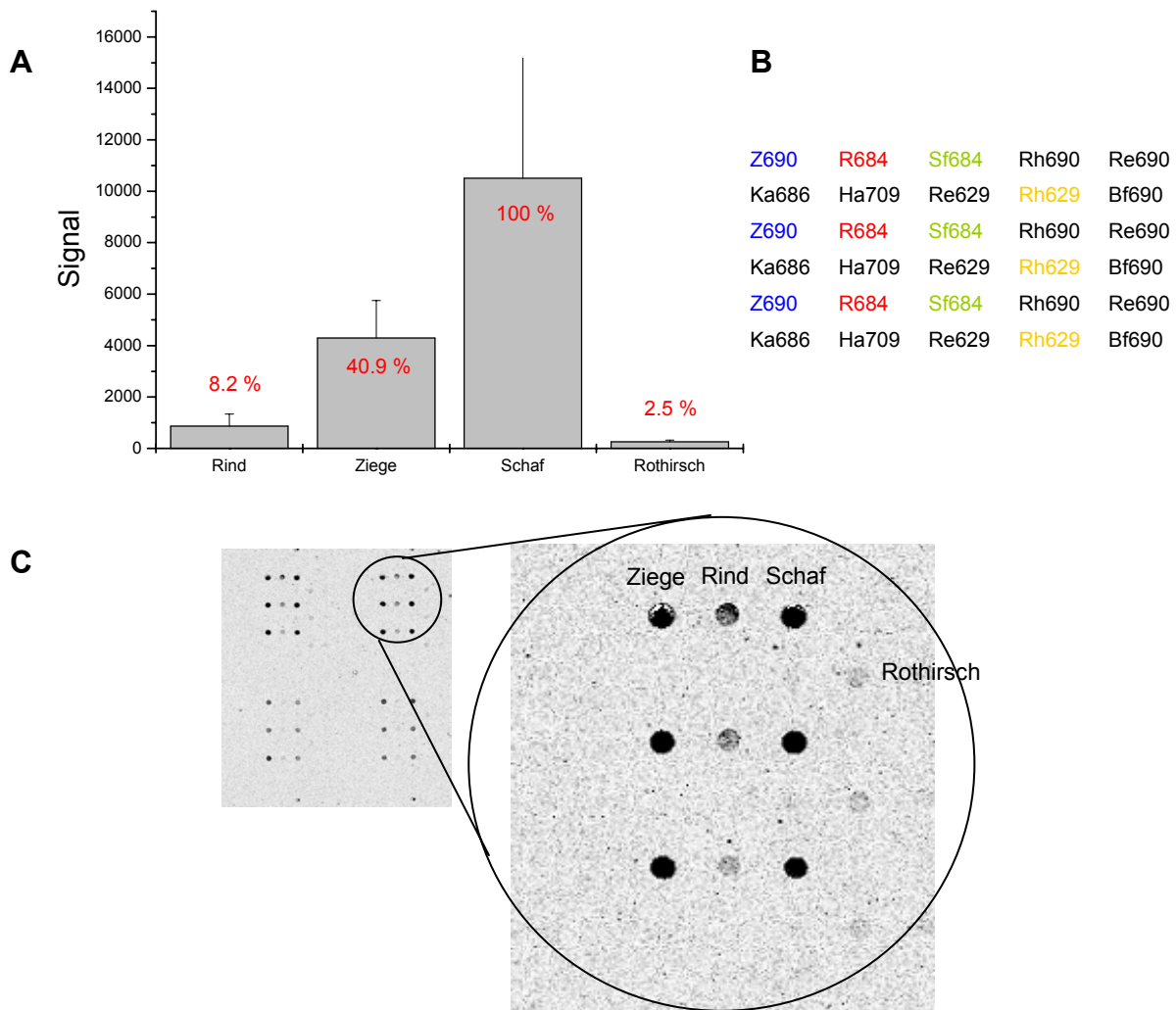


Abbildung 67: Messung einer Käseprobe auf konventionellen DNA-Chips.

Es wurden 3.25 μ l Probe auf 13 μ l Gesamtvolumen bei 37.5 % Formamidgehalt auf dem Chip hybridisiert. Die Grafik zeigt die Signale an den verschiedenen Sonden in % (A), die Belegung des Arrays (B) und das Bild des Arrayscanners (C).

Die Messung der Forensik-Realproben war ebenfalls erfolgreich. Die Proben wurden alle in Übereinstimmung mit dem Biosensor bestimmt (Tab 11). Die bekannten Kreuzhybridisierungen waren zum Teil zu sehen, insbesondere an der Pferdsonde Pf684. In der Regel lagen sie jedoch unter dem cut-off Wert.

Tabelle 11: Analyse von Forensikproben.

Sonde	RM-7	RM-8	RM-9	RM-10	Hundespeichel
R684	-	-	-	-	-
Z690	-	-	-	-	-
Sf684	-	-	18551	14642	-
Ka686	-	-	-	-	-
Ha709	-	-	-	-	-
Hu690	-	-	-	-	20743
Me684	-	-	-	-	-
Re629	877	-	-	-	-
Rh629	-	-	-	-	-
Dh690	7903	-	-	-	-
S566	-	43108	-	-	-
Pf684	-	749	586	-	-

Gezeigt ist jeweils der Mittelwert aller 12 Spots eines Metaarrays in counts. Signale unter dem cut-off von 500 counts nicht dargestellt.

3.6 Anwendung der neuen *spiro*-Cyanine in der DNA-Analytik

Die neuen *spiro*-Cyaninfarbstoffe wurden exemplarisch in der DNA-Analytik (am DNA-Biosensor und auf konventionellen DNA-Chips) eingesetzt. Anwendungsbeispiel war das biologische Modellsystem der Tierartendifferenzierung, das zuvor ausführlich ausgearbeitet wurde. Es wurden die in Kapitel 3.2.2 beschriebenen Konjugate verwendet: Damhirsch-PCR-Produkt, das nach Einbau von Aminoallyl-dUTP mit dem als NHS-Ester vorliegenden Farbstoff „Pip“, einem neuen Piperidylcyanin, markiert wurde. Vergleichend wurden PCR-Produkte gemessen, die auf dieselbe Weise mit Cy5 bzw. mit Oy656 markiert wurden.

3.6.1 Messung der *spiro*-Cyanine am DNA-Biosensor

Lösungen der folgenden drei Damhirsch-DNA-Farbstoff-Konjugate wurden am DNA-Biosensor vergleichend gemessen (Tab. 12).

Tabelle 12: Farbstoff-DNA-Konjugate für Messungen am DNA-Biosensor.

Nr.	Farbstoff	c (DNA)	c (Farbstoff)	Markierungsgrad
1	Cy5	67.5 nM	788 nM	11.7 (100 %)
2	Oy656	50.2 nM	134 nM	2.7 (23 %)
3	Pip	71.7 nM	233 nM	3.2 (27 %)

Die Lösungen wurden zunächst auf die gleiche DNA-Konzentration (1 nM) eingestellt und dann am DNA-Biosensor gemessen. Danach wurden Lösungen mit gleicher Farbstoffkonzentration (5 nM) hergestellt und ebenfalls gemessen. Abbildung 68 zeigt jeweils die Steigungswerte an den Damhirschspots für die drei verschiedenen Farbstoffe. Der Vergleich der Farbstoffe zeigte, dass der Piperidylfarbstoff Pip bei der eigentlichen Hybridisierung und Detektion im Biosensor ähnlich gute Ergebnisse lieferte, wie Cy5.

Eine Gegenüberstellung der Steigungswerte der Messungen mit gleicher DNA-Konzentration zeigte, dass Pip immerhin 42 % der Steigungswerte von Cy5 lieferte, obwohl der Markierungsgrad nur 27 % im Vergleich zum Cy5-Konjugat betrug. Die höheren Steigungswerte von Cy5 waren somit nur auf den deutlich höheren Markierungsgrad zurückzuführen. Oy656 zeigte sehr geringe Steigungswerte (14 % bezogen auf Cy5), die geringer waren, als der Markierungsgrad von 23 % im Vergleich zum Cy5-Konjugat vermuten ließ.

Die Messungen mit gleicher Farbstoffkonzentration ermöglichten einen Vergleich der Farbstoffe unabhängig vom Markierungsgrad. Hier zeigte sich, dass Pip ebenso gute Ergebnisse lieferte wie Cy5, Oy656 jedoch nur 32 % der Steigung von Pip aufwies. Pip zeigte sich damit für Messungen im Biosensor ebenso gut geeignet wie Cy5, höhere Markierungsgrade sollten die Ergebnisse noch verbessern. Oy656 lieferte nur sehr schlechte Signale bei Biosensor-Messungen und ist wenig geeignet.

Positiv ist weiterhin zu vermerken, dass es auch mit den *spiro*-Farbstoffen nicht zu unerwarteten Kreuzhybridisierungen durch unspezifische Wechselwirkungen kam. Auffällig ist jedoch, dass die Steigungswerte bei den Messungen dieser PCR-Produkte insgesamt relativ niedrig waren, obwohl die Markierungsgrade höher waren als bei der üblichen Markierung mittels Fluorophor-markiertem Primer. Die höheren Markierungsgrade könnten schon zu einem gewissen Quenching führen. Weiterhin ist es möglich, dass die

Hybridisierung beim Vorhandensein mehrerer Farbstoffmoleküle am DNA-Molekül (hier auch im Mittleren Bereich des PCR-Produktes, nicht nur am Ende) gehemmt ist. Es ist bekannt, dass kovalent gebundene Fluorophore den Schmelzpunkt von Duplex-DNA herabsetzen können.

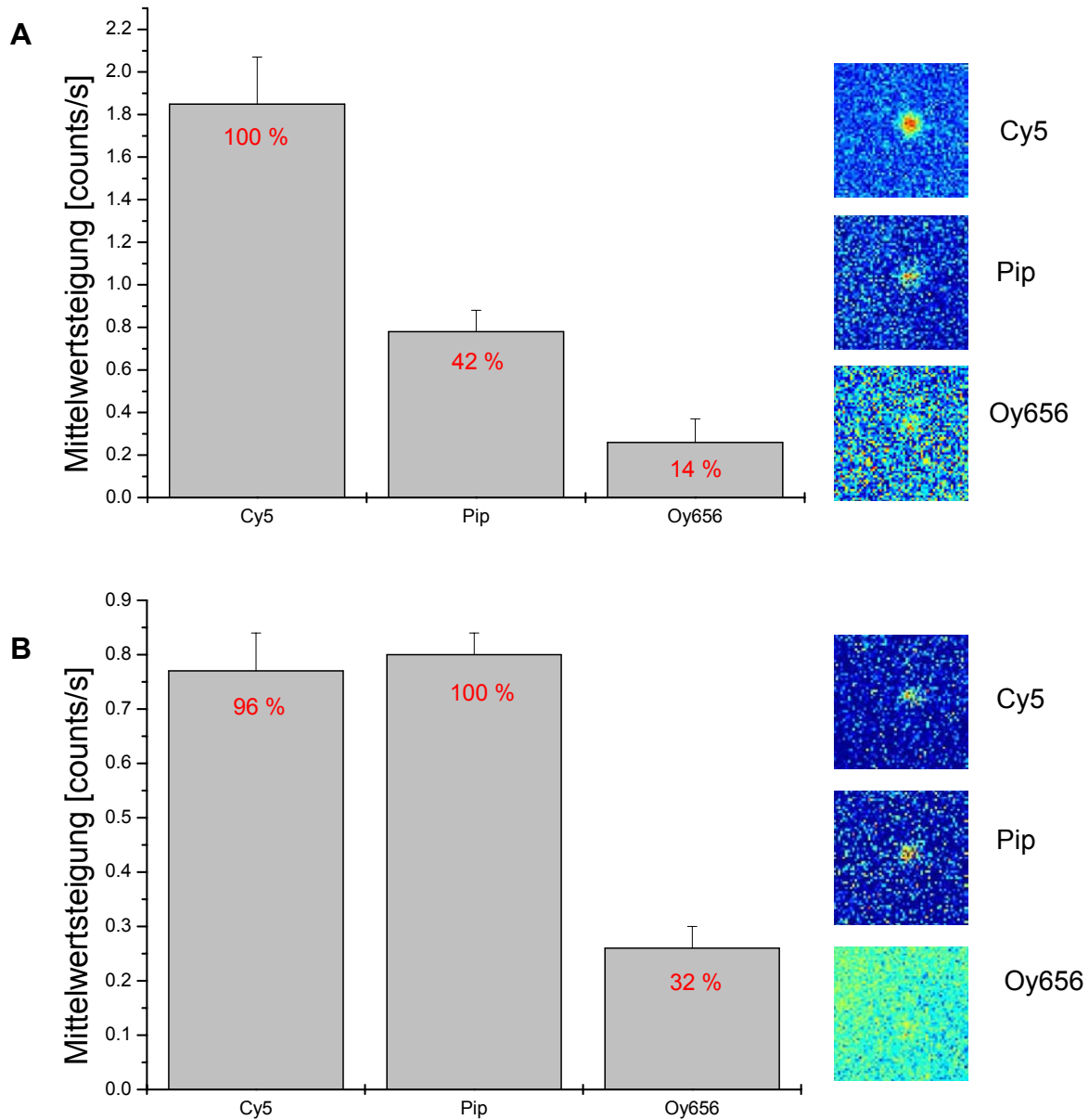


Abbildung 68: Vergleich der Steigungswerte bei Messung von DNA-Konjugaten verschiedener Farbstoffe am DNA-Biosensor.

Jede Lösung wurde einmal auf einem 6x6 Array mit 3 Damhirschspots gemessen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der Steigungen einer Messung über alle drei Damhirschspots für jeden Farbstoff. A zeigt die Messung mit Lösungen gleicher DNA-Konzentration (1 nM), B die Messungen mit Lösungen gleicher Farbstoff-Konzentration (5 nM). Nebenstehend ist jeweils ein Damhirschspot des Arrays der einzelnen Messungen abgebildet (Ausschnitt des Steigungsbildes).

3.6.2 Messung der *spiro*-Cyanine auf konventionellen DNA-Chips

Die in Tabelle 12 charakterisierten Konjugate wurden auch auf konventionellen DNA-Chips vergleichend gemessen. Dazu wurden erneut sowohl Lösungen mit gleicher DNA-Konzentration (15 nM) als auch gleicher Farbstoffkonzentration (40 nM) hergestellt und auf die Chips gegeben. Die Intensitäten der Damhirschspots sind in Abbildung 69 dargestellt.

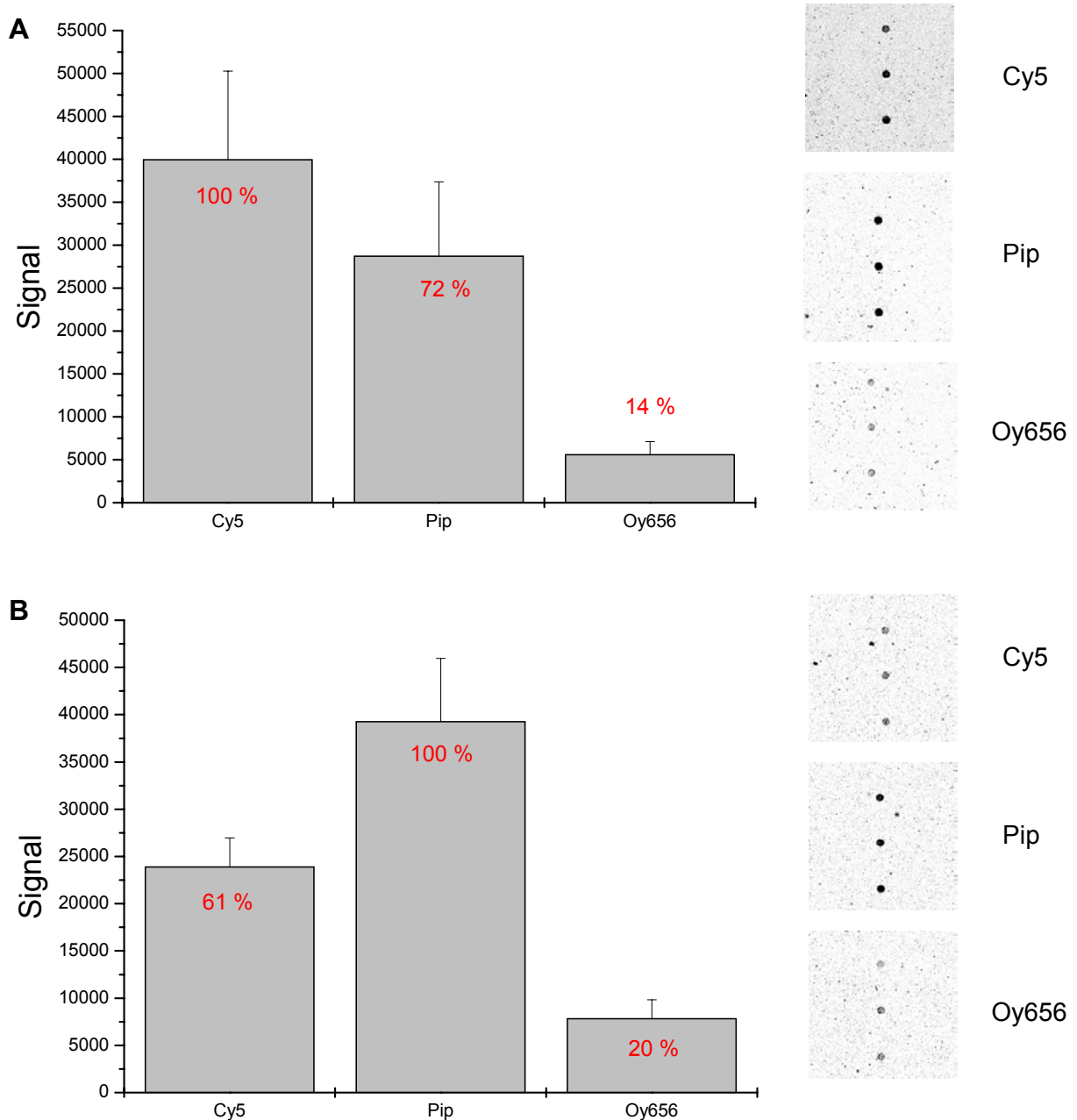


Abbildung 69: Vergleich verschiedener DNA-Farbstoffkonjugate auf konventionellen DNA-Chips.

Es wurde jeweils nur das Array innerhalb des größeren Metaarrays mit den höchsten Signalen ausgewertet. In den Graphiken ist der Mittelwert der Signale der drei Damhirschspots aufgetragen. A: Messungen mit gleicher DNA-Konzentration, B: Messungen mit gleicher Farbstoffkonzentration. Nebenstehend ist jeweils ein Array aus einem Metaarray der verschiedenen Messungen abgebildet.

Auch bei den konventionellen DNA-Chips zeigte sich, dass der neue Piperidylfarbstoff Pip sehr gut eingesetzt werden konnte. Bei Messungen mit gleicher DNA-Konzentration zeigte Pip trotz des geringeren Markierungsgrads noch 72 % des Signals von Cy5. Oy656 zeigte im Gegensatz dazu wiederum nur 14 % des Cy5-Signals. Messungen mit gleicher Farbstoffkonzentration lieferten diesmal für Pip sogar erheblich bessere Ergebnisse, als für Cy5, der hier nur 61 % des Fluoreszenzsignals von Pip erreichte. Oy656 lieferte nur 20 % des Pip-Signals. Betrachtet man die Messungen also unabhängig vom Markierungsgrad, so ist Pip auf konventionellen DNA-Chips deutlich besser geeignet, als Cy5. Höhere Markierungsgrade sollten zu noch besseren Empfindlichkeiten der Methode bei Verwendung von Pip im Vergleich zu Cy5 führen.

In Kapitel 3.2.3.2. wurde bei der Charakterisierung der Farbstoff-DNA-Konjugate bereits festgestellt, dass das Pip-Konjugat nach einfachem Aufspotten auf Objektträger im Vergleich zu den anderen Farbstoffen eine erhöhte Festphasenfluoreszenz zeigte. Die hier dargestellten Messungen zeigen, dass die ausserordentlich gute Festphasenfluoreszenz von Pip-Konjugaten auch bei einer echten Chip-Hybridisierung erhalten bleibt. Zusätzliche Kreuzreaktivitäten auf Grund unspezifischer Wechselwirkungen konnten auch hier mit den *spiro*-Farbstoffen nicht beobachtet werden. Die Signale waren in diesen Experimenten hoch bis sehr hoch und zeigten keine Hemmung der Hybridisierung, wie dies vermutlich im Biosensor der Fall war.

Für Anwendungen mit Fluoreszenzdetektion in fester Phase, wie z.B. die konventionellen Chipexperimente ist der neue Farbstoff Pip hervorragend geeignet.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden auf der Basis der Cyaninfarbstoffe der Oyster Serie neue *spiro*-Cyaninfluorophore synthetisiert. Die Charakterisierungen zeigten, dass vor allem die *spiro*-Piperidylcyaninstrukturen großes Potential für den Einsatz als Biomarker besitzen. Die neuen Fluoreszenzfarbstoffe wurden exemplarisch in der DNA-Analytik getestet, wobei sie sowohl in der konventionellen DNA-Chip-Technologie, als auch in einem neuen DNA-Biosensor eingesetzt wurden. Dazu wurde die Tierartendifferenzierung in der Lebensmittelanalytik und Forensik als biologisches Modellsystem gewählt. Durch spezifische Hybridisierung Fluorophor-markierter Proben-DNA mit spezifischen Sonden können parallel eine Vielzahl verschiedener Spezies detektiert werden. In dieser Arbeit wurde eine Reihe neuer Sonden entwickelt und getestet, mit denen dann eine Vielzahl von Realproben erfolgreich analysiert werden konnte.

Im Folgenden werden zunächst die entwickelten Synthesestrategien und die Eigenschaften der neuen Fluorophore diskutiert. Danach wird auf die DNA-analytische Tierartendifferenzierung in der Lebensmittelchemie und Forensik eingegangen und anschließend der Einsatz der neuen Fluorophore auf DNA-Chips und im Biosensor diskutiert.

4.1 Synthese und Charakterisierung der neuen Fluorophore

Die üblichen Fluorophore (Fluoresceine, Rhodamine, Cyanine etc.) zeigen als Konjugate mit Biomolekülen, insbesondere bei hohen Markierungsgraden, in wässriger Lösung eine hohe Tendenz zur Dimeren- bzw. Aggregatbildung. Damit bedeutet eine hohe Markerdichte am Biomolekül nicht notwendigerweise auch eine höhere Sensitivität der Probe [191]. Auch die freien Farbstoffe in höher konzentrierten wässrigen oder alkoholischen Lösungen, oder in Lösungen mit hoher Salzkonzentration zeigen Aggregation. So werden strahlungslose, intermolekulare Übergänge (*Quenching*) möglich, die zu einer erheblichen Reduktion der resultierenden Fluoreszenz der Farbstoffe im Vergleich zur Fluoreszenz der nicht aggregierten Fluorophore in organischen Lösungsmitteln führt [192, 193]. WAGGONER *et al.* konnten zeigen, dass die Einführung hydrophiler und gleichzeitig sterisch anspruchsvoller Substituenten die Quencheffekte reduziert [60]. Die von ihnen synthetisierten Cy-Farbstoffe, Cyanine, die an der 5-Position des Indols Sulfonsäuregruppen tragen, zeigen eine deutlich geringere Aggregatbildungstendenz und hohe Fluoreszenzausbeuten am Biomolekül. Mit den am ICB entwickelten Oysterfarbstoffen [67] der Firma Denovo Biolabels wurde der Ansatz der Ausnutzung sterisch anspruchsvoller Gruppen zur Reduzierung der

Aggregatbildung durch die Einführung von *spiro*-Cyclohexylgruppen an 2-Position des Indols weiterverfolgt. Um eine höhere Wasserlöslichkeit zu erreichen wurde in der vorliegenden Arbeit die *spiro*-Cyclohexylgruppen der Oysterfarbstoffe durch *spiro*-Piperidylgruppen ersetzt. Die Aminofunktion im Piperidylring erhöht die Hydrophilie des Farbstoffes erheblich und bietet darüber hinaus weitere Derivatisierungsmöglichkeiten. Neben den Piperidylcyaninen wurden auch andere *spiro*-Cyanine synthetisiert und charakterisiert.

Synthese von *spiro*-Piperidylcyaninen

Der Schwerpunkt der Synthesen lag bei der Entwicklung einer Strategie zur Darstellung von *spiro*-Piperidylcyaninen. Dazu wurde zunächst eine neue Synthese für das Piperidyl-4-methylketon entwickelt. Unter Ausnutzung der Carboxybenzyl (Cbz) – Schutzgruppe konnte eine vierstufige Synthese entwickelt werden, die in allen Syntheseschritten gute Ausbeuten von 71 bis 99 % liefert. Die Umsetzung des Ketons zum Indol in einer FISCHER-Indolsynthese war unproblematisch. Es folgte die Quaternierung des Indols, die bei den unsulfonylierten Indolen relativ einfach durch Umsetzung des Indols mit dem entsprechenden Alkylierungsmittel in organischer Lösung möglich war. Bei den sulfonylierten Indolen, die auf Grund ihrer hohen Polarität nicht in organischen Lösungsmitteln löslich sind, konnten anfangs keine Produkte erzielt werden. Durch das Einführen sterisch anspruchsvoller, quaternärer Amine (tert.-Butylaminkationen) als Gegenionen der Sulfonsäuregruppen wurden die sulfonylierten Indole in organischen Lösungsmitteln löslich, so dass Quaternierungsreaktionen erfolgreich durchgeführt werden konnten. Die Quaternierungen mit den diversen Alkylierungsmitteln zeigten insgesamt eher mässige Ausbeuten (40 – 80 %). Häufig trat ein teilweises Abspalten der Cbz-Gruppe durch die Alkylierungsmittel auf. Dies ist ein bekanntes Problem und wurde unter anderem bei BODANSZKY [194] beschrieben. Die Nebenprodukte ohne Schutzgruppe mussten säulenchromatographisch abgetrennt werden, was zum Teil sehr aufwändig war. Aus den quaternierten Indolen wurden zunächst Hemicyanine, dann die gewünschten Cyanine synthetisiert. Bei der Synthese unsymmetrischer Cyanine wurden immer auch die beiden möglichen symmetrischen Cyanine als Nebenprodukte erhalten. Weiterhin entstand eine Vielzahl farbiger Beiprodukte, so dass aufwändige Reinigungen, teils mittels FPLC, durchgeführt werden mussten. Die Ausbeuten sind eher gering und liegen bei etwa 5 – 20 % für die unsymmetrischen Farbstoffe, und etwas höher für die symmetrischen Farbstoffe.

Die Schlüsselstelle der Piperidincyanin-Synthese war die Derivatisierung an der Aminofunktion des Piperidins. Zunächst wurde eine Strategie verfolgt, in der die Cbz-Schutzgruppe am Piperidin erst am fertigen Farbstoff entfernt wird, um dann die gewünschte Derivatisierung durchzuführen. Dies hat den Vorteil, dass das Farbstoffgrundgerüst vielseitig verwendbar bleibt und erst der letzte Reaktionsschritt die jeweils gewünschte Derivatisierung

bringt. Es zeigte sich jedoch, dass das chromophore System des Cyanins sehr empfindlich ist, so dass keine der üblichen Reaktionen zum Abspalten der Cbz-Gruppe [194-196] genutzt werden konnte. Alle Reaktionen führten zum Entfärben der Farbstofflösung auf Grund Zerstörung des chromophoren Systems. Vermutlich fand eine Ringöffnung der Indole unter stark basischen oder sauren Bedingungen statt, während Hydrierungen nicht geeignet waren, da die ungesättigte Polymethinkette ebenfalls hydriert wurde. Es wurde daher ein Schutzgruppenwechsel getestet. Nach der Quaternierung des Cbz-geschützten Indols wurde die Schutzgruppe entfernt und durch eine Andere ersetzt, die sich am fertigen Farbstoff unter schwach sauren Bedingungen abspalten lässt, welche dem chromophoren System des Cyanins nicht schadet. Mit der Benzyloxycarbonylgruppe (Boc) konnten keine guten Ergebnisse erzielt werden, da diese sterisch sehr anspruchsvolle Gruppe die Kopplung der Indole zum Cyanin behinderte. Die Methoxybenzylcarbamoylgruppe (Moz), zeigte weniger sterische Hinderung und Moz-geschützte Farbstoffe wurden erfolgreich synthetisiert. Das Abspalten der Gruppe unter schwach sauren Bedingungen war ebenfalls möglich, so dass dieser Syntheseweg eine Möglichkeit zur Darstellung von Piperidylcyaninen ist, der eine Derivatisierung am fertigen Farbstoffmolekül ermöglicht. Die zum Teil nur mässigen Ausbeuten der verschiedenen Syntheseschritte im Laufe des Schutzgruppenwechsels und die Verlängerung des Syntheseweges um zwei Stufen waren jedoch Grund dafür, auch Synthesen mit einer Derivatisierung auf einer früheren Stufe zu testen. Am erfolgreichsten war hier das Entschützen des quaternären, Cbz-geschützten Indols und anschließende Umsetzung mit Bromessigsäure. Man erhält über einen kurzen Linker eine Säurefunktion am Piperidin. Das Indol wird dann zum Farbstoff umgesetzt. Die Säuregruppe kann aktiviert werden (z.B. mit NHS) und dann mit Aminen in wässriger Lösung bei Raumtemperatur und mässigen pH-Werten (pH 7 - 8.5) reagieren. Auf diese Weise können am fertigen Farbstoff weitere Gruppen (z.B. die Hydrophilie weiter erhöhende Gruppen, wie weitere Amine oder Sulfonsäuregruppen) am Piperidin angebracht werden. Es ist weiterhin möglich den auf diese Art aktivierten Farbstoff direkt mit einem aminmodifizierten Biomolekül umzusetzen. Man erhält hier eine ganz neue Art der Kopplung an das Biomolekül, nämlich über die 3-Position des Indols und nicht, wie üblich über die 1-Position.

Synthese weiterer *spiro*-Cyanine

In einem weiteren Ansatz wurden *spiro*-Cyclopentylcyanine synthetisiert. Da sich zeigte, dass die sterisch sehr anspruchsvollen Cyclohexylgruppen der Oysterfarbstoffe zu einer bathochromen Verschiebung der Absorptionsspektren und Verlusten in der Fluoreszenzausbeute führen (s.u.), wurde der sterisch weniger anspruchsvolle Cyclopentylring als Alternative getestet. Die bei den *spiro*-Piperidylcyaninen entwickelte Synthesestrategie wurde auf die *spiro*-Cyclopentylcyanine übertragen. Hier wird analog

zunächst ein Cyclopentylmethylketon hergestellt, zum Indol umgesetzt, quaterniert und daraus der Farbstoff synthetisiert. Diverse Cyclopentylfarbstoffe wurden erfolgreich synthetisiert, die Ausbeuten der verschiedenen Syntheseschritte waren, bis auf die Farbstoffsynthese an sich, gut. Bei der Synthese der Cyanine entstanden auch hier diverse farbige Nebenprodukte, die mittels FPLC abgetrennt wurden. Mit den *spiro*-Cyclopentylfarbstoffen wurde eine weitere Farbstoffklasse mit interessanten Eigenschaften erschlossen.

Neben den Di-Indolcyaninen wurden auch Cyanine synthetisiert, die nur auf der einen Seite eine Indolgruppe tragen, auf der anderen Seite jedoch mit Benzoxazol, Benzthiazol, Pyridin oder Chinolin substituiert sind. Bei einigen, typischen biochemischen Kopplungsreaktionen, wie z.B. der Phosphoramiditchemie, werden während der Kopplung starke Basen wie Ammoniak eingesetzt. Vor diesem Hintergrund war es von Interesse, ob Farbstoffe mit nicht-Indolgruppen höhere Basenbeständigkeit zeigen, als die Basen-empfindlichen Cyanine mit zwei Indolgruppen. Die Synthese der Farbstoffe erfolgte wie bei den Di-Indolcyaninen, nur dass hier im letzten Schritt die gewünschte heteroaromatische Gruppe zur Farbstoffsynthese eingesetzt wurde. Die Quaternierungen der Benzoxazol-, Benzthiazol-, Pyridin- und Chinolin-Derivate war erfolgreich und mit hohen Ausbeuten (> 95 %) möglich. Die Cyaninsynthesen zeigten die bereits oben beschriebenen Nebenprodukte. Da die Farbstoffe nicht die erhoffte höhere Basenstabilität zeigten und zudem keine guten Fluoreszenzeigenschaften aufwiesen, wurde dieser Syntheseweg jedoch nicht weiter verfolgt.

Für Anwendungen in der konfokalen Laser scanning Mikroskopie (CLSM) wurden Derivate der Oysterfarbstoffe hergestellt, die an der 1-Position des Indols mit Stearylketten derivatisiert sind. Diese Farbstoffe konnten erfolgreich zum Markieren von Zellmembranen eingesetzt werden. Die Zellen wurden dann mittels CLSM betrachtet.

Eigenschaften der Fluorophore

Es ist nach wie vor sehr schwer, die Eigenschaften von Fluorophoren vorherzusagen. Besonders der Zusammenhang zwischen molekularer Struktur und Fluoreszenzintensität des Fluorophors lässt sich schwer abschätzen, während Absorptionsmaxima mit modellchemischen Rechnungen relativ gut vorherzusagen sind. Geht man vom freien Fluorophor zum Konjugat, so werden Vorhersagen über die resultierende Fluoreszenzintensität des Biomolekül-Farbstoff-Konjugates noch wesentlich schwerer, da nun noch die Wechselwirkungen mit den unterschiedlichen Biomolekülen bzw. weitere Eigenschaften wie Kopplungseffizienzen eine Rolle spielen. Meist kann nur empirisch ermittelt werden, ob ein Farbstoff auch ein guter Biomarker ist, was viele zeitaufwändige Synthesen bedeutet. SCHIEDEL *et al.* haben daher beispielsweise einen kombinatorischen Ansatz mit automatisiertem Screening der Fluoreszenzeigenschaften für verschiedene

Cumarine patentiert, um möglichst viele Farbstoffe systematisch zu testen, um dann die „Treffer“ weiter zu verfolgen [197, 198]. Die in dieser Arbeit synthetisierten Farbstoffe wurden hinsichtlich der Eigenschaften Wasserlöslichkeit, Absorptions- und Emissionsmaxima, intrinsische Fluoreszenz und Solvatochromie charakterisiert. Weiterhin wurde ein Piperidylfarbstoff an DNA gekoppelt und die Eigenschaften des Konjugates wurden im Vergleich zu einem Cy5- und einem Oy656-Konjugat untersucht.

Die Oysterfarbstoffe mit ihren *spiro*-Cyclohexylgruppen sind deutlich weniger hydrophil, als vergleichbare Cyanine ohne *spiro*-Gruppen (z.B. Cy5). Dies war zu erwarten, da die Cyclohexylringe sehr hydrophobe Gruppen darstellen. Es wurden daher die *spiro*-Piperidylfarbstoffe synthetisiert, die im Vergleich zu den Oysterfarbstoffen eine polare Gruppe (Aminofunktion) im *spiro*-Ring tragen, die die Wasserlöslichkeit des Farbstoffes entsprechend erhöhen sollte. Dies konnte mit HPLC-Daten belegt werden. Weiterhin bietet das Piperidylfarbstoffgerüst mit seiner zusätzlichen Derivatisierungsmöglichkeit am Piperidin die Möglichkeit noch weitere hydrophile Gruppen einzuführen, wie weitere Aminogruppen oder Sulfonsäuregruppen. Eine hohe Wasserlöslichkeit der Farbstoffe ist wünschenswert, da die meisten Bioassays in wässriger Phase ablaufen. Ein Markieren eines Biomoleküls, z.B. eines Proteins mit vielen hydrophoben Farbstoffen würde dazu führen, dass es aus der wässrigen Phase ausfällt. Weiterhin sind unspezifische Wechselwirkungen der Farbstoffe mit den Biomolekülen weniger ausgeprägt, wenn die Farbstoffe sehr hydrophil sind. Für die resultierende Fluoreszenzausbeute des Konjugates sind ebenfalls hydrophile Farbstoffe von Vorteil, da diese in wässriger Lösung weniger zu Aggregatbildung und Quencheffekten neigen, als hydrophobe Farbstoffe [60, 64].

Die meisten biologischen Methoden arbeiten mit Standardlasern, die die Fluorophore bei 532 nm (YAG-Laser, für rote Farbstoffe) oder 635 nm (roter Diodenlaser, für blaue Farbstoffe) anregen. Daher sollen die als Biomarker vorgesehenen Fluoreszenzfarbstoffe möglichst in diesem Bereich absorbieren, um gut angeregt zu werden. Cy5 absorbiert bei 647 nm (in Wasser), der vergleichbare Oysterfarbstoff Oy656 bei 656 nm, so dass er weniger optimal angeregt wird, als Cy5. Dies führt unter anderem zu einer deutlich geringeren Fluoreszenzausbeute im Bioassay (z.B. 40 % bei Oy656 im Vergleich zur Anregung am Absorptionsmaximum).

Bei der Synthese der neuen *spiro*-Cyanine wurden daher bevorzugt Strukturen weiterverfolgt, die möglichst kurzwellige Absorptions- und Emissionsmaxima besitzen. Der Vergleich der verschiedenen Farbstoffe zeigte, dass eine bathochrome Verschiebung der Absorptionsmaxima mit steigendem sterischen Anspruch der Substituenten in 3-Position des Indols erfolgte. Der Cyclohexylring führte zum langwelligsten Absorptionsmaximum, während

der Cyclopentylring (651 – 653 nm) und eine Substitution des Indols mit Dimethyl (Cy5) zu entsprechend kleineren Absorptionsmaxima führten. Daher sind die Cyclopentylfarbstoffe eine gute Alternative zu den Oysterfarbstoffen und lassen sich deutlich besser mit den Standardlasern anregen. Um möglichst kurzwellige Absorptionsmaxima zu erzielen wurden weiterhin unsymmetrische Farbstoffe mit nur einem *spiro*-Indol synthetisiert, das andere Indol wurde nur mit zwei Methylgruppen derivatisiert. Diese Farbstoffe zeigten deutlich kurzwelligere Absorptionsmaxima (Cyclohexyl: 1 x spiro: 652 nm, 2 x spiro: 656 nm; Cyclopentyl: 1 x spiro: 647 – 651 nm, 2 x spiro: 651 – 653 nm). Schwerpunktartig wurden daher in dieser Arbeit die *mono-spiro*-Cyanine verfolgt. Die bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums von Cyaninen mit steigendem sterischen Anspruch der Substituenten am Indol wurde auch in anderen Fällen beobachtet und ist allgemein bekannt für sterisch gehinderte Farbstoffe [199]. DAI *et al.* testeten beispielsweise eine Reihe verschiedener Substituenten an der 5-Position des Indols eines Cyaninfarbstoffes [200]. Sie fanden eine bathochrome Verschiebung mit steigendem sterischen Anspruch der Substituenten in 5-Position, wobei Elektronendonator- oder Akzeptoreigenschaften der Substituenten keinen Einfluß auf das Absorptionsmaximum hatten. Der Einfluß von Substituenten an der 1-Position des Indols (am Stickstoff) war dagegen nur sehr gering. Auch SCHEIBE *et al.* beschreiben eine bathochrome Absorptionsbandenverschiebungen auf Grund sterischer Hinderung in Cyaninen, wobei der Substituent in 3-Position betrachtet wird. Bei den betrachteten sehr kurzketigen Cyaninen (eine Methingruppe) kann der Effekt eindeutig darauf zurückgeführt werden, dass die sterisch anspruchsvollen Cyanine nicht mehr in planarer Konformation vorliegen können [201].

Die Vermutung lag nahe, dass die bathochrome Verschiebung der Absorptionsmaxima der untersuchten *spiro*-Farbstoffe mit steigendem sterischen Anspruch der Substituenten in 3-Position des Indols ebenfalls auf eine Verminderung der Planarität des π -Systems der Fluorophore zurückzuführen sein könnte. Zur Überprüfung dieser Arbeitshypothese wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. S. Grimme (Institut für Organische Chemie, WWU Münster) einige modellchemische Berechnungen der Strukturen Cy5 und Oy656 durchgeführt. Optimierungen der Geometrien mit dem MMT-Kraftfeld zeigten, dass die *spiro*-Cyanine planar sind. Die vertikalen Anregungsenergien wurden quantenmechanisch mit der TDPPP-Methode berechnet und bestätigten die gefundenen bathochromen Verschiebungen der Absorptionsmaxima bei Ersetzen der zwei Methylgruppen (Cy5, DM) an der 3-Position der Indole durch *spiro*-Cyclohexylgruppen (Oy656, CH). Die beobachtete Verschiebung ist jedoch nicht auf eine Verdrillung des Chromophores zurückzuführen, da die *spiro*-Substituenten die Planarität nicht beeinträchtigen. Vielmehr ist eine geringfügige Veränderung der C-C-Bindungslängen im Polyenteil durch verschiedenen sterischen Anspruch der Substituenten DM und CH für die Verschiebung verantwortlich.

Die Piperidylfarbstoffe zeigen zum Teil ungewöhnliche Absorptionsmaxima. Während die Cbz-substituierten Piperidylfarbstoffe wie erwartet langwelliger absorbieren, als die Oysterfarbstoffe (660 – 671 nm, je nach Substituenten, zum Teil in Ethanol gemessen), zeigen alkylsubstituierte Piperidylfarbstoffe extrem kurzwellige Absorptionsmaxima (645 – 647 nm), obwohl sie sterisch stärker gehindert sind, als die Oysterfarbstoffe. Teilweise wird das Absorptionsmaximum von Cy5 noch unterschritten. Neben den sterischen müssen also auch elektronische Effekte einen Einfluß auf die Lage des Absorptionsmaximums haben, entgegen den Beobachtungen von Dai *et al.* [200]. Da die TDPPP-Methode keine elektronischen Effekte berücksichtigt, sondern nur die π -Elektronen erfasst, können mit Hilfe der durchgeführten Berechnungen keine Aussagen zum ungewöhnlichen Verhalten der Alkyl-Piperidylcyanine gemacht werden. Dazu wären All-Elektronen-TDDFT-Rechnungen nötig, die im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt werden konnten.

Um einen Eindruck davon zu bekommen, welche der neuen Farbstoffe gute Biomarker sein könnten, wurde zunächst die intrinsische Fluoreszenz betrachtet. Diese muss jedoch nicht unbedingt relevant für den Bioassay sein, da sich das Fluoreszenzverhalten des Konjugats aus Biomolekül und Marker auf Grund von Quencheffekten von dem des freien Farbstoffes unterscheiden kann.

Der sterische Anspruch der Substituenten in 3-Position der Indole, der zu bathochromer Verschiebung der Absorptionswellenlänge führt, hat auch einen Einfluß auf die intrinsische Fluoreszenz. Je mehr *spiro*-Gruppen sich im Molekül befinden, desto geringer ist die resultierende Fluoreszenz, wie z.B. die folgende Reihe zeigt (Anregung jeweils 20 nm kurzwelliger als das Absorptionsmaximum):

Cy5 (2xDimethyl): I = 100 % > Oy503 (1xCyclohexyl, 1xDimethyl): I = 84 % >
Oy656 (2xCyclohexyl): I = 78 %

Ein ähnliches Ergebnis wurde auch beim Vergleich von Cyclohexyl- und Cyclopentylgruppe gefunden. Die Cyclopentylfarbstoffe fluoreszieren etwa 10 % besser als vergleichbare Cyclohexylfarbstoffe. Die Piperidylfarbstoffe zeigen hingegen sehr unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaften. Die sterisch stark gehinderten Cbz-Piperidylcyanine zeigen wie erwartet vergleichsweise geringe Fluoreszenzintensitäten, was im Einklang mit den Beobachtungen bei den Cyclohexyl- und Cyclopentylfarbstoffen steht. Die Fluoreszenz der Cbz-Piperidylfarbstoffe beträgt etwa 10 % weniger als die von Oy656 und 30 % weniger als die von Cy5. Ein ethylsubstituierter Piperidylfarbstoff lieferte hingegen sehr gute Ergebnisse. Dieser Farbstoff fluoresziert besser als Oy656 und nur 15 % schlechter als Cy5 trotz Vorhandenseins eines *spiro*-Substituenten. Ein kopplungsfähiges Derivat dieses Farbstoffes,

das am Piperidin mit einer aktivierten Essigsäuregruppe substituiert war, fluoreszierte überraschender Weise jedoch deutlich schlechter und zeigte eine 30 % geringere Fluoreszenz als Oy656.

Es ist äußerst schwer, nur auf Grund der Strukturformel vorherzusehen, ob ein zu synthetisierender Farbstoff eine gute intrinsische Fluoreszenz zeigen wird. Diverse zur Fluoreszenz in Konkurrenz ablaufende Deaktivierungsprozesse können die Fluoreszenzausbeute beeinflussen. Neben einer Deaktivierung durch Quencheffekte können z.B. auch Triplett-Übergänge eine Rolle spielen und zu einer Verminderung der Fluoreszenzausbeute führen. Wird durch eine geringfügige Änderung der Geometrie oder der elektronischen Eigenschaften ein solcher Triplettkanal geöffnet, so kann dies zu einer erheblichen Reduktion der Fluoreszenzausbeute führen. Die überraschend hohe intrinsische Fluoreszenz einiger Alkyl-Piperidylcyanine, bzw. die geringe Fluoreszenz anderer *spiro*-Cyanine wäre eventuell über das Fehlen oder Vorhandensein von Triplettkanälen erklärbar. Es könnte experimentell geprüft werden, ob Triplettübergänge in einem Chromophor vorliegen, indem ein Sensibilisator zugegeben würde, der die Energie des Triplettzustandes des Fluorophores übernimmt und dessen Phosphoreszenz ausgewertet werden kann. Es dürfte allerdings schwer werden, einen Sensibilisator mit einem genügend tief liegenden Triplettzustand zu finden, wie er für die betrachteten NIR-Farbstoffe benötigt würde (persönliche Mitteilung Prof. Grimme). Weiterhin treten im NIR-Bereich Probleme hinsichtlich der Instrumentierung auf.

Der Vergleich der Eigenschaften der verschiedenen Fluorophore und die teilweise überraschenden Ergebnisse zeigen deutlich, wie schwer die Fluoreszenzeigenschaften der Farbstoffe aus der Struktur vorherzusagen sind. Letztendlich zeigt nur der Praxistest, ob ein Fluorophor die gewünschten Eigenschaften besitzt.

Die synthetisierten Cyanine zeigen eine ausgeprägte Solvatochromie, wobei sich die für Cyanine typische negative Solvatochromie fand. Mit sinkender Polarität des Lösungsmittels wurde das Absorptionsmaximum bathochrom verschoben. Dies bedeutet, dass der angeregte Zustand polarer ist, als der Grundzustand und entsprechend in polaren Lösungsmitteln besser stabilisiert wird, was die Rotverschiebung verursacht [53, 202]. Abbildung 70 zeigt die Zusammenhänge.

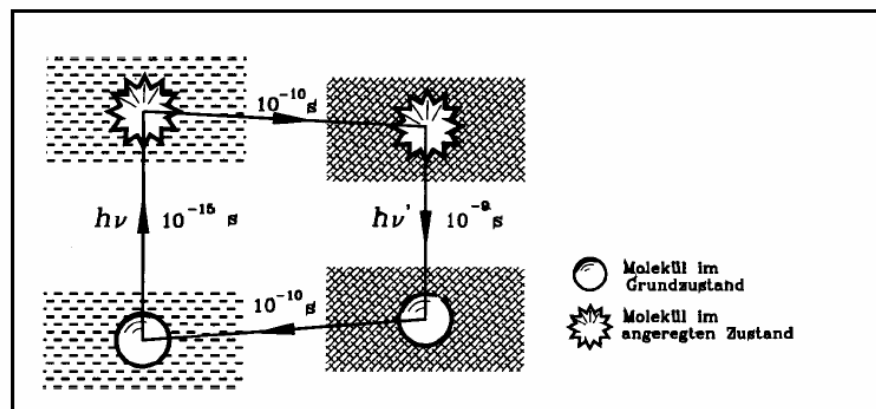


Abbildung 70: Elektronische Vorgänge bei Absorption und Emission [28].

Das Dipolmoment des Grundzustandes ist kleiner, als das des angeregten Zustandes. Während der sehr schnellen Anregung bleibt die Orientierung der Lösungsmittelmoleküle erhalten. Mit der Rotationsdiffusionszeit des Moleküls orientieren sich die Lösungsmittelmoleküle neu, entsprechend der neuen Ladungsverteilung des angeregten Zustandes. Wie weit die Energie des S_1 -Zustandes dabei abgesenkt wird, hängt ab von der Polarität des Lösungsmittels und seiner Fähigkeit den angeregten Zustand zu solvatisieren. Bei der Emission wird das Dipolmoment wieder kleiner. Auch hier müssen sich die Lösungsmittelmoleküle erst wieder neu orientieren.

Diese Annahmen basieren auf der Betrachtung der permanenten Dipolmomente der Chromophore. Da Cyanine jedoch sehr geringe Dipolmomente besitzen, müssen hier noch andere Effekte eine Rolle spielen. WEST *et al.* und NOUKAKIS *et al.* setzen sich detailliert mit den Solvenseigenschaften auf Cyanine auseinander [203, 204]. Sie spezifizieren die allgemeine Abhängigkeit von der Polarität des Lösungsmittels und zeigen, dass die bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums auf dispersive Wechselwirkungen zwischen dem Übergangsdipolmoment des Farbstoffes und der elektronischen Polarisierbarkeit des Solvens zurückzuführen ist.

Eigenschaften der Fluorophor-DNA-Konjugate

Der aussichtsreichste der neuen Farbstoffe, der Piperidylfarbstoff „Pip“ (Abb. 40), wurde hinsichtlich der Anwendung als Biomarker in der DNA-Analytik getestet. Die alkylsubstituierten Piperidylfarbstoffe zeigen allgemein sehr kurze Anregungswellenlängen, die gut zu den Standardlasern passen. Die intrinsische Fluoreszenz von Pip ist zwar eher mäßig, aber andere Alkylpiperidylfarbstoffe (nicht kopplungsfähig) zeigen eine sehr hohe intrinsische Fluoreszenz. Daher wurde vermutet, dass auch Pip noch das Potential eines gut

fluoreszierenden Markers zeigen könnte. Die Wasserlöslichkeit von Pip ist relativ hoch im Vergleich zu Oy656, was ihn ebenfalls zu einem guten Kandidaten für einen Biomarker macht. Weiterhin ist dieser Farbstoff besonders interessant, da er über eine völlig andere Art, nämlich über die 3-Position des Indols, an das Biomolekül gekoppelt wird. Hingegen werden herkömmliche Cyaninfarbstoffe über die 1-Position gekoppelt.

Die Markierungen von DNA mit Pip verliefen leider nicht zur vollen Zufriedenheit. Es wurde zwar ein etwas höherer Markierungsgrad (2.0 – 3.2), als mit Oy656 (1.3 – 2.4) erzielt, aber die guten Markierungsgrade von Cy5 (11.7 – 15.4) wurden nicht erreicht. Die sterisch anspruchsvolle *spiro*-Struktur scheint die Kopplung mit dem Biomolekül negativ zu beeinflussen. Die bessere Wasserlöslichkeit von Pip im Vergleich zu Oy656 könnte zu den etwas höheren Markierungsgraden geführt haben.

Die vergleichende Charakterisierung der DNA-Konjugate von Cy5, Oy656 und Pip lieferte jedoch sehr gute Ergebnisse für das Pip-Konjugat. Es wurde zunächst die Fluoreszenz von Konjugatlösungen mit gleicher Farbstoffkonzentration gemessen, um einen direkten Vergleich der Farbstoffe, unabhängig vom Markierungsgrad, zu ermöglichen. Oy656 zeigte dabei nur 48 % der Fluoreszenz des Cy5-Konjugates, während Pip 85 % der Fluoreszenz zeigte. Der Ersatz des hydrophoben Cyclohexylrings durch den Piperidylring führte zu erheblich verbesserten Fluoreszenzeigenschaften der Konjugate. Weiterhin ist von Vorteil, dass der Piperidylfarbstoff nur eine relativ geringe intrinsische Fluoreszenz besitzt, die jedoch auf das Doppelte ansteigt, wenn der Farbstoff an DNA gekoppelt wird. Dies ist günstig bei allen Verfahren, bei denen Hintergrundfluoreszenz durch nicht abgetrennten, ungebundenen Farbstoff auftritt. Diese wird hier deutlich geringer ausfallen, da das Konjugat wesentlich stärker fluoresziert, als der freie Farbstoff. Je nach Anwendung könnten so aufwändige Reinigungsschritte eingespart werden. Für Cy5 und Oy656 wurde eine solche Erhöhung der Fluoreszenz bei Kopplung an DNA nicht festgestellt.

Ein weiteres unerwartetes Ergebnis lieferte die Untersuchung der Festphasenfluoreszenz. Dazu wurden Konjugatlösungen mit gleicher Fluorophor-Konzentration auf Objektträger gespottet und die Fluoreszenz nach Trocknen ausgelesen. Das adsorbierte Pip-DNA-Konjugat zeigte ebenso gute Fluoreszenz, wie das Cy5-Konjugat, während das Oy656-Konjugat nur etwa 60 % dieser Fluoreszenz aufwies. Bei der Festphasenfluoreszenz wurde ein noch deutlich stärkerer Anstieg der Fluoreszenz (um das 10fache) beim Koppeln an DNA für Pip gefunden. Oy656 zeigte hingegen nur einen dreifachen Anstieg der Fluoreszenz bei Vergleich von freiem Farbstoff mit dem Konjugat, während Cy5 keine Fluoreszenzerhöhung nach Kopplung an DNA aufwies. Die ausserordentlich guten Fluoreszenzeigenschaften der Pip-Konjugate in fester Phase machen diesen Farbstoff für alle Anwendungen, bei denen die Festphasenfluoreszenz gemessen wird interessant, wie z.B. für den Einsatz in der konventionellen Chiptechnologie. Durch eine Optimierung der

bisher noch unzureichenden Markierungen könnten die Markierungsgrade mit Pip noch verbessert werden, so dass dieser Farbstoff sehr gut als Biomarker eingesetzt werden kann und in einigen Anwendungen, vor allem in fester Phase, Cy5 überlegen sein sollte.

Ein Anstieg in der Fluoreszenz bei Kopplung an DNA wurde für diverse Cyanine beschrieben [4] und für DNA-Nachweisverfahren ausgenutzt. Besonders hervorzuheben sind hier die kationischen, dimeren Cyanine TOTO^R, POPO^R, YOYOTM und BOBOTM der Firma Molecular Probes [205, 206]. TOTO^R ist beispielsweise ein Dimer von Thiazolorange und besitzt vier positive Ladungen, davon zwei an den Benzthiazolgruppen und zwei an den tertiären Aminogruppen, welche die beiden Thiazolorangeuntereinheiten verbinden. Dieser interkalierende Farbstoff wird nicht kovalent an die DNA gekoppelt, sondern schiebt sich zwischen die Stränge der DNA. Die vielen positiven Ladungen führen weiterhin zu elektrostatischen Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA. Die anderen Farbstoffe dieser Serie haben vergleichbare Strukturen. Bei der Bindung an die DNA tritt ein 200- bis 1800-facher Anstieg der Fluoreszenz auf. NETZTEL *et al.* [207] führen dies darauf zurück, dass die Anbindung an die DNA die Torsionsmöglichkeiten in der Polymethinkette reduziert und somit die planare Konformation des Farbstoffes stabilisiert wird.

Auch WAGGONER *et al.* [60] konnten zeigen, dass die Fluoreszenz von Cy3 bei Kopplung an DNA steigen kann, wenn die planare Konformation des Farbstoffes dadurch stabilisiert wird. Sie fanden einen Anstieg der Fluoreszenz von Cy3-markierter, einzelsträngiger DNA nach Hybridisieren zu Duplex-DNA. Bei einzelsträngiger DNA war die Fluoreszenz gering, stieg aber bei der Hybridisierung an, da dann offensichtlich die planare Form des Farbstoffes besonders gut stabilisiert wurde. Die Zunahme der Fluoreszenz bei der Koppelung von Pip an DNA könnte auf eine ähnliche Stabilisierung der planaren Struktur des Farbstoffes zurückzuführen sein.

Weiterhin könnte auch die innovative Kopplung an das Biomolekül über die 3-Position des Indols zu den guten Fluoreszenzeigenschaften der Pip-DNA-Konjugate führen. Diese Art der Anbindung wurde bisher nur bei den ganz neuen Farbstoffen der Alexa-Serie (Alexa Fluor 555[®] und Alexa Fluor 647[®]) der Firma Molecular Probes [208] beschrieben. Diese Farbstoffe beruhen auf folgender Grundstruktur (Abb. 72):

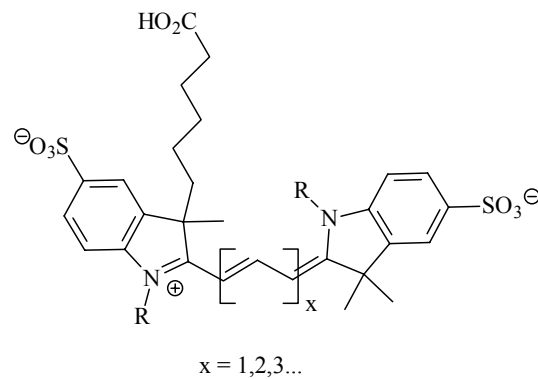


Abbildung 71: Struktur der Alexa-Farbstoffe bei Kopplung über die 3-Position des Indols.

Es handelt sich quasi um ein Derivat von Cy5, bei dem sich die Kopplungsgruppe zum Biomolekül an der 3-Position des Indols befindet. Mit diesen Farbstoffen wurden sehr gut fluoreszierende DNA-Konjugate erhalten, wie Abbildung 73 zeigt [43]:

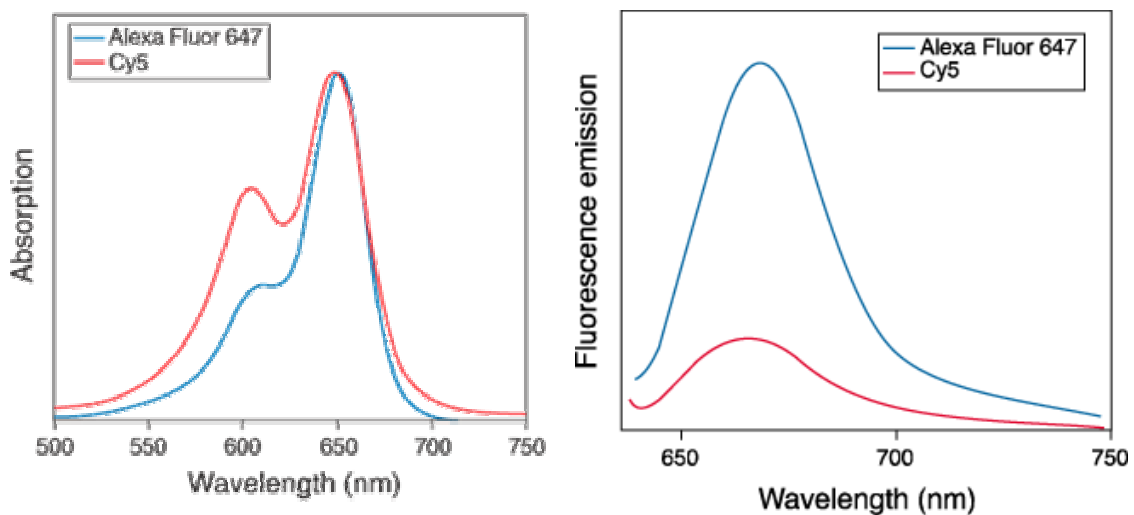


Abbildung 72: Absorptions- und Fluoreszenzspektren von Alexa Fluor 647- und Cy5-DNA-Konjugaten im Vergleich [43].

An Hand der deutlich geringeren Dimerenbande im Absorptionsspektrum der Alexa-Farbstoffe ist zu sehen, dass diese eine viel geringere Tendenz zur Aggregatbildung und den daraus resultierenden Quench-Effekten zeigen, als die Cy-Farbstoffe. Die Fluoreszenzausbeute des Konjugates ist entsprechend deutlich höher. Weiterhin zeichnen sich die Alexa-Farbstoffe durch eine hohe Wasserlöslichkeit und geringes Photobleaching aus. Es können auch viel höhere Markierungsgrade realisiert werden als mit Cy5, ohne dass es zu einem Verlust in der Fluoreszenzausbeute durch Quencheffekte kommt. Protein-Alexa-Konjugate, die ebenfalls deutlich besser fluoreszieren als entsprechende Cy-Konjugate, wurden ebenfalls beschrieben [209]. Weiterhin wurden die Alexa-Farbstoffe erfolgreich im Vergleich mit Cy5 in der Microarray-Technologie getestet [210], wo sie besser zur Ermittlung

signifikanter Unterschiede in der Genexpression geeignet waren. Da der einzige signifikante Unterschied zwischen den Cy- und den Alexafarbstoffen die Kopplungsposition des Farbstoffes an das Biomolekül ist, kann nur diese neuartige Kopplungsart für die guten Fluoreszenzeigenschaften der Konjugate verantwortlich sein. Dies sollte vergleichbar für den Pip-Farbstoff gelten. Die neuartige Kopplungsart scheint zu einer Stabilisierung der planaren Struktur des Fluorophores am Biomolekül beizutragen.

Ausblick

Mit dem Piperidylfarbstoff Pip wurde ein Farbstoff synthetisiert, der den Weg zu einer sehr vielversprechenden, völlig neuen Farbstoffklasse eröffnet. Dazu sollte allerdings die bisher noch eher mäßige Kopplungseffizienz bei Bindung an DNA weiter verbessert werden. Hierzu könnten bereits Optimierungen der Kopplungsbedingungen Erfolge bringen (Puffer, Temperatur, Reaktionszeit etc.). Weiterhin sollten Derivate von Pip synthetisiert werden, die mehrere hydrophile Sulfonsäuregruppen tragen. Solche extrem hydrophilen Farbstoffe sollten noch wesentlich bessere Fluoreszenzeigenschaften als Biomarker besitzen, da die Tendenz zur Aggregatbildung und Quencheffekten mit höherer Wasserlöslichkeit abnimmt. Auch die Kopplungseffizienz könnte hierdurch vorteilhaft beeinflusst werden. Eine mögliche Struktur wäre ein Farbstoff mit Sulfonsäuregruppen an 1- und 5-Position der Indole und Kopplung an das Biomolekül über die 3-Position (z. B. Abb. 73). Eine elektrostatische Abstoßung von der DNA ist bei vier Sulfonsäuregruppen, deren negative Ladungen teilweise kompensiert werden noch nicht zu erwarten. Weiterhin sollte ein längerer Linker, eventuell bestehend aus hydrophilen Gruppen verwendet werden, um Wechselwirkungen mit dem Biomolekül weiter zu reduzieren. Ein solcher Linker könnte z.B. durch Aminosäuren (hier: Glycin) unter Ausnutzung der Amidbindung realisiert werden.

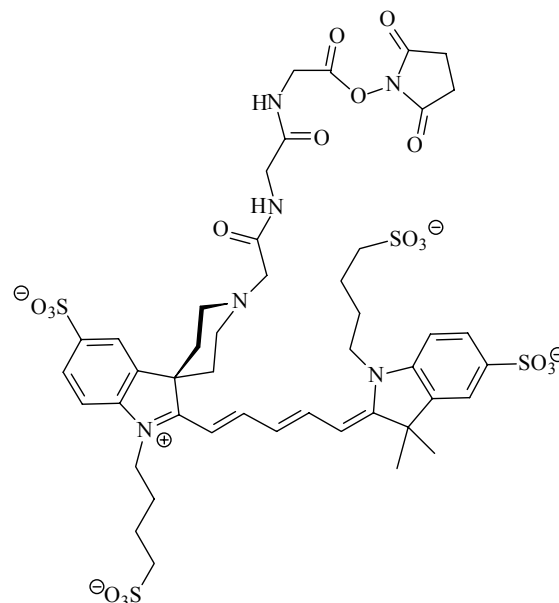


Abbildung 73: Vorschlag für einen sehr hydrophilen Piperidylfarbstoff.

4.2 Tierartendifferenzierung in der Lebensmittelchemie und Forensik

Die neuen *spiro*-Farbstoffe wurden exemplarisch in der DNA-Analytik (auf konventionellen DNA-Chips und im DNA-Biosensor) getestet. Als biologisches Modellsystem diente die Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln, die bereits von PETER [135] begonnen wurde. Es wurde eine Reihe neuer Sonden entwickelt, die eine bessere und differenziertere Bestimmung der verschiedenen Tierarten in einer Lebensmittelprobe zulassen. Mit den neuen Sonden war es möglich, auch die forensische Analytik als weiteres, neues Einsatzgebiet für den DNA-Biosensor zu etablieren. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Tierartendifferenzierung mit beiden Technologien diskutiert, wobei zunächst auf Geräteparameter, dann auf die biologischen Zusammenhänge eingegangen wird.

Charakterisierung der beiden DNA-Biosensor-Chipreader

Die Kalibrationsgraden bei Messungen synthetischer Targetoligonukleotide mit dem DNA-Biosensor (erster Prototyp) bestätigen den linearen Zusammenhang zwischen dem Signalanstieg zu Beginn der Hybridisierung und der Konzentration der Targetlösung nach Gleichung 8. Ausgewertet wurde entsprechend bei einer Messung nicht das eigentliche Fluoreszenzsignal, sondern der Fluoreszenzanstieg zu Beginn der Hybridisierung. Auf diese Art spielt der Fluoreszenzhintergrund nur eine geringe Rolle. Die Dissoziation kann prinzipiell ebenfalls ausgewertet werden. Da es sich hierbei jedoch um eine Reaktion erster Ordnung handelt, die einem einfachen exponentiellen Verlauf folgt, besteht kein linearer Zusammenhang zwischen Konzentration und Signalsteigung. Die Beobachtung der Dissoziationsphase ermöglicht aber die Bestimmung von k_{off} und ist daher ein weiteres Mittel, um Mutationen (Fehlpaarungen) in der Hybridisierungssequenz zu erkennen. Allerdings ist der Zeitaufwand für eine Messung der Dissoziation grösser, so dass in dieser Arbeit auch zur Beantwortung der Frage nach Fehlpaarungen die Assoziationsphase genutzt wurde. Weitere Untersuchungen zur Kinetik der Hybridisierung und dem Einfluss verschiedener Parameter wie der Sondenlänge, eventuell vorhandener Fehlpaarungen, der Temperatur und des Formamidgehaltes finden sich bei PETER [135].

Die rechnerische Auswertung der Steigungsbilder erfolgt nach der so genannten Mittelwertsmethode. Dabei wird der Mittelwert der Steigung in einer Zelle eines quadratischen Rasters ermittelt. Der Mittelwert der definierten Hintergrundzellen wird dann vom Mittelwert der betrachteten Sondenzelle subtrahiert. Man erhält die hintergrundkorrigierte Steigung. Diese Art der Auswertung ist eine vereinfachte Abwandlung der Algorithmen typischer Softwareprogramme zur Auswertung von Microarray-Bildern, wie z. B. *GenePix Pro*TM, bei dem das Mittelwertsignal eines Spots in einem kreisförmigen Raster ermittelt wird und der individuelle Hintergrund des Spots jeweils subtrahiert wird. Der

vereinfachte Algorithmus mit einem quadratischen Raster war jedoch ausreichend zur Ermittlung reproduzierbarer Ergebnisse und zur Bestimmung von Nachweisgrenzen (persönliche Mitteilung von E. Frauendorfer).

Typische Nachweisgrenzen lagen bei 10 – 20 pM für die Rind- und Huhn-Targets. Dies ist vergleichbar mit anderen DNA-Biosensor-Systemen, in denen Nachweisgrenzen von 10 pM für ein 18-mer Target [126] und 74 pM für ein 21-mer Target [123] gefunden wurden. Bessere Nachweisgrenzen finden sich beispielsweise bei der Verwendung eines planaren Wellenleitersystems mit 50 fM [127]. In einem faseroptischen Sensor konnten noch Konzentrationen von 0.2 pM [131] und 70 fM [119] von fluorophormarkierten Targets detektiert werden. Mit Methoden, die auf den Nachweis nicht markierter DNA beruhen, werden jedoch deutlich schlechtere Ergebnisse erhalten, wie z.B. bei einem Resonant-Mirror-SPR-Biosensor mit 9.2 nM [113], oder bei einem weiteren SPR-System mit 10 nM [211].

Ein grosser Vorteil des DNA-Biosensors des ICB im Vergleich zur konventionellen DNA-Chiptechnologie war die einfache Regenerierbarkeit der Chips durch einen alkalischen Waschschrift. So konnten problemlos 15 bis 20 Messungen auf einem Chip nacheinander durchgeführt werden. Die Reproduzierbarkeit war mit einem Variationskoeffizient von 4 % bei 7 betrachteten Messungen und weniger als 1 % Signalverlust pro Messung sehr gut. Auf diese Art können ganze Messreihen auf demselben Chip durchgeführt werden, was die Ergebnisse im hohen Maße vergleichbar macht. Auch für andere DNA-Biosensoren wurde eine vergleichbar gute Arbeitsstabilität beschrieben, wie z. B. bei SCHRUDERER *et al.* oder FERIOTTO *et al.* [104, 126]. Die üblicherweise nur sehr kurzen Messzeiten und die Bewegung der Messlösungen auf den DNA-Biosensoren führen zu der allgemein sehr guten Arbeitsstabilität. Bei konventionellen DNA-Chips, auf denen eine stehende Lösung über einen längeren Zeitraum hybridisiert wird und die hybridisierten Produkte erst nach dem Trocknen detektiert werden, ist eine vollständige Regenerierung nicht mehr möglich, da irreversible Wechselwirkungen auftreten. Für jede zu messende Probe muss demnach ein neuer Chip verwendet werden, wobei insbesondere die genauen Hybridisierungsbedingungen unter einem Deckgläschen häufig nicht einstellbar sind. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wird dadurch deutlich schlechter. So wird von 30 – 50 % Abweichung zwischen den Mittelwerten verschiedener Arrays berichtet [212, 213].

Auf Grund des speziellen Ausleuchtungsprofils des Lasers ergaben sich beim hier eingesetzten DNA-Biosensor jedoch Inhomogenitäten der Signale innerhalb eines Arrays. Sonden-Spots am Rand wurden weniger gut vom Laser angeregt, als Sonden-Spots im Zentrum des Arrays. Dieses Phänomen ist ein charakteristisches Problem des ICB-Chipreaders und ist auf die Anregungsoptik zurückzuführen. Da dieser physikalische Effekt jedoch sehr gut reproduzierbar ist, stellte er keine prinzipielle Einschränkung der Messungen

dar. Die verschiedenen Sonden wurden in der Regel statistisch im Array verteilt, so dass sich jede mindestens einmal im gut ausgeleuchteten Zentrum des Arrays befand. Häufig wurde dann nur das intensivste Signal ausgewertet, während die anderen Spots der Absicherung des Ergebnisses dienten. So waren Methoden zur Korrektur des Ausleuchtungsprofils nicht notwendig. Diesen definierten Abweichungen innerhalb eines Arrays, die durch gerätetechnische Veränderungen und mathematische Methoden vermutlich sogar fast vollständig auszugleichen wären, steht eine undefinierte Variation der Signale innerhalb eines Arrays auf konventionellen DNA-Chips gegenüber. Bei der Hybridisierung stehender Lösungen unter einem Deckgläschen oder in einem Hybridisierungsrahmen kommt es zu inhomogenen Targetverteilungen auf dem Array. Dies führt auch innerhalb eines Arrays zu Abweichungen der Signale von 10 – 25 % [212, 213] z.B. durch Verdunstung am Rand oder ungenügend planarer Ausbildung des Flüssigkeitsfilms. Vor dem Vergleich der Ergebnisse verschiedener Chips sollte daher stets eine Normalisierung erfolgen, um Unregelmässigkeiten auszugleichen. Ansätze dafür finden sich bei HOLLOWAY *et al.* [81].

Nachdem das DNA-Biosensorsystem mit den synthetischen Modelltargets charakterisiert wurde, konnte auch die Eignung zur Messung von PCR-Produkten demonstriert werden. Die PCR-Produkte wurden in der Regel nach thermischer Denaturierung analysiert. Der Anstieg des Fluoreszenzsignals mit der Zeit war bei den PCR-Produkten ebenfalls linear. Die Kalibrationsgeraden zeigten, dass weiterhin auch der lineare Zusammenhang zwischen Konzentration der Proben-DNA und Signalanstieg zu Beginn der Hybridisierung besteht. Die Analyse von PCR-Produkten in DNA-Biosensoren wird in der Literatur nur relativ wenig erwähnt, z.B. bei KAI *et al.*, die die Hybridisierung von 143, 256 und 391 bp großen, doppelsträngigen PCR-Produkten mit einer 18-mer Sonde in einem BIAcore-Sensor beschreiben [214]. Auch mit elektrochemischen und piezoelektrischen Systemen wurde die Detektion von PCR-Produkten nur selten beschrieben. MINNUNNI *et al.* verglichen beispielsweise einen BIAcore-Sensor mit elektrochemischen und piezoelektrischen Systemen [215]. Sie fanden dabei für die elektrochemische Detektion schlechtere Reproduzierbarkeiten und einen uneinheitlichen Zusammenhang zwischen Sensorsignal und PCR-Produkt-Konzentration.

Am ICB wurde ein zweiter Prototyp des DNA-Biosensor-Chipreaders entwickelt und in der vorliegenden Arbeit charakterisiert. Das neue System zeichnet sich durch einen stärkeren Laser und eine etwas empfindlichere CCD-Kamera aus. Die Anordnung der Detektionsoptik wurde insofern vereinfacht, als dass sie nun linear ausgelegt ist, indem sich die CCD-Kamera nun unterhalb des Prismas befindet. Eine Umlenkung der emittierten Fluoreszenzstrahlung mit Hilfe einer Goldverspiegelung des Prismas ist ebenfalls nicht mehr notwendig. Eine deutliche Verbesserung im Vergleich zum alten Chipreader stellt die

automatisierte Probenaufgabe dar. Mess-, Wasch- und Regenerierungslösungen werden in Eppendorfgläsern in einem Probenhalter vorgelegt. Eine Nadel durchsticht jeweils den Deckel des Probengefäßes und die Lösung wird mit einer Pumpe über den Chip gesaugt. Der gesamte Messzyklus inklusive Regenerations- und Waschschritten läuft automatisiert ab, was zu einer wesentlichen Zeitersparnis führt und ausserdem Fehler, wie sie bei der manuellen Probenaufgabe vorkamen, ausschaltet.

Die Kalibrationen am neuen DNA-Biosensor zeigten ebenfalls sehr gute Linearität, wobei jedoch die Korrelationskoeffizienten insgesamt etwas schlechter waren, als beim ersten Prototyp. Die automatisierte Probenaufgabe ist derzeit noch nicht voll optimiert, so dass es zu Unregelmässigkeiten im Fluss der sehr hochviskosen Proben kam. Dies wirkte sich auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und somit auf die Korrelationskoeffizienten der Kalibrationsgraden aus. Derzeit ist die Reproduzierbarkeit mit einer typischen Standardabweichung von 8 % über 7 Messungen beim neuen Chipreader gegenüber 4 % beim alten Gerät noch etwas schlechter. Optimierungen des Fliesssystems könnten hier aber noch zu deutlichen Verbesserungen führen. Die Nachweisgrenzen waren mit 5-10 pM etwas besser, als bei dem alten Chip-Reader (10-20 pM). Auch hier wird das System derzeit noch nicht voll ausgenutzt. Verbesserungen in der Empfindlichkeit werden durch einen etwas schlechteren Hintergrund teilweise wieder zunichte gemacht. Der wellenförmige Hintergrund wird wahrscheinlich durch Interferenzmuster hervorgerufen, die ihre Ursache in dem Zusammenspiel von Einstrahlwinkel, sowie den Brechungsindices des Glasprismas und des Glaschips haben könnten. Optimierungen der Optik bieten daher Spielraum für das Erreichen geringerer Empfindlichkeiten. Das Ausleuchtungsprofil des Lasers ist beim neuen Chip-Reader ganz ähnlich wie beim Alten und ebenso reproduzierbar, so dass hier keine Probleme auftraten. Die Messung von PCR-Produkten konnte ebenfalls erfolgreich demonstriert werden und entsprechend wurden auch Realproben richtig bestimmt. Der neue Chipreader zeigt großes Potential hinsichtlich der Messung geringerer DNA-Konzentrationen bei gleichzeitig stark vereinfachter Handhabung und deutlich schnelleren Messungen.

Zur Zeit wird der zweite Prototyp des DNA-Biosensor-Chipreaders von einem Kooperationspartner (Prof. Dr. Schleifer, TU München) in einem Projekt zur Detektion von Mikroorganismen eingesetzt [216]. Der Nachweis von 20 bis 50 Bakterienarten auf der Basis ribosomaler 16sDNA vor einem Hintergrund enorm vieler, sehr ähnlicher Sequenzen, stellt besondere Anforderungen an die Spezifität der Hybridisierung. In diesem Projekt wird ausgenutzt, dass bereits während der Dissoziation in Hybridisierungspuffer DNA-Targets mit Basenfehlpaarungen deutlich schneller abgelöst werden, als die perfekt hybridisierenden Targets (Daten nicht gezeigt, und persönliche Mitteilung, A. Mehlen).

Entwicklung neuer Sonden

Zu Beginn der Arbeit stand ein Satz von sechs Sonden [135] für verschiedene Nutztiere zur Verfügung, wobei eine der Sonden, die Ziegesonde, nur bedingt einsetzbar war, da sie eine Kreuzhybridisierung mit Schwein-PCR-Produkt zeigte. Es wurde daher eine Reihe weiterer Sonden entwickelt, um das Spektrum der messbaren Proben und Anwendungen deutlich zu erweitern.

Bei der Entwicklung neuer Sonden sind im Wesentlichen zwei Gesichtspunkte zu berücksichtigen, zum einen die Effizienz, zum anderen die Spezifität der Hybridisierung der Target-DNA mit der Sonde. Die Effizienz der Hybridisierung muss möglichst hoch sein, um eine hohe Empfindlichkeit zu erreichen. Für verschiedene Spezies sind die Hybridisierungseffizienzen unterschiedlich, was sich in den unterschiedlichen Sensitivitäten in den Kalibrationsgraden widerspiegelt. Beispielsweise ist die Sensitivität für Rind-Target-DNA stets grösser als für Huhn-Target-DNA, entsprechend einer besseren Hybridisierungseffizienz des Rind-Targets. Identische Bindungsstärken für sämtliche der Spezies mit ihren unterschiedlichen Sondensequenzen werden sich nicht realisieren lassen. Es kann deutlich ein Zusammenhang zwischen der Signalstärke und den unterschiedlichen Sondereigenschaften festgestellt werden. Sonden mit einem sehr hohen GC-Gehalt liefern viel stärkere Signale, als Sonden mit einem geringeren GC-Gehalt. Dies entspricht der bekannten Abhängigkeit des Schmelzpunktes einer Duplex-DNA vom GC-Gehalt. Besonders deutlich wird dies bei den beiden Rehsonden Re629 (50 % GC) und Re690 (40 % GC), von denen bei gleichen Hybridisierungsbedingungen erstere sehr intensive Signale, zweitere nahezu keine Signale liefert. Erfahrungsgemäss sind die Hybridisierungseffizienzen ausreichend hoch, wenn die Sonden mindestens 45 % GC-Gehalt besitzen (bei einer Sondenlänge von 20 Nukleotiden und Verwendung von Standardhybridisierungspuffer mit 50 % FA). Weiterhin spielt auch die Lage der GC-Bereiche innerhalb der Sonde eine Rolle. GC-Paarungen am 5'-Ende, also in der Nähe der Oberfläche des Chips zeigen geringere Auswirkungen auf die Bindungsstärke, als GC-Bereiche im Zentrum der Sonde oder am 3'-Ende. Auch eine ausgeprägte Sekundärstruktur von Sonde und Target kann die Hybridisierung beeinflussen. BODROSSY *et al.* beschreiben die zahlreichen Faktoren, die bei der Entwicklung eines Sondensets mit möglichst einheitlicher Hybridisierungseffizienz eine Rolle spielen [212].

Die Spezifität der Sonde und damit die Vermeidung von Kreuzhybridisierungen, ist ein weiterer wichtiger Punkt bei der Sondenentwicklung. Zum einen können Kreuzreaktivitäten auf Grund sehr ähnlicher Sequenzen verschiedener Spezies und daher zu weniger bzw. nicht günstig positionierter Fehlpaarungen der Sonde mit den Spezies, die nicht detektiert werden sollen, entstehen. Dies ist besonders bei sehr nah verwandten Spezies ein Problem, wie z. B. bei Schaf, Ziege, Reh und den verschiedenen Hirscharten, die sich in ihren

Sequenzen nur wenig unterscheiden. Beispielsweise zeigt sich eine Kreuzhybridisierung von Rothirsch an der Sikahirschsonde, da hier nur eine einzige Fehlpaarung vorliegt. Schaf- und Ziegen-DNA rufen beide eine schwache Kreuzhybridisierung an der Rothirschsonde (Rh629) hervor, da hier jeweils nur zwei Fehlpaarungen vorliegen, von denen eine jedoch ganz am Rand der Sondensequenz liegt und kaum die Hybridisierungseigenschaften beeinflussen kann. Ausserdem können bestimmte Fehlpaarungen teilweise toleriert werden, da die entsprechenden Basen (z.B. G-T) so genannte non-Watson-Crick-Paarungen eingehen können [135]. Weiterhin können unerwartete Kreuzhybridisierungen auf Grund noch nicht näher erklärbarer sekundärer Wechselwirkungen auftreten. Dies findet sich beispielsweise bei der Hybridisierung von Schwein-PCR-Produkt an der alten Ziegesonde (Z684), die trotz neun vorhandener Fehlpaarungen deutlich ausfällt. Insgesamt zeigen sich im DNA-Biosensor jedoch wesentlich weniger Kreuzhybridisierungen, als auf konventionellen DNA-Chips, da bei einem Abwarten der Gleichgewichtseinstellung auch schwachen Wechselwirkungen die nötige Zeit zur Anbindung gegeben wird. PETER [135] deutete in ihrer Arbeit bereits an, dass die Entwicklung weiterer Sonden für die Tierartendifferenzierung durchaus problematisch ist. Für ein Array, das aus einer Vielzahl von Sonden für verschiedene, teilweise sehr ähnliche Spezies bestehen soll, um komplexe Fragestellungen zu beantworten, vermutet sie Schwierigkeiten hinsichtlich der Spezifität der einzelnen Bindungsreaktionen und deutet an, dass diese vermutlich nur bei unterschiedlichen Stringenzbedingungen spezifisch erfasst werden können.

Zur Entwicklung der neuen Sonden wurde unter anderem eine in unserer Arbeitsgruppe von E. FRAUENDORFER entwickelte Matlabroutine verwendet, mit der es möglich ist, über eine Punktbewertung die Lage der Fehlpaarungen innerhalb möglicher Sonden zu beurteilen. Gleichzeitig wird deren GC-Gehalt berechnet und kann somit für das Design der Sonden berücksichtigt werden. Die Sonden wurden auf einen möglichst hohen GC-Gehalt optimiert und sollten mit allen, außer mit der zu detektierenden Spezies ein Mindestmaß an Fehlpaarungen besitzen, die sich möglichst in der Mitte der Sonde befinden sollten. Es zeigte sich, dass es bei einigen Spezies auf Grund hoher Verwandtschaft nur schwer möglich war, genügend unterschiedliche Sequenzbereiche zu finden und gleichzeitig einen hohen GC-Gehalt zu gewährleisten. Demnach wurde eine Reihe neuer Sonden entwickelt, die erfolgreich getestet wurden. Es existieren nun Sonden für die Spezies Rind, Schwein, Pferd, Ziege, Schaf, Huhn, Pute, Büffel, Kaninchen, Hase, Reh, Damhirsch, Rothirsch, Sikahirsch, Mensch und Hund, die alle nebeneinander bei gleicher Stringenz zum Einsatz kommen können.

Das Problem der Kreuzhybridisierung an der alten Ziegesonde (Z684) [135] konnte mit der Entwicklung einer neuen Ziegesonde (Z690) gelöst werden. Diese konnte nun Schaf und Ziege differenzieren und zeigte dabei keine Kreuzhybridisierungen mit anderen Spezies. Die

neue Sonde liegt um sechs Basenpaare verschoben im Vergleich zu der alten Sonde und weist sieben Fehlpaarungen zu Schwein im Vergleich zu vorher neun Fehlpaarungen auf. Die ungünstigen sekundären Wechselwirkungen, die offensichtlich nicht mit der Zahl der Fehlpaarungen zusammenhängen und bei der alten Sonde die Kreuzhybridisierung von Schweine-DNA an der Ziegesonde hervorriefen, treten nun nicht mehr auf.

Die Entwicklung der Reh- und Hirschsonden war besonders anspruchsvoll, da diese Spezies sehr nah verwandt sind. Zusätzlich fiel auf, dass in den Gendatenbanken teilweise unterschiedliche Sequenzen für eine Spezies gefunden wurden, die vermutlich auf regionale Differenzierungen innerhalb einer Art zurückzuführen sind. Dies stellte vor allem bei der Entwicklung der Rothirschsonde ein Problem dar. Die zunächst zugrunde gelegte Rothirschsequenz stimmte nicht genau mit der Sequenz der untersuchten DNA überein. Es trat zufälliger Weise eine Fehlpaarung genau im Bereich der Sonde auf, so dass mit der Rh690-Sonde sehr schlechte Ergebnisse erhalten wurden. Sikahirsch-DNA jedoch hybridisierte sehr gut an dieser Sonde. Nochmalige, ausführliche Datenbankrecherchen zeigten, dass die Sikahirsch-DNA in der Tat keine Fehlpaarung mit der Rh690-Sonde besitzt. Die eigentlich zur Detektion von Rothirsch entwickelte Sonde stellt daher eine ausgezeichnete Sikahirschsonde dar. Auf der Basis eines anderen Gendatenbankeintrags wurde eine neue Rothirschsonde entwickelt (Rh629), die die geforderten Fehlpaarungen zu Reh, Dam- und Sikahirsch aufweist und schließlich sehr hohe Hybridisierungseffizienzen mit Rothirsch-PCR-Produkt zeigte. An dieser Sonde zeigt sich jedoch eine geringfügige Kreuzhybridisierung von Schaf- und Ziegen-DNA (s.o.). Die beschriebenen Diskrepanzen in den Einträgen der Gendatenbanken sind nie auszuschliessen und erst die experimentelle Überprüfung mit Referenz-DNA kann endgültig zeigen, ob eine Sonde wirklich gut geeignet ist. Gerade bei Wildtieren sind solche Polymorphismen im Vergleich mit genetisch durch Züchtung stark selektierten Nutztieren durchaus zu erwarten. Hier bietet sich deshalb auch eine gewisse Redundanz der Sonden an. Auch die gleichzeitig mit der ersten Rothirschsonde an der Position 690 gewählte erste Rehsonde (Re690) lieferte unbefriedigende Ergebnisse. Vermutlich auf Grund eines zu geringen GC-Gehaltes im Sondenzentrum war die Hybridisierungseffizienz sehr schlecht. Eine neue entwickelte Sonde (Re629) mit höherem GC-Gehalt lieferte hingegen sehr gute Ergebnisse.

Effizienz und Spezifität der PCR

Neben der oben beschriebenen Hybridisierungseffizienz hat auch die Effizienz der vorgeschalteten PCR einen Einfluss auf das in der nachfolgenden Analytik detektierte Signal. Nur wenn eine Probe mit hoher Effizienz amplifiziert wird und somit nach der PCR in ausreichend hoher Konzentration vorliegt, kann sie auch gut detektiert werden. Die Spezifität

der PCR beeinflusst ebenfalls das Ergebnis. Ist sie unterschiedlich für verschiedene Spezies, so wird die Zusammensetzung der Probe durch die PCR verändert.

Die PCR-Effizienzen der verschiedenen Spezies konnten bis auf eine Ausnahme so optimiert werden, dass sie sich nicht wesentlich voneinander unterscheiden. Eine schwache Bande in der Gelelektrophorese war immer auf eine geringe Konzentration des Templates zurückzuführen. Eine Ausnahme war Ziegen-DNA. Die Amplifikation von Ziege verlief mit einer geringeren Effizienz, da der Primer CytB403 eine Basenfehlpaarung mit der Template-DNA aufweist, die nicht durch das *Wobbeln* (statistische Basenverteilung an einigen Positionen des Primers) ausgeglichen wurde. Für die meisten Proben war die PCR-Effizienz von Ziege jedoch noch hoch genug, um eine gute Detektion zu gewährleisten. In einigen Käseproben jedoch, in denen nur geringe Spuren von Ziegen-DNA enthalten war, war die Amplifikation problematisch. Hier wurde deshalb statt bei den Standardbedingungen (Annealing bei 60 °C, 35 Zyklen) mit einer etwas geringeren Stringenz gearbeitet. Die Stringenz sollte zwar möglichst hoch gewählt werden, damit die Bildung unspezifischer Nebenprodukte weitestgehend unterdrückt wird, doch zum Nachweis von Ziege-DNA-Spuren wurde die PCR bei 57 °C (45 Zyklen) durchgeführt, da die Primer dann eine höhere Toleranz der Fehlpaarung auf Grund niedrigerer Stringenz zeigen. Eine Entstehung unspezifischer Nebenprodukte wurde nicht beobachtet. Um die PCR-Effizienzen weiter anzugleichen, sollten die Primer optimiert werden. Es könnten z. B. zusätzliche *Wobbel*-Positionen im Primer CytB403 vorgesehen werden. Eine ähnliche Taktik bewährte sich beispielsweise auch bei der Identifizierung zahlreicher Fischarten mittels PCR-RFLP [217]. Weiterhin könnten beim Verdacht auf Ziege für eine bessere Amplifikation der Ziegen-DNA eine kleine Menge des perfekt passenden Ziegen-Primers zum PCR-Ansatz hinzugefügt werden.

Die ursprüngliche Zusammensetzung der Proben-DNA wird durch die PCR verändert. Die Anfangs exponentielle Amplifikation wird im Laufe der Reaktion zunehmend gehemmt. Die Aktivität des Enzyms nimmt trotz Thermostabilität im Laufe der Zeit ab, Nebenprodukte wie Pyrophosphat akkumulieren, ein *Re-Annealing* der denaturierten Einzelstränge nimmt zu und konkurriert mit dem *Annealing* der Primer und die Konzentration der Primer und dNTP's nimmt ab [218]. Die Amplifikationseffizienz sinkt dadurch, die PCR erreicht eine Plateauphase und kommt zum Erliegen. DNA einer Spezies, die in höherer Konzentration in der Probe vorliegt, erreicht die Plateauphase eher, als DNA einer Spezies, die nur in geringer Konzentration vorliegt. Die PCR kann also für die Hauptkomponente schon zum Erliegen gekommen sein, während sie für eine Nebenkomponente noch weitergeht. DNA-Spuren werden daher überproportional amplifiziert. Dies wurde exemplarisch für verschiedene Reh-Rothirsch-Mischungen demonstriert. Beimengungen von 2 % Reh in einer Damhirsch-DNA-Probe lieferten nach der Amplifikation mittels PCR und Messung im DNA-Biosensor beispielsweise ein Signal von 17 % der Hauptkomponente. Die PCR, in dieser

Variante, ist daher nur ein qualitatives Verfahren [219]. Für die nachfolgende Analytik bedeutet das, dass in Bezug auf die Ausgangsprobe vor der PCR maximal semiquantitative Ergebnisse erhalten werden können, unabhängig davon, wie gut sich die Messmethode selbst (hier das Chipexperiment) quantifizieren lässt. Dies kann aber auch von Vorteil sein, da es mit Hilfe der Überamplifikation von Spuren möglich wird, auch noch sehr geringe Mengen einer Nebenkomponente mit dem Analyseverfahren zu erfassen und so deutlich geringere Nachweisgrenzen zu erhalten.

Messung von Realproben im DNA-Biosensor

Aus dem Bereich der Lebensmittelanalytik wurden DNA-Extrakte diverser Fleisch- und Milchprodukte (CVUA, Münster) auf die in ihnen enthaltenen Spezies untersucht. Weiterhin wurden diverse Proben aus forensischen Ermittlungen (Institut für Rechtsmedizin, Münster) analysiert.

Für die DNA-Extrakte der verschiedenen Lebensmittelproben ergab sich eine sehr gute Übereinstimmung mit der Referenzanalytik. Es wurden sowohl Proben, die nur aus einer Spezies bestanden, als auch Mischungen aus bis zu vier Spezies richtig bestimmt. Auffällig war, dass einige der Lebensmittel falsch deklariert waren, bzw. unerwartete Bestandteile aufwiesen, was den dringenden Bedarf an schnellen Kontrollmethoden aufzeigt. Typisch ist z.B. der Zusatz von billiger Kuhmilch zu hochwertigeren Käseprodukten aus Schafs-, Ziegen- oder Büffelmilch. Bei den Proben K-2 und K-12, beide aus Schafskäse extrahiert, wurde sogar ausschließlich Rind-DNA detektiert und demnach entgegen der Deklaration überhaupt keine Schafmilch verarbeitet. Bei den Fleischprodukten findet man beispielsweise Rindfleischzusätze in Lammprodukten (Lammbratwurst, Probe F-11) oder in Geflügelprodukten (Putenbratwurst, Probe F-17). Mit dem neuen SONDENSATZ ist nun auch die Analyse von Pferdefleischprodukten möglich, wie an Hand einiger Proben demonstriert wurde. Wildprodukte können nun ebenfalls getestet werden. Die neue Büffelsonde erweitert den Bereich der Käseanalytik, da auch der hochwertige Mozzarella jetzt analysiert werden kann. Das Anwendungsspektrum des DNA-Biosensors ist somit durch die neuen Sonden erheblich erweitert worden.

Die im CVUA verwendeten Referenzmethoden gestalten sich im Vergleich zum DNA-Biosensor deutlich aufwändiger. Dort ist es nicht möglich mit einer einzigen, standardisierten Methode alle Spezies zu bestimmen, sondern es kommen verschiedene Verfahren zum Einsatz. Fleischproben werden zunächst mit einem ELISA immunchemisch analysiert. Die Spezies Rind, Schwein, Schaf, Pferd und Geflügel können bis zu einem Anteil von 1 % nachgewiesen werden. Eine Differenzierung der verschiedenen Geflügelarten und der Nachweis von Ziege sind so zunächst nicht möglich. Erscheinen Proben im ELISA auffällig, so wird eine tierartenspezifische PCR durchgeführt, bei der Anteile bis zu 0.01 %

nachgewiesen werden können. Damit ist diese Methode für die Praxis teilweise schon zu empfindlich, da auch geringe Kontaminationen, die sich bei der Herstellung ergeben können, noch nachgewiesen werden und zu einer Überinterpretation der Ergebnisse führen können (C. Brünen-Nieweler, CVUA Münster, persönliche Mitteilung). Auch MEYER *et al.* halten eine Nachweisgrenze von 0.1 % für Schwein als ausreichend [152]. Zum parallelen Nachweis von Schaf und Ziege in Käseproben wird am CVUA die tierartenspezifische PCR mittels des CIB-A-Kit und die PCR-RFLP-Methode nach WOLF *et al.* [220] verwendet. Die tierartenspezifische PCR zeigt dabei Kreuzreaktivitäten der Primer, so dass fast ausschliesslich die zeitaufwändigere PCR-RFLP verwendet wird. Oft ist auch hier eine eindeutige Interpretation des Fragmentmusters nicht möglich, so dass vor allem die Bestimmung von Schaf-Ziege-Mischproben häufig Probleme bereitet. Der gleichzeitige Nachweis von Rind mittels PCR-RFLP ist häufig nicht möglich, da die Restriktion hier schwach ist. Daher werden die Käseproben mit dem Casein-ELISA „Ridascreen Cis“ auf Rind getestet und positive Ergebnisse durch tierartenspezifische PCR bestätigt. Für die Wildtiere und Büffel stehen in der Regel keine kommerziellen Tests zur Verfügung, so dass hier nur die PCR-RFLP Methode bleibt.

Eine absolute Quantifizierung der DNA in den Lebensmittelproben war auf Grund der vorgeschalteten PCR nicht möglich. Die Methode liefert jedoch in sofern zumindest semiquantitative Ergebnisse, als dass ein schwaches Signal im Biosensor auf eine Nebenkomponente hinweist, während ein starkes Signal einer Hauptkomponente zuzuordnen ist. Für eine absolute Quantifizierung können beispielsweise *Real-Time*-PCR-Verfahren eingesetzt werden. LAUBE *et al.* entwickelten z.B. ein Verfahren zum Nachweis 0.1 %iger Zumischungen von Rindfleisch in prozessierten Lebensmitteln [221].

Der DNA-Biosensor stellt somit eine einfache und schnelle Methode zur Tierartendifferenzierung in der Lebensmittelanalytik dar. Zudem können alle Proben, unabhängig, ob sie aus Fleisch- oder Käseprodukten isoliert wurden, nach einem standardisierten Verfahren gemessen werden. Einschränkend muß erwähnt werden, dass im CVUA nur etwa 10 % der untersuchten Proben im ELISA auffällig erscheinen und weiter untersucht werden. Der DNA-Biosensor stellt keine Alternative zum sehr viel schnelleren ELISA dar, da hier die zeitaufwändige DNA-Extraktion und Amplifikation nicht nötig sind. Für die Überprüfung der im ELISA auffälligen Proben ist der Biosensor jedoch hervorragend geeignet. Weiterhin eröffnet nur das Arrayformat die Möglichkeit eine Probe ohne Vorüberlegungen zu analysieren. In einer einzigen Analyse kann auf die Anwesenheit einer oder mehrerer (im Rahmen der gewählten Sonden) beliebiger Spezies einer unbekannt Probe geschlossen werden.

Für die Proben aus dem forensischen Bereich ergab sich ebenfalls in den Fällen eine Übereinstimmung mit der Referenzanalytik (Institut für Rechtsmedizin, Münster) in denen die Tierart bestimmt worden war. Dies konnte entweder mittels Sequenzierung oder durch immunologischen Nachweis erfolgt sein. Im Gegensatz zu den Proben aus dem CVUA waren die DNA-Extrakte aus der Rechtsmedizin von einem deutlich geringeren Reinheitsgrad. Besonders die DNA aus Blutspuren war noch stark durch Hämoglobin verunreinigt. Um die dadurch bedingte Inhibition der PCR aufzuheben, wurde bei den forensischen Proben standardmäßig BSA zugegeben. Allgemein war die PCR bei den Proben der Rechtsmedizin problematischer, als bei den Proben der Lebensmittelanalytik. In forensischen Ermittlungen steht oft nur sehr wenig Material zur Verfügung und häufig ist die DNA zudem stark degradiert, wie z. B. in alten, eingetrockneten Blutspuren. Eine Amplifikation war nicht in allen Fällen möglich. Eine Probe aus Erbrochenem konnte z. B. auf Grund zu starker Degradierung der DNA nicht amplifiziert werden. War jedoch die PCR erfolgreich, so konnten die Proben anschliessend auch richtig mit dem DNA-Biosensor bestimmt werden. Es wurde gezeigt, dass auch DNA aus den typischen forensischen Probematerialien wie Blut und Haaren erfolgreich amplifiziert und detektiert werden konnte.

Mit der Erweiterung auf Mensch, Hund und die Wildtiere wurde der neue SONDENSATZ speziell für die forensischen Anwendungen entwickelt. Die häufig erste Frage, ob in einer Probe Mensch positiv oder negativ ist, kann somit schnell beantwortet werden, wobei im negativen Fall gleichzeitig die Spezies genau identifiziert werden kann. Denn häufig sind weitere Informationen als die bloße Differenzierung zwischen Mensch und Tier bei den kriminalistischen Untersuchungen gefragt. Bei Probe RM-7, die aus einem Verkehrsunfall eines Ferraris stammte, war es beispielsweise für die Versicherung wichtig zu wissen, ob ein Weidetier der Auslöser für den Verkehrsunfall war und die Schuld eventuell beim Landwirt lag, oder ob ein Wildtier Unfallverursacher war. Mit der Messung konnte schnell belegt werden, dass es sich um ein Wildtier (Damhirsch) handelte. Auch die Information, dass es sich bei einer Blutspur (RM-10) um Schafblut handelte, kann Hinweise auf den Täter liefern, der eventuell aus einem Kulturkreis stammt, in dem das Schlachten von Schafen üblich ist. Es könnte sich aber auch um einen professionellen Schlachter handeln. Solche Informationen können wertvolle Hinweise für die Ermittler sein.

In der forensischen Analytik wird bislang die Tierartendifferenzierung mittels Sequenzierung oder PCR-RFLP durchgeführt [181, 189, 190]. Beide Verfahren sind relativ zeitaufwändig und insbesondere die PCR-RFLP ist nicht immer eindeutig. In der einschlägigen Literatur wurden Hybridisierungsassays, wie z. B. DNA-Chips, noch nicht für die Tierartendifferenzierung in der forensischen Analytik beschrieben. Sowohl die konventionellen Chips, als auch der DNA-Biosensor könnten jedoch eine schnelle und einfache Möglichkeit für die Untersuchung forensischer Proben darstellen.

DNA-Analytik mit konventionellen DNA-Chips

Der am ICB entwickelte DNA-Biosensor befindet sich noch im Prototypstadium, während die konventionelle DNA-Chiptechnologie gerade Eingang in die unterschiedlichen biowissenschaftlichen Disziplinen findet. Da der für den Biosensor entwickelte SONDENSATZ ebenso auf konventionellen DNA-Chips verwendbar ist, wurde die darauf beruhende Methode der Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln und in der Forensik ebenfalls auf konventionellen DNA-Chips etabliert. Sie steht somit jedem Anwender, der Zugang zu einem Microarray-Scanner besitzt, offen. Im Unterschied zu den in der Expressionsanalyse verwendeten *high-density*-Arrays [83], kommen hier der Aufgabenstellung entsprechenden *low-density*-Arrays zu Einsatz. Es wurden dieselben Sonden wie zuvor für den Biosensor beschrieben immobilisiert. Da die Detektionsfläche auf konventionellen Chips nicht eingeschränkt ist, konnten die Sonden hier jedoch mit deutlich höherer Redundanz aufgebracht werden. Die Spezifität der Sonden wurde wiederum mit Referenz-DNA getestet, wobei sich deutlich mehr Kreuzhybridisierungen zeigten, als im DNA-Biosensor. Dies ist auf die Endpunktsbestimmung im Vergleich zur kinetischen Messung im Sensor zurück zu führen. Alle Kreuzhybridisierungen waren aber schwach und konstant, so dass die Messung der Realproben aus der Lebensmittelanalytik und der Forensik, insbesondere nach Einführung eines cut-off Wertes von 500 counts, nicht beeinträchtigt war.

Der Vorteil des Biosensors gegenüber den konventionellen Chips liegt vor allem in der Zeitersparnis und in der besseren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Beim Biosensor können sehr viele Messungen auf einem Sensorchip durchgeführt werden. Dies führt zu einer sehr guten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, während bei den konventionellen Verfahren für jede Probe ein neuer Chip verwendet werden muss. Die Abweichungen sind entsprechend grösser. Die Endpunkthybridisierung der DNA-Chips ist auch deutlich zeitaufwändiger, als die kinetische Messung im Durchfluss beim Biosensor. Die Probe muss für eine längere Zeit, mindestens eine Stunde, auf dem Array inkubiert werden, worauf noch diverse Waschschriffe folgen, bevor die Fluoreszenz ausgelesen werden kann. Die Bearbeitungszeit beträgt somit etwa 120 min pro Probe gegenüber 5 min im DNA-Biosensor. Ein großer Vorteil der konventionellen Chips ist jedoch, dass hier auch *high-density*-Arrays verwirklicht werden können, in denen bis zu mehreren tausend Sonden-Spots aufgetragen sind. Da die sensitive Fläche im Biosensor begrenzt ist und die Auflösung der Kamera keine beliebig dichte Anordnung der Spots gestattet, können im Biosensor nur *low-density*-Arrays mit etwa 100 Spots verwirklicht werden. Das System ist also nur für Fragestellungen geeignet, die keinen allzu hohen Informationsgehalt benötigen. Dies trifft aber für die meisten diagnostischen Fragestellungen durchaus zu. Tabelle 13 zeigt vergleichend die Vor- und Nachteile beider Methoden [135].

Tabelle 13: Vergleich von konventionellen DNA-Chips und DNA-Biosensor des ICB.

Eigenschaft	Konventionelle DNA-Chips	DNA-Biosensor des ICB
Array	<i>high-</i> und <i>low-density</i>	<i>low-density</i>
Reproduzierbarkeit	ca. 40 %	ca. 5 %
Spezifität	viele schwache Kreuzhybridisierungen	fast keine Kreuzhybridisierungen
Nachweisgrenze	ca. 0.1 %	ca. 0.1 %
Benötigte Menge PCR-Produkt	3.25 µl	4 µl
Durchsatz	1 Messung / Array	20 Messungen / Array
Dauer	120 min	5 min

In der Literatur wird bisher nur ein System beschrieben, das zur Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln eine Kombination aus PCR und Hybridisierungsanalyse verwendet, ein so genannter PCR-ELISA [222]. Das Verfahren beginnt ebenfalls mit der Amplifikation des CytB-Gens mittels Konsensus-PCR. Das PCR-Produkt wird immobilisiert (in der Regel in einer Mikrotiterplatte, event. auch auf Chips) und denaturiert. Die einzelsträngige, immobilisierte DNA wird mit tierartenspezifischen Sonden zur Reaktion gebracht. Es folgt die Detektion der Hybridisierung über eine Markierung der Sonde und die Bestimmung der An- oder Abwesenheit einer bestimmten tierischen DNA. Der Hybridisierungsschritt wird hier invers im Vergleich zum ICB-Biosensor oder den DNA-Chips durchgeführt, da hier das PCR-Produkt immobilisiert wird und danach eine Sonde zur Detektion zugegeben und hybridisiert wird. Das Verfahren entspricht genau dem in unserer Arbeitsgruppe zuvor entwickelten PCR-ELISA zum Nachweis von gentechnisch veränderten Pflanzen [223] bzw. von Salmonellen. Der PCR-ELISA ist deutlich zeitaufwändiger als die Chipexperimente, da auf die Amplifikation noch die Immobilisierung der Proben-DNA und insbesondere diverse Inkubations- und Waschschriffe folgen. Für den Biosensor des ICB können hingegen, wie auch für konventionelle Chipexperimente, diverse Chips mit unterschiedlichen Sonden vorbereitet und gelagert werden. Bei Bedarf wird die Probe amplifiziert und direkt gemessen. Ein Verfahren für ein konventionelles DNA-Chip-Experiment nach Amplifikation des CytB-Gens wurde im CarnoCheck-DNA-Chip der Firma Greiner Bio-one (Frickhausen) verwirklicht. Der Kit kann zum semiquantitativen Nachweis von acht Tierarten in Nahrungs- und Futtermitteln eingesetzt werden. In der Literatur sind bisher keine Daten und Informationen zur Anwendung des Systems zu finden.

Ausblick

Da gezeigt werden konnte, dass die Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln und in der Forensik sowohl auf konventionellen DNA-Chips, als auch mit dem ICB-Biosensor schnell und einfach durchzuführen ist, sollte die Methode noch auf weitere Spezies erweitert werden. Bisher wurde beispielsweise die gesamte Gruppe der Fische noch nicht berücksichtigt. Bei den Fischen gibt es eine große Vielzahl von Arten, die nur über eine parallele Analysetechnik wie der Chiptechnologie unterschieden werden können. Gerade bei filetierten oder stark verarbeiteten Fischprodukten steht durchaus zu erwarten, dass Beimengungen minderwertiger Fischarten in der Praxis vorkommen. Für die Geflügel sollte der SONDENSATZ noch um die Spezies Gans und Ente erweitert werden. Gans- und Enten-Produkte müssen zwar seltener überprüft werden, da sie meist nicht verarbeitet, sondern am Stück verkauft werden, jedoch zeigt sich z. B. bei Gänseleberpasteten oder vergleichbaren Produkten durchaus ein Bedarf. Exotische Tiere werden für die Lebensmittelanalytik ebenfalls zunehmend interessant, so dass z.B. Sonden für Känguruh oder Strauss nützlich wären. Hierbei wäre jedoch auch noch weitere Entwicklungsarbeit an den Konsensus-Primern nötig, da schon gezeigt werden konnte, dass Känguruh mit den derzeitigen Primern nicht amplifizierbar ist. Perspektivistisch dürfte die Allergendiagnostik als spezieller Bereich der lebensmittelanalytischen Tier- und Pflanzenartendifferenzierung interessant werden, da hier nicht nur wirtschaftliche Erwägungsgründe (Verfälschungen) eine Rolle spielen, sondern ein echtes Risiko für bestimmte Verbraucher vorliegt. Für die Forensik wären auch Sonden für Katze und Ratte von Nutzen, da diese Tiere sich gerne in der Nähe von Menschen aufhalten und zu untersuchende Spuren eventuell von ihnen stammen könnten (z.B. Frass an Toten, unbekannte Haarspuren etc.). Insbesondere im Bereich der forensischen Analytik sollte noch eine Vielzahl weiterer Realproben gemessen werden, um die bisher in diesem Bereich noch wenig bekannten Chiptechnologien weiter zu etablieren.

4.3 Verwendung der neuen Fluorophore im Biosensor und auf DNA-Chips

Nachdem das biologische Modellsystem optimiert und charakterisiert worden war, konnten die neuen *spiro*-Cyanine erfolgreich sowohl im DNA-Biosensor, als auch auf konventionellen DNA-Chips eingesetzt werden. Als realistisches DNA-Target wurde Damhirsch-DNA während der PCR durch Zugabe von Aminoallyl-dUTP zum PCR-Mix mit reaktiven Aminogruppen modifiziert. Die PCR-Produkte wurden mit den Farbstoffen Cy5, Oy656 und dem Piperidylfarbstoff Pip markiert. Die Eigenschaften der Konjugate werden ausführlich in Kapitel 4.1 diskutiert.

Die markierte DNA wurde dann auf konventionellen Chips und im Biosensor hybridisiert. Vor den Messungen wurden die Lösungen jeweils auf gleiche Farbstoffkonzentrationen eingestellt, so dass die unterschiedlichen Markierungsgrade nicht ins Gewicht fielen. Im Biosensor wurden mit Pip ebenso gute Ergebnisse erhalten, wie mit Cy5, während Oy656 deutlich schwächere Signale (nur etwa 30 %) lieferte. Auf konventionellen DNA-Chips, bei denen im Gegensatz zum Biosensor die Festphasenfluoreszenz ausgelesen wird, zeigte Pip sogar erheblich höhere Signale als Cy5 (etwa 40 %). Oy656 zeigt hingegen nur einen Bruchteil des Signals von Pip (20 %).

Auf Grund seiner höheren Wasserlöslichkeit und der innovativen Kopplungsart zeigt Pip deutlich bessere Fluoreszenzeigenschaften, als Oy656. Dies machte sich auch in den Hybridisierungsassays bemerkbar. Der Anstieg der Fluoreszenz des Farbstoffes bei Kopplung an DNA führte zu gut fluoreszierenden Konjugaten und damit zu starken Signalen in den beiden getesteten DNA-Bioassays. Weiterhin zeigte Pip schon beim einfachen Spotten des DNA-Konjugates auf Chips die Besonderheit einer erhöhten Festphasenfluoreszenz, die sich auch in den konventionellen DNA-Chip-Experimenten widerspiegelt, in denen Pip sogar dem kommerziellen Farbstoff Cy5 überlegen war.

Schon dieser erste getestete Piperidylfarbstoff erwies sich in seiner Verwendung in der DNA-Chiptechnologie insgesamt als vergleichbar gut, wie Cy5. Weitere Optimierungen, wie das Anbringen einer Vielzahl von Sulfonsäuregruppen oder hydrophiler Linker zum Biomolekül sollten noch zu deutlich besseren Ergebnissen führen. Die neu entwickelte Klasse der *spiro*-Piperidylcyanin-Fluorophore stellt eine als Biomarker hervorragend geeignete Klasse von Fluoreszenzfarbstoffen dar. Der Farbstoff Pip und weitere, noch zu synthetisierende, hydrophilere Derivate dieser Grundstruktur sollten auch in anderen Bereichen der DNA-Analytik getestet werden. Interessant wäre beispielsweise die Kopplung mit Hilfe der Phosphoramidit-Chemie, um die Probleme bei der Post-PCR-Markierung durch Verwendung entsprechend markierter Primer zu umgehen. In dieser Arbeit wurden bereits erste Versuche zur Synthese von Phosphoramidit-Derivaten der *spiro*-Cyanine durchgeführt (Ergebnisse nicht gezeigt), bei denen die Alkohol-funktionalisierten Farbstoffe mit 2-Cyanoethyl-N,N-diisopropylchlorophosphoramidit umgesetzt werden sollten. Die Synthesen waren bisher jedoch nicht erfolgreich und scheinen nicht ohne weiteres möglich zu sein.

Weiterhin böte sich eine Kopplung der neuen Farbstoffe an Proteine an, um ihre Verwendung in der Proteinanalytik zu testen. Die außergewöhnlichen Fluoreszenzeigenschaften der Pip-Farbstoffe lassen auch in der Proteinanalytik noch großes Potential vermuten.

5 Zusammenfassung

Auf der Basis der Oysterfarbstoffe (Denovo Biolabels), einer Klasse neuer Cyanine mit charakteristischen *spiro*-Cyclohexylgruppen an der 3-Position der Indole, wurde eine Vielzahl weiterer neuer *spiro*-Cyanin-Fluorophore synthetisiert. Die sterisch anspruchsvollen *spiro*-Substituenten in 3-Position der Indole sollten Wechselwirkungen der Farbstoffmoleküle untereinander und mit dem Biomolekül, die Tendenz Aggregate zu bilden und die damit verbundene Fluoreszenzlöschung vermindern. Von den in dieser Arbeit synthetisierten Farbstoffen zeigen besonders die *spiro*-Piperidylcyanine mit ihren vorteilhaften Fluoreszenzeigenschaften großes Potential als Biomarker für unterschiedliche Anwendungen.

Die Synthese der Piperidylfarbstoffe stellte sich relativ komplex dar und die richtige Wahl der Schutzgruppen war essentiell für den Erfolg. Vor allem die Quaternierung der Cbz-geschützten Indole war ein schwieriger Syntheseschritt und zeigte als Nebenreaktion immer ein teilweises Abspalten der Schutzgruppe. Sulfonylierte Indole konnten überhaupt nur dann quaterniert werden, wenn als Gegenion das tert-Butylammoniumkation eingeführt wurde. Synthesewege, bei denen erst am fertigen Farbstoff die Schutzgruppe von der reaktiven Aminofunktion im Piperidylring entfernt wird, waren wenig erfolgreich. Die Cbz-Schutzgruppe war nicht zu entfernen, ohne auch das empfindliche chromophore Gerüst des Farbstoffes zu zerstören. Ein Schutzgruppenwechsel zu Boc war problematisch, da diese sterisch sehr anspruchsvolle Schutzgruppe die Kopplung der Indolgruppen zum Farbstoff stark beeinträchtigte. Mit der Moz-Schutzgruppe konnten hingegen erfolgreich Piperidyl-Farbstoffe synthetisiert werden, bei denen die Schutzgruppe erst am Ende der Synthese entfernt wird. Dies erlaubte es, die unterschiedlichen Derivatisierungen erst im letzten Schritt vorzunehmen, so dass der Farbstoff an sich vielseitig verwendbar blieb. Da die Ausbeuten bei der Synthese der Moz-geschützten Farbstoffe jedoch eher mäßig waren und die Synthese durch den Schutzgruppenwechsel unnötig lang war, wurde auch eine andere Strategie verfolgt. Die quaternierten Indole wurden von der Cbz-Schutzgruppe befreit und am Piperidin mit Bromessigsäure alkyliert. Nach der Kopplung zum Farbstoff konnte an der Carbonsäurefunktion weiter derivatisiert werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass das Fluorophor auch über diese Säurefunktion, also über die 3-Position des Indols, an das Biomolekül angebunden werden kann, was im Vergleich zur üblicherweise durchgeführten Kopplung über die 1-Position des Indols eine innovative Methode mit unerwarteten Eigenschaften darstellt. Die Synthesestrategie der *spiro*-Piperidylcyanine wurde auf die Synthese der *spiro*-Cyclopentylcyanine übertragen. Diverse Farbstoffe mit *spiro*-

Cyclopentylgruppen in roter und blauer Form konnten dargestellt und charakterisiert werden. Auch Farbstoffe, die nur auf einer Seite eine Indolkopfgruppe tragen, auf der anderen jedoch eine Benzoxazol-, Benzthiazol-, Pyridin- oder Chinolingruppe wurden erfolgreich synthetisiert und charakterisiert, zeigten aber relativ schlechte Fluoreszenzeigenschaften.

Die neuen Fluorophore wurden zunächst als freie Farbstoffe vergleichend zu Cy5 und Oy656 charakterisiert. Es zeigte sich, dass der sterische Anspruch der Substituenten in 3-Position des Indols einen Einfluss auf die Eigenschaften der Farbstoffe besaß. Mit steigendem sterischen Anspruch der Substituenten wurde das Absorptionsmaximum bathochrom verschoben. So zeigte Oy656 mit den *spiro*-Cyclohexylgruppen ein langwelligeres Absorptionsmaximum (656 nm), als die neuen Cyclopentylfarbstoffe (651 – 653 nm), während Farbstoffe ganz ohne *spiro*-Substituenten (z. B. Cy5, 647 nm) die kurzwelligsten Absorptionsmaxima zeigten. Da Farbstoffe mit nur einer *spiro*-Gruppe stets kurzwelliger absorbierten, als solche mit zwei *spiro*-Gruppen, lag der Fokus auf der Synthese von mono-*spiro*-Cyaninen. Ein möglichst kurzwelliges Absorptionsmaximum ist von Vorteil, weil die Farbstoffe dann besser im Anregungsbereich typischer Standardlaser, z. B. der roten Laserdiode (635 nm), liegen. Mit Hilfe einiger Modellrechnungen konnte mangelnde Planarität des π -Systems der Moleküle als Ursache für die bathochrome Verschiebung bei steigendem sterischen Anspruch der Substituenten ausgeschlossen werden. Vielmehr sind Änderungen in den C-C-Bindungsabständen im Polyenteil für den Shift verantwortlich.

Die intrinsische Fluoreszenz war für Farbstoffe mit sterisch anspruchsvollen Substituenten ebenfalls geringer, als für nicht substituierte Farbstoffe. Oy656 zeigte eine geringere Fluoreszenz als die Cyclopentylfarbstoffe, welche wiederum schlechter fluoreszierten als Cy5. Alkylsubstituierte Piperidylfarbstoffe zeigten unerwarteter Weise trotz der sterisch anspruchsvollen *spiro*-Substituenten mit Cy5 vergleichbar kurzwellige Absorptionsmaxima (645 – 647 nm) und teilweise eine deutlich bessere intrinsische Fluoreszenz als Oy656, annähernd vergleichbar mit Cy5. Daher und auf Grund ihrer hohen Wasserlöslichkeit schienen die Piperidylfarbstoffe besonders gut als Biomarker geeignet.

Zur weiteren Charakterisierung im Vergleich zu Cy5 und Oy656 wurde der alkylsubstituierte Piperidylfarbstoff Pip an DNA gekoppelt. Die Anbindung an die DNA erfolgte bei diesem Farbstoff auf neuartige Weise über die 3-Position des Indols. Mit diesem Konjugat wurden sehr gute Ergebnisse erzielt. Die Fluoreszenz des Pip-Farbstoffes stieg nach Kopplung an DNA auf das Doppelte an, was vermutlich auf eine Stabilisation der planaren Konformation des Farbstoffes durch Wechselwirkungen mit der DNA zurückzuführen ist. Die Konjugate fluoreszierten damit in Lösung fast so gut wie die von Cy5 (85 % bezogen auf Cy5) und deutlich besser als die von Oy656 (49 % bezogen auf Cy5). Die Festphasenfluoreszenz der Pip-Konjugate war sogar um 10 % besser, als die von Cy5, während Oy656 hier ein 40 % geringeres Fluoreszenzsignal zeigte. Dieses Ergebnis ist auf einen noch stärkeren Anstieg

der Fluoreszenz des Pip-Farbstoffes nach Kopplung an DNA (bis zu zehnfach) bei Beobachtung der Festphasenfluoreszenz im Vergleich zur Fluoreszenz in Lösung zurück zu führen.

Mit den Piperidylfarbstoffen wurde eine neue Farbstoffklasse erschlossen, die schon jetzt sehr viel bessere Eigenschaften zeigt, als die bisherigen Oysterfarbstoffe, die Ausgangspunkt der Synthese waren. Zukünftige Optimierungen, wie das Einbringen weiterer hydrophiler Substituenten, sollten zu noch besseren Fluorophoren führen, die auch Cy5 in ihren Eigenschaften als Biomarker deutlich übertreffen könnten.

Die neuen Fluorophore wurden exemplarisch in der DNA-Analytik getestet. Dazu wurde die Tierartendifferenzierung mit Hilfe eines am ICB entwickelten DNA-Biosensors und auf konventionellen DNA-Chips als biologisches Modellsystem etabliert. Ausgangspunkt war ein bereits bestehender Sondensatz von sechs Nutztiersonden (Rind, Schwein, Huhn, Pute, Schaf, Ziege) für die Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln [135].

Zunächst wurde das Biosensor-System des ICB ausführlich charakterisiert, wobei vor allem die gute Reproduzierbarkeit der Messergebnisse (weniger als 1 % Signalverlust pro Messung) und die wesentlich kürzeren Messzeiten (etwa 5 min pro Messung) im Vergleich zur konventionellen DNA-Chiptechnologie auffielen. Zusätzlich zu dem ersten Prototyp des DNA-Biosensor-Chipreaders wurde auch ein zweiter Prototyp charakterisiert, der über einen höheren Automatisierungsgrad verfügte. Probenaufgabe, Regenerations- und Waschschriffe liefen automatisiert und damit besonders schnell ab. Auf Grund des stärkeren Lasers und der empfindlicheren CCD-Kamera lag die Nachweisgrenze mit 5 - 10 pM etwas niedriger, als beim alten Chipreader (10 - 20 pM). In dieser Arbeit gemachte Beobachtungen über Unregelmäßigkeiten im Fluß der hochviskosen Proben und einen durch Interferenzen verursachten etwas höheren Hintergrund können Ausgangspunkt für weitere Verbesserungen sein.

Dem bestehenden Sondensatz wurden weitere Sonden hinzugefügt, die eine differenziertere Untersuchung von Lebensmittelproben ermöglichten. Es konnten nun die Spezies Rind, Schaf, Ziege und Büffel problemlos in Käseproben detektiert werden. Bisher stellte der Nachweis von Ziege häufig ein Problem dar, da unerwartete Kreuzhybridisierungen auftraten. Diese konnten durch die Entwicklung einer neuen Ziegesonde behoben werden. Mit der neuen Pferd-Sonde ist nun auch die Analyse von Pferdefleisch-Produkten möglich. Wildtierprodukte können mit den neuen Sonden für Reh, Dam-, Rot- und Sikahirsch, Hase und Kaninchen analysiert werden. Zahlreiche Realproben des CVUA wurden erfolgreich bestimmt. Das DNA-Biosensorsystem stellt somit eine schnelle und einfache Alternative zu den herkömmlichen Methoden der Tierartendifferenzierung wie PCR-RFLP oder tierartenspezifischer PCR dar.

Außer in der Lebensmittelanalytik wurde das DNA-Biosensor-System auch für forensische Fragestellungen eingesetzt. Hierzu wurden neben den neuen Wildtiersonden zwei weiteren Sonden für Mensch und Hund benötigt. Über die bloße Fragestellung nach der Differenzierung zwischen menschlicher und tierischer DNA hinaus, lieferte der Biosensor im selben Schritt auch die genaue Spezies im Fall von tierischer DNA. Die Kenntnis der Tierart in einer DNA-Spur kann entscheidende Hinweise in einer kriminalistischen Ermittlung liefern. Diverse Realproben (Spuren) des Instituts für Rechtsmedizin wurden erfolgreich analysiert. Die Entwicklung der neuen Sonden war nicht immer unproblematisch. Eine Herausforderung bestand darin, auch bei vielen verschiedenen Spezies die Sonden so zu entwerfen, dass sie möglichst alle bei derselben Stringenz optimal hybridisieren. Bei der großen Ähnlichkeit der Sequenzen einiger untersuchter Spezies war es manchmal schwierig Sequenzbereiche mit genügend Unterschieden zu finden, in denen gleichzeitig der GC-Gehalt groß genug war (45 %). Dabei musste gewährleistet sein, dass sich die Fehlpaarungen im wesentlichen in der Mitte der Sonden befanden. Ein in unserer Arbeitsgruppe von E. FRAUENDORFER geschriebenes Programm unterstützte die Sondenentwicklung.

Da sich der Biosensor des ICB derzeit noch im Prototypstadium befindet, wurden die neuen Tierarten-Sonden auch für Anwendungen auf konventionellen DNA-Chips getestet. Bei Zugang zu einem Array-Scanner kann der neue SONDENSATZ für die Tierartendifferenzierung dann von jedem Anwender genutzt werden.

Auf den konventionellen DNA-Chips zeigten sich auf Grund der langen Hybridisierungszeiten deutlich mehr Kreuzhybridisierungen, als im DNA-Biosensor. Diese waren aber sämtlich schwach und konstant. Bei Einführung eines geringen Schwellenwertes wurde die Messung der diversen Referenz- und Realproben dadurch nicht eingeschränkt. Zahlreiche DNA-Proben aus Käse- und Fleischprodukte konnten erfolgreich auf die in ihnen enthaltenen Spezies überprüft werden. Auch die Messung von forensischen Proben war möglich. Mit der Tierartendifferenzierung auf DNA-Chips wurde eine neue, leistungsstarke Methode in die forensischen Analytik eingeführt.

Schließlich wurden die neuen *spiro*-Piperidylfarbstoffe im DNA-Biosensor des ICB und auf konventionellen DNA-Chips getestet. Dazu wurden Konjugate verschiedener Farbstoffe mit aminoallylmarkiertem Damhirsch-PCR-Produkt hergestellt und Oy656, Cy5 und Pip wurden vergleichend gemessen. Um die unterschiedlichen Markierungsgrade auszugleichen wurden Lösungen mit gleicher Farbstoffkonzentration verwendet.

Im DNA-Biosensor war Pip ebenso gut geeignet wie Cy5, während Oy656 deutlich schlechtere Signale zeigte. Auf konventionellen DNA-Chips lieferte Pip sogar mit Abstand die besten Ergebnisse, um etwa 40 % höhere Fluoreszenzsignale als Cy5, während Oy656 sich

wenig geeignet zeigte. Auf Grund der hohen Fluoreszenz der Pip-DNA-Konjugate, ist der neue *spiro*-Farbstoff hervorragend für Anwendungen in der DNA-Chiptechnologie und im Biosensor geeignet. Die oben beschriebenen guten Fluoreszenzeigenschaften der Pip-DNA-Konjugate bestätigen sich in der Anwendung in diesen beiden Bioassays. Insbesondere für die klassische DNA-Chiptechnologie ist Pip gut geeignet, da sich die hohe Festphasenfluoreszenz der Konjugate auch nach einer echten Hybridisierung beobachten lässt.

Mit den *spiro*-Piperidylfarbstoffen wurde eine völlig neue Farbstoffklasse erschlossen, die ausgezeichnete Eigenschaften als Biomarker zeigt. Weitere Optimierungen der Piperidylfarbstoffe, z.B. das Einführen weiterer hydrophiler Gruppen, sollten zu noch deutlich besser fluoreszierenden DNA-Konjugaten und entsprechend besseren Nachweisgrenzen in den DNA-Assays führen. Ein Einsatz in der Proteinanalytik ist ebenfalls gut vorstellbar und sollte in weiteren Arbeiten getestet werden.

6 Experimenteller Teil

6.1 Geräte, Materialien, Chemikalien

6.1.1 Organisch synthetische Methoden

¹H NMR-Spektroskopie (¹H-NMR):

Die Kernresonanzspektren wurden mit den Spektrometern WM 300 (300.13 MHz), und AMX 400 (400.13 MHz) der Firma Bruker gemessen. Die ¹H NMR-spektroskopischen Daten beziehen sich auf Tetramethylsilan (TMS, $\delta = 0.00$ ppm) als internen Standard.

¹³C NMR-Spektroskopie (¹³C-NMR):

Die Spektrometer WM 300 (75.47 MHz) und AMX 400 (100.61 MHz) der Firma Bruker wurden verwendet. Die Signale des Lösungsmittels wurden als interner Standard eingesetzt.

Massenspektrometrie (MS):

Die Messung der Elektronenspray-Massenspektren (ESI) erfolgte auf einem Quadrupolmassenspektrometer Quattro LC-Z der Firma Micromass.

Ultraviolettspektroskopie (UV/Vis):

Die Elektronenspektren wurden in Quarzküvetten oder in Kunststoff-Einmalküvetten (UVette, Eppendorf, Hamburg) der Schichtdicke 1 cm an dem UV/Vis-Spektrometer Lambda 11 der Firma Perkin Elmer (Weiterstadt) gemessen.

Fluoreszenzspektroskopie (FS):

Die Fluoreszenzspektren wurden an einem Perkin Elmer (Weiterstadt) Luminescence Spektrometer LS 50 B in Quarzküvetten gemessen.

Dünnschichtchromatographie (DC):

Für die Dünnschichtchromatographie wurden mit Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichtete Fertigfolien der Firma Merck (Darmstadt) oder Alugram RP-18W/UV₂₅₄ Folien (0.15 mm) der Firma Macherey-Nagel (Düren) verwendet. Die Detektion der Substanzen erfolgte mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm oder mit Hilfe geeigneter Sprühreagenzien. Es kamen Ehrlich's-Reagenz (1 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd in 25 ml konz. Salzsäure und 75 ml Ethanol) und Ninhydrinlösung (0.3 g Ninhydrin in 100 ml Butanol und 3 ml Eisessig) zum Nachweis von Aminen zum Einsatz. Soweit möglich wurden sämtliche Syntheseprodukte dünnschichtchromatographisch auf ihre Reinheit geprüft.

Säulenchromatographie:

Für die *straight phase* – Säulenchromatographie (SP) wurde Kieselgel 60 der Firma Fluka (Steinheim) (Korngröße 0.063-0.200 mm) verwendet. Die *reversed phase* - Säulenchromatographie (RP) wurde mit LiChroprep RP-18 (Korngröße 40 – 63 μm) der Firma Merck (Darmstadt) durchgeführt. Weiterhin wurde für die Säulenchromatographie Aluminiumoxid 5016A Basic (pH 9.5) der Firma Fluka (Steinheim) verwendet.

Fast performance liquid chromatography (FPLC):

Die Farbstoffe wurden in der Regel mehrfach mittels FPLC (Pharmacia, LKB, GP-10, Pump P-50) über LiChroprep RP-18 (Korngröße 40 – 63 μm) der Firma Merck (Darmstadt) gereinigt.

High performance liquid chromatography (HPLC):

Die HPLC-Chromatogramme wurden an einer Hewlett Packard HPLC, Series 1050 mit dem Fluoreszenzdetektor 1046A gemessen. Wenn nicht anders erwähnt, wurde eine 250 x 4 mm Kromasil (100, C18, 5 μm) Säule der Firma MZ Analysentechnik (Mainz) verwendet.

Lösungsmittel:

Die verwendeten Lösungsmittel wurden nach Standardverfahren gereinigt und getrocknet.

Arbeitstechniken:

Alle hydrolyseempfindlichen Reaktionen wurden unter Argon- oder Stickstoffatmosphäre mit Spritzen- und Septentechnik durchgeführt. Dazu wurden die Apparaturen im Vakuum sorgfältig ausgeheizt und anschließend mit Schutzgas gespült.

6.1.2 Molekularbiologische und analytische Methoden

Geräte:

Analysewaage AT261 Deltarange	Mettler über Fleischhacker (Schwerte)
Blockthermostat BT200	Kleinfeld (Gehrden)
Dispenser Nano-Plotter	GeSiM (Großerkmannsdorf)
Elektrophoresis-Power-Supply-EPS 600	Pharmacia Biotech (Ebersberg)
Fluoreszenzspektrometer LS 50 B	Perkin Elmer (Weiterstadt)
GMS418 Mikroarray-Scanner	MWG Biotech (Ebersberg)
Mikrozentrifuge	Carl Roth (Karlsruhe)
Minigel Twin-Kammer	Biometra (Göttingen)
PAGE Einzelkammer	Werkstatt der Universität Münster
pH-Elektrode Inlab 423	Mettler (Toledo, USA)
pH-Meter 763 Multi Calamatic	Knick (Berlin)
Reinstwasseranlage Seralpur PRO 90 CN	Seral (Ransbach-Baumbach)
Schneidplotter Cutting Pro FC3100-60	Graphtec Europe (Solingen)
Schüttler Vortex Genie 2	Bender & Holbein (Zürich, CH)
Standard Power Pack P25	Biometra (Göttingen)
Sterilgard Sicherheitswerkbank	Baker Company (Sanford, ME, USA)
Thermocycler Hybaid OmniGene	MWG-Biotech (Ebersberg)
Thermomixer 5437	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf (Hamburg)
Ultraschallbad Sonorex Super RK103H	Bandelin (Berlin)
UV-Vis-Spektrometer Lambda 11	Perkin Elmer (Weiterstadt)

Materialien:

CSS-Silylated Slides	CEL Associates (Pearland, USA)
Deckgläschen 20 mm x 20 mm	VWR (Darmstadt)
Mikrotiterplatten mit 384 Kavitäten (PP)	Nunc (Wiesbaden)
PVC 3mm grau	Carl Nolte Technik (Münster)
Transferklebefilm 3M aus Reinstacrylat (50 und 30 µm)	Witte Plusprint (Münster)
vorgereinigte Objektträger (25 x 75 mm)	Sigma Aldrich (Steinheim)
Zentrifugeneinheiten Ultrafree-MC	Millipore (Schwalmbach)

Chemikalien:

Die Chemikalien wurden, wenn nicht anders erwähnt, von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Merck (Darmstadt) und Fluka (Taufkirchen) bezogen und waren von höchstem Reinheitsgrad.

Elektrophorese:

Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 37.5:1(30 % AA)) für PAGE	Carl Roth (Karlsruhe)
puc19-DNA-Marker, Msp I geschnitten	MBI Fermentas (St. Leon Rot)
Loading Dye	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)

PCR:

Biotherm DNA-Polymerase (Taq-Polymerase)	Genecraft (Münster)
dNTPs	Genecraft (Münster)
Aminoallyl-dUTPs	Ambion (Austin, USA)
10 x - PCR-Puffer	Genecraft (Münster)
50 mM MgCl ₂ – Lösung	Genecraft (Münster)

Sonstige Reagenzien:

Ultrahyb Hybridisierungspuffer	Ambion (Austin, USA)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	ICN Biomedicals (Aurora, USA)
Rotiblock 10 x Konzentrat	Carl Roth (Karlsruhe)
Rotisol	Carl Roth (Karlsruhe)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)

Formamid (FA) wurde ausschließlich in deionisierter Form eingesetzt. Die Deionisation wurde mittels des Ionentauschers AG 501-X8 Resin von Bio-Rad (München) durchgeführt.

Sämtliche Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen. Die Konzentration wurde durch Absorptionsspektroskopie bei 260 nm überprüft. Alle Sonden-Oligonukleotide wurden 5'-Amino-modifiziert eingesetzt mit einem C12-T8- bzw. einem C12-T15-Spacer zwischen Aminogruppe und Sondensequenz. Die Target-Oligonukleotide trugen jeweils am 5'-Ende eine Cy5-Markierung. Im Anhang finden sich Übersichten über die Oligonukleotide, welche bei den Untersuchungen am DNA-Biosensor und auf konventionellen DNA-Chips eingesetzt wurden.

Folgende Puffer bildeten die Grundlage für zahlreiche Arbeitsschritte:

0.5xUH/50%FA (Standardhybridisierungspuffer) ¹⁾	50 % (v/v) Ultrahyb 25 % (v/v) Formamid 25 % (v/v) Bidest-Wasser
10xTBE (Tris-Borsäure-EDTA-Puffer, pH 8.5)	890 mM TRIS Base 890 mM Borsäure 20 mM EDTA
20xSSC (Citrat gesättigte Kochsalzlösung, pH 7)	3 M NaCl 0.3 M NaCitrat
Deaktivierungspuffer (pH 8.5)	0.1 M NaHCO ₃ 1 % (m/v) 6 Aminohexansäure 0.1 % (m/v) SDS
Regenerierungslösung ²⁾	0.125 NaOH 0.05 % Tween 20
Waschpuffer (pH 7.5)	0.5 x SSC 0.1 % (m/v) SDS
PBS (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung, pH 7.4)	8.04 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 1.47 mM KH ₂ PO ₄ 145 mM NaCl

¹⁾ Ultrahyb enthält bereits 50 % Formamid, so dass der Standardhybridisierungspuffer eine Endkonzentration von 50 % (v/v) Formamid aufweist.

²⁾ Die Regenerierungslösung wird vor jeder Messung frisch aus NaOH- und Tween-Stammlösungen angesetzt.

6.1.3 Referenz- und Realproben zur Tierartendifferenzierung

DNA-Extrakte von Referenzmaterialien, bestehend aus einer reinen Spezies, und DNA-Extrakte von Realproben aus diversen Fleisch- und Milchprodukten wurden aus den laufenden Überprüfungen des Chemischen Landes- und Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt (CVUA) Münster erhalten. Für die Extraktionen wurde dort entweder der Wizard-Kit (Promega, Mannheim) oder der Cibus-Kit (Cibus Biotech, Güterloh) verwendet.

Weiterhin wurden DNA-Extrakte von Referenzmaterialien und Realproben vom Institut für Rechtsmedizin der Universität Münster bereitgestellt. Das Extrakt aus Menschenblut wurde mit dem NucleoSpin Blood-Kit (Macherey-Nagel, Düren) hergestellt. Weitere Extrakte wurden mit einer einfachen Standard DNA-Extraktionsmethode (Proteinase K, Chelex,) hergestellt, wobei die DNA in einem weniger hohen Reinheitsgrad erhalten wird und die Lösungen in der Regel gelb-braun gefärbt und trüb sind. Teilweise wurden die Proben noch mittels Ultrafiltration (Microcon) nachgereinigt.

Das CVUA führte zu allen Proben eine Referenzanalytik mit unterschiedlichen Methoden durch.

Die DNA-Extrakte von Nutztier-Fleischproben wurden zunächst mit einem ELISA-Test zum Nachweis von Tierarten in erhitzten Fleischwaren (Transia, Ober-Mörlen) immunchemisch analysiert. Für Spezies, die im ELISA auffällig erschienen, wurde eine tierartenspezifische PCR mit dem Ciba-A-Kit (Cibus Biotech, Gütersloh) durchgeführt. Für den Nachweis der Wildtiere kam die PCR-RFLP zum Einsatz, bei der nach WOLF *et. al.* [217] aus dem *cytb*-Gen ein 464bp-Produkt erhalten und anschließend verdaut wird.

Der Nachweis von Schaf, Ziege und Büffel in Käseproben wurde ebenfalls mit der PCR-RFLP-Methode durchgeführt. Der Nachweis von Ziege war dabei jedoch nicht immer eindeutig möglich. Der Nachweis von Rind in Käseproben erfolgte mit dem Casein-ELISA „Ridascreen Cis“ (R-Biopharm, Darnstadt). War das Ergebnis auffällig, wurde eine tierartenspezifische PCR durchgeführt.

Im Institut für Rechtsmedizin wurden die Proben auf unterschiedliche Arten analysiert. Die Unterscheidung zwischen Mensch und Tier erfolgte über die Hybridisierung mit Primatenspezifischen Sonden (QuantiBlot-Kit, ACTBP2-PCR). Als positiv-Nachweis wurde teilweise eine humanspezifische PCR durchgeführt. Zur Tierartendifferenzierung kamen serologische Verfahren (Antikörper vermittelt, Cross-Elektrophorese) und *CytB*-Sequenzierung und anschließender Abgleich mit BLAST zur Anwendung.

Die folgenden Tabellen enthalten weitere Angaben zu den Referenz- und Realproben. Die DNA-Extrakte wurden bis zur Amplifikation bei -20 °C gelagert

Tabelle. 14: Genomische Referenz-DNA der einzelnen Spezies.

Probennummer	Quelle	Spezies
R-1	CVUA	Huhn
R-2	CVUA	Pferd
R-3	CVUA	Pute
R-4	CVUA	Rind
R-5	CVUA	Schaf
R-6	CVUA	Schwein
R-7	CVUA	Ziege
R-8	CVUA	Rothirsch
R-9	CVUA	Damhirsch
R-10	CVUA	Reh
R-11	CVUA	Sikahirsch
R-12	CVUA	Springbock
R-13	CVUA	Hase
R-14	CVUA	Wildkaninchen
R-15	CVUA	Hauskaninchen
R-16	CVUA	Wildschwein
R-17	CVUA	Sitatunga Antilope
R-18	CVUA	Riesenkänguruh
R-19	CVUA	Büffel
R-20	CVUA	Wildente
R-21	CVUA	Gans
R-22	Rechtsmedizin	Mensch
R-23	Rechtsmedizin	Hund

Tabelle 15: Zusammensetzung der Realproben-DNA-Extrakte von Fleischprodukten.

Probennummer	Bezeichnung	Tierarten laut CVUA
F-1	Hähnchen-Döner	Huhn
F-2	Hähnchen-Döner	Huhn
F-3	Hähnchenfleisch-Döner	Huhn
F-4	Döner-Kebap	Huhn
F-5	Putenmedaillons	Pute
F-6	Mettwurst	Schwein
F-7	Fleischwurst	Schwein
F-8	Rostbratwurst	Schwein
F-9	Würstchen	Schwein
F-10	Döner Kebap	Rind
F-11	Lammbratwurst	Rind, Schaf
F-12	Truthahnbrust gefüllt	Pute
F-13	Thüringer Mett v. Schwein	Rind, Schwein
F-14	Hot Dog	Schwein, Huhn
F-15	Fleischwurst	Rind, Schwein, Huhn, Pute
F-16	Rostbratwurst	Schwein, Pute
F-17	Putenbratwurst	Rind, Schwein, Pute
F-23	Brühwurst A	Schwein
F-24	Brühwurst B	Rind, Schwein, Huhn, Pute
F-25	Leberwurst A	Rind, Schwein, Pute
F-26	Leberwurst B	Schwein
F-27	Echt ungarische Salami	Pferd negativ
F-28	Knoblauchwurst	Pferd negativ
F-29	Truthahn Salami	Pferd negativ
F-30	Echt ungarische Salami	Pferd negativ
F-31	org. französische Ringsalami	Pferd negativ
F-32	Fleischwurst mit Bärlauch	Pferd negativ
F-33	Kordelsalami	Pferd negativ
F-34	Geflügelleberwurst	Pferd negativ
F-35	Salami pur porc	Pferd negativ
F-36	Pferdesalami	Pferd
F-37	Rehkeule	Reh
F-38	Wildschweinbraten	Wildschwein
F-39	Hasenkeule	Hase
F-40	Hirschmedallions	Rothirsch
F-41	Hirschkeule	Rothirsch

Tabelle 16: Zusammensetzung der Realproben-DNA-Extrakte von Käseprodukten.

Probennummer	Bezeichnung	Tierarten laut CVUA
K-1	Schafskäse 1	Rind, Ziege
K-2	Schafskäse 2	Rind
K-3	Schafskäse 3	Rind, Schaf, Ziege (?)
K-4	Picodon (Ziegenkäse)	Rind, Ziege
K-5	Ziegenfeta (zertifiziert)	Ziege
K-6	Ziegenfeta + 10 % Kuhmilch	Ziege, Rind nicht nachgewiesen
K-7	Mozzarella	Büffel
K-8	griechischer Schafskäse	Schaf
K-9	Feta aus Schafs- und Ziegenmilch	Schaf, Ziege, Rind
K-10	original Feta in Salzlake	Schaf, Ziege, Rind
K-11	Schafskäsecreme	Schaf, Rind, Ziege
K-12	Schafskäse 4	Rind
K-13	spanischer Schafskäse	Schaf, Ziege, Rind
K-14	Ziegenkäse	Ziege, Rind, Schaf
K1-15	sardinischer Schafskäse	Schaf

Tabelle 17: Realproben aus der Rechtsmedizin.

Probennummer	Bezeichnung	Tierarten laut RM
RM-1	Ziegenhaar	Ziege
RM-2	Rehhaar	Reh
RM-3	Hirschhaar	Hirsch
RM-4	Ziegenspeichel	Ziege
RM-5	Rehblut	Reh
RM-6	Hirschblut	Hirsch
RM-7	Haarprobe aus Verkehrsunfall	ungeklärt
RM-8	Gewebeprobe, Muskelfleisch	Mensch negativ
RM-9	Blutprobe aus Blutlache	Schaf
RM-10	Blutprobe aus Blutlache	Mensch negativ
RM-11	Gewebeprobe aus Erbrochenem	nicht charakterisierbar

6.2 Molekularbiologische Methoden

6.2.1 Sequenzdatenverarbeitung

Die Sequenzen des *cytb*-Gens der verschiedenen analysierten Spezies wurden mit dem Programm *ClustalX Multiple Sequence Alignment Program* (Version 1.8, The National Center for Biotechnology Information (NCBI), erhältlich unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) abgeglichen. Der daraus resultierende Sequenzvergleich findet sich im Anhang und war Vorlage bei der Konzeption der verwendeten Primer und Sonden. Zum Abgleich zwischen einzelnen Sequenzen kam dabei außerdem der *BLAST*-Algorithmus (NCBI, ebenda online verfügbar) zum Einsatz. Die Sondensequenzen wurden mit Hilfe des *Oligonukleotide Properties Calculator* (<http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html>) auf Sekundärstrukturen und Selbstkomplementarität untersucht. Weiterhin kam eine Matlabroutine, die im Arbeitskreis Prof. K. Cammann von E. Frauendorfer entwickelt wurde, zum Einsatz. Dieses Programm wird ausführlich in Kapitel 3.4.2.1 beschrieben.

6.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Standard-Konsensus-PCR zur Amplifikation des mitochondrialen *cytb*-Gens der verschiedenen untersuchten Spezies wurden die universellen Primer *cytb403* und *Cy5cytb779* (vergl. Anhang) eingesetzt. Ein PCR-Ansatz enthielt dabei in der Regel 1x-PCR-Puffer, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 400 nM Primer *cytb403*, 400 nM Primer *Cy5cytb779*, 0.02 U/µl Polymerase und 1 µl *Template*-DNA. Bei nicht weiter aufgereinigten Proben der Rechtsmedizin wurde außerdem BSA (20 µg) zugesetzt. Das finale Reaktionsvolumen von 25 µl wurde durch Auffüllen mit vollentsalztem (VE) Wasser erhalten. Als preiswerte DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* wurde Biotherm™ *Taq* verwendet. Die Reaktionen wurden in dünnwandigen 600 µl-Reaktionsgefäßen (Genecraft, Münster) in Thermoblöcken mit Deckelheizung durchgeführt. Dabei wurde das folgende Temperaturprogramm durchlaufen:

- Initiale Denaturierung: 94°C / 3 min
- 35 Zyklen, jeweils: 94°C / 30 s, 60°C / 30 s, 72°C / 60 s
- Finale Elongation: 72°C / 3 min
- Abkühlphase: 30°C / 15 min, dann RT

Sofern nicht anders bei den Ergebnissen angemerkt, wurden die Amplifikationen unabhängig von der Art der eingesetzten *Template*-DNA unter den genannten Bedingungen durchgeführt. Die *Template*-DNA-Lösungen wurden dabei normalerweise unverdünnt eingesetzt und nicht auf eine bestimmte Konzentration eingestellt.

Zur Herstellung von PCR-Produkt-Pools einzelner Spezies wurde ein mindestens 10facher Reaktionsansatz („Mastermix“) einschließlich der jeweiligen Referenz-*Template*-DNA angesetzt und in 25µl-Aliquots zur Reaktion gebracht. Nach Analyse durch Polyacrylamid-gelelektrophorese wurden die Ansätze mit guter Ausbeute vereint.

6.2.3 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch unter Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe mittels vertikaler PAGE analysiert. Für die Differenzierung zwischen Fragmentgrößen von ca. 30-500 bp wurde standardmäßig die folgende Zusammensetzung des Gels gewählt: 10 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid-Gemisch (37.5:1), 0.2 % (v/v) N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin, 0.08 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat, 1x TBE. Die Gele wurden in Glaskassetten der Größe 8.5 cm x 7.5 cm x 0.1 cm mit 10 Taschen pro Gel hergestellt. Üblicherweise wurde 1 µl PCR-Produkt in 2 µl Probenpuffer (0.125 % (w/v) Bromphenolblau, 0.125 % (w/v) Xylencyanol FF, 30 % (v/v) Glycerin in 25 mM EDTA) sowie der pUC19-DNA-Marker als Referenz im Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese in 1x TBE wurde das Gel ca. 2 min in einer Färbelösung (0.5 µg/ml Ethidiumbromid) und im Anschluss 10 min in einem Wasserbad inkubiert, bevor die DNA-Banden dann im UV-Licht (Transilluminator) sichtbar gemacht wurden. Photographien der Gele werden in dieser Arbeit farbinvertiert dargestellt.

6.2.4 Markierung von PCR-Produkten mit Fluorophoren

Alternativ zur Markierung der PCR-Produkte durch Einbau von Cy5-markierten Primern während der PCR erfolgte eine nachträgliche Markierung mit den gewünschten Farbstoffen. Dazu wurde während der PCR 50 % des dTTP in der dNTP-Mischung durch Aminoallyl-dUTP (Ambion, Austin, USA) ausgetauscht, so dass das erhaltene PCR-Produkt Aminoallyl-modifiziert vorlag. Der Primer Cy5cytb779 wurde entsprechend durch den nicht-markierten Primer cytb779 ersetzt. Das Aminoallyl-PCR-Produkt wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) gereinigt. Es wurden jeweils 3 PCR-Ansätze (75 µl) auf eine Säule gegeben und die Reinigung nach Herstellerangabe durchgeführt. Die Elution des

gereinigten PCR-Produktes erfolgte mit 50 μl bidest-Wasser. Es folgte eine Kontrolle der Ausbeute mit Absorptionsspektroskopie. Das PCR-Produkt wurde in der speed-vac nahezu zur Trockene eingengt und anschließend in 7.5 μl bidest-Wasser aufgenommen. Zur Markierung wurden 20 μmol des entsprechenden Farbstoffes in 15 μl Natriumhydrogencarbonatlösung (0.1 M, pH 9) gelöst und 7.5 μl dieser Lösung wurden zur DNA gegeben. Die Mischung wurde im Dunkeln 1 h bei 30 °C inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte erneut mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach Standardvorschrift. Eluiert wurde einmal mit 30 μl und zur Sicherheit noch einmal mit 50 μl bidest-Wasser. Die Ausbeute und der Markierungsgrad wurden mit Hilfe der Absorptionsspektroskopie bestimmt.

6.3 Charakterisierung der Fluorophore und Konjugate

6.3.1 Absorptionsspektren

Die Farbstoffe bzw. die Farbstoff-DNA-Konjugate wurden in den entsprechenden Lösungsmitteln gelöst und die Absorption in der Regel von 220 bis 800 nm bestimmt.

Für die Messung der Absorptionsspektren von Farbstofflösungen standen preiswerte Einwegküvetten aus Kunststoff (PMMA) mit verschiedenen Volumina (1ml – 100 μl), Schichtdicke 1 cm, für Messungen ausschließlich im Vis-Bereich zur Verfügung (z.B. Plastibrand, Brand, Wertheim). Weiterhin standen für die Messungen der Konjugate sterile 50 μl Einwegküvetten, Schichtdicke 1 cm, der Firma Eppendorf (Hamburg) zur Verfügung. DNA-Farbstoff-Konjugate, die in sterilen Küvetten gemessen wurden, wurden später auch für weitere Arbeiten verwendet. Nach Messung in nicht sterilen Küvetten wurden die Lösungen in der Regel verworfen.

6.3.2 Emissions- und Anregungsspektren

Die Messung von Emissions- und Anregungsspektren erfolgte an einem LS50B Fluoreszenzspektrometer der Firma Perkin Elmer (Weiterstadt). Wenn nicht anders erwähnt, wurden sämtliche Spektren im Fluoreszenzmodus mit dem Detektor R928 bei automatischer Spannungseinstellung und einer Scanspeed von 400 nm/min aufgenommen. Variiert wurden jeweils die Anregungs- bzw. Detektionswellenlängen und die Breite der Ex- und Em-Spalte, so dass optimale Spektren erhalten wurden.

Beim Vergleich der Fluoreszenzintensität verschiedener Lösungen untereinander wurden diese zunächst auf dieselbe Absorption eingestellt (häufig $A = 0.1$), um annäherungsweise

gleich konzentrierte Lösungen zu erhalten. Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte dann für alle Proben bei denselben Einstellungen der Ex- und Em-Spalten.

6.3.3 Festphasenfluoreszenz

Zur Bestimmung der Festphasenfluoreszenz der Farbstoffe und Konjugate wurden Lösungen mit gleicher Absorption hergestellt, um ähnlich konzentrierte Lösungen vorliegen zu haben. Die Lösungen wurden mit einem Dispenser Nano-Plotter (GeSiM, Großerkmannsdorf) in Form von Arrays auf gereinigte Objektträger gespottet. Jede Probe wurde dabei dreimal pro Array, bei vier Arrays pro Metaarray und zwei Metaarrays pro Chip gespottet, um eine bessere Vergleichbarkeit zu erhalten (Abb. 74). Die Objektträger wurden über Nacht zum Trocknen im Dunkeln aufbewahrt und am folgenden Tag wurde mit einem Mikroarray-Scanner (MWG-Biotech, Ebersberg) die Fluoreszenz ausgelesen und ausgewertet (vergl. Kap. 6.5.2).

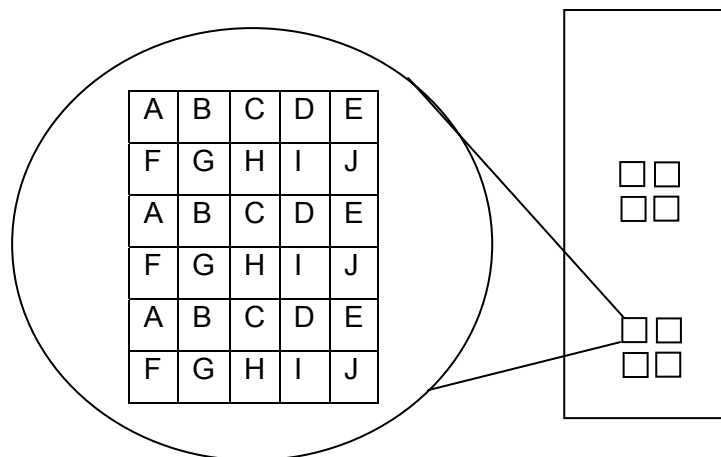


Abbildung 74: Dispensiermuster bei Messung der Festphasenfluoreszenz.

6.4 Realzeithybridisierung im DNA-Biosensor

6.4.1 Herstellung der DNA-Biosensor-Chips

Die einzelsträngigen DNA-Fangsonden wurden auf aktivierten Glasobjektträgern im Standardformat von 25 mm x 75 mm x 1 mm immobilisiert.

Die mit Ethanol vorgereinigten und markierten Glasobjektträger wurden zunächst mit einer Mischung aus gleichen Teilen Methanol und konz. Salzsäure und anschließend in konz. Schwefelsäure chemisch gereinigt. Nach Waschen mit VE-Wasser und Methanol wurde die Oberfläche mit 3 % (v/v) 3-[2-(2-Aminoethylamino)-ethylamino]-propyl-trimethoxysilan in Methanol silanisiert. Es folgte das Waschen der Objektträger in Methanol und Tempern bei 110°C. Anschließend wurde mit Phenyl-Diisothiocyanat (10 mg/ml in einer Lösung von 10 % (v/v) Pyridin in Dimethylformamid (DMF)) aktiviert. Die Glasobjektträger wurden daraufhin mit DMF und mit Dichlormethan gewaschen, im Stickstoffstrom trocken geblasen und entweder unter Trockenmittel bei -20°C zwischengelagert oder sofort weiter verwendet.

Die DNA-Fangsonden lagen in der Regel in einer Konzentration von 8 μM in wässriger Lösung vor und wurden mittels eines Dispensers orts aufgelöst in definierten Arrays auf der Glasoberfläche abgelegt. Ein Sondenspot entstand dabei üblicherweise aus einem Volumen von ca. 2 nl Sondenlösung, und der Abstand zwischen verschiedenen Sondenspots des Arrays betrug 0.7 mm. Nur in den Fällen, wo eine einzige Sonde als 10x10-Array immobilisiert wurde, betrug der Abstand 1 mm. Weiterhin wurde bei der Herstellung einiger Sondenarrays ein 5'-Cy5- und 3'-NH₂-markiertes Oligonukleotid als Positionsmarker an verschiedenen, definierten Positionen neben dem Array mit einem Mindestabstand von 1.4 mm zu den Fangsondenspots immobilisiert, wobei nur ca. 0.6 nl der 2 μM Positionsmarkerlösung pro Spot aufgetragen wurden.

In Abbildung 75 ist die Position des immobilisierten Sondenarrays auf den Glasobjektträgern skizziert. Die relativen Koordinaten von $x = 14$ mm und $y = 12.5$ mm beschreiben dabei die Lage des zentralen Bezugspunktes des Dispensers ausgehend von der linken, unteren Ecke des Objektträgers. Bei der Konzeption der Arrays für die DNA-Sensorchips wurden die verschiedenen Sondenspots immer so angeordnet, dass sie mindestens zwei- oder dreifach in unterschiedlichen Bereichen des Arrays, jedoch mindestens einmal im zentralen, relativ stark angeregten Bereich lagen.

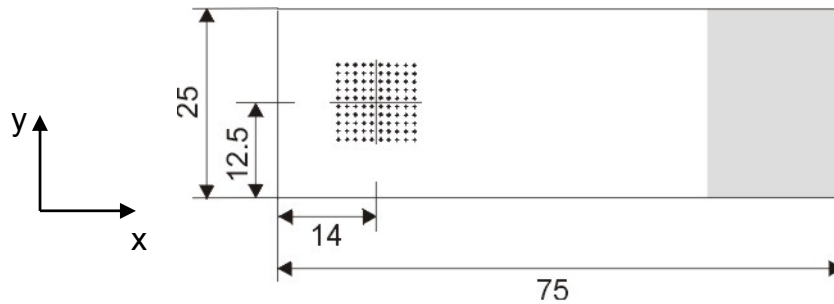


Abbildung 75: Positionierung des Sondenarrays auf den Glasobjektträgern der DNA-Sensorchips
Bsp.: 10x10-Array mit Spotabstand von 1 mm; Angaben in mm

Nach der Belegung erfolgte eine Inkubation der Glasobjektträger über Nacht bei Raumtemperatur in einer Feuchtbox. Im Anschluss daran wurden die überschüssigen reaktiven Gruppen bei 37 °C durch Reaktion mit 6-Aminohexansäure (1 % (w/v) in 100 mM Natriumcarbonat, pH 8.5) deaktiviert und die Oberfläche zur Vermeidung unspezifischer Wechselwirkungen bei RT durch Inkubation in 1x Rotiblock geblockt. Nach Waschen mit VE-Wasser und Trocknen im Stickstoffstrom wurden die Glasobjektträger bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert.

Neben den beschriebenen, selbst aktivierten Chips kamen in wenigen Fällen auch voraktivierte Glasobjektträger (CSS-Silylated, CEL Associates, Pearland, USA) zum Einsatz. Das Dispensieren der Fangsonden erfolgte wie oben beschrieben, die Deaktivierung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Der eigentliche DNA-Biosensorchip wurde erhalten, indem auf den Objektträger mit Sondenarray die Plastikteile zur Ausbildung des Fließkanals aufgeklebt wurden (siehe auch Abb. 15, Kap. 1.3.3.3 und Ref. [134]). Die Plastikteile wurden in der Werkstatt des ICB gefräst. Der Objektträger wurde zunächst mit einem grauen PVC-Zwischenstück (28 mm x 22 mm x 3 mm) über einen zugeschnittenen Klebefilm von 50 µm Höhe mit einer mittigen Öffnung von 14 mm x 22 mm verbunden. In das Zwischenstück sind schlitzförmig (14 mm x 1 mm) Zu- und Abfluss zum Fließkanal integriert. Über einen zweiten zugeschnittenen Klebefilm von 130 µm Dicke wurde die Oberseite des Zwischenstückes mit dem Chip-oberteil aus Polymethacrylsäuremethylester (PMMA) verbunden.

6.4.2 Durchführung der Messungen

Auf der Unterseite des fertig zusammengebauten DNA-Biosensor-Chips wurde ein Tropfen Silikonöl aufgebracht und sorgfältig unter Vermeidung von Blasenbildung verteilt. Anschließend wurde der Chip in die Halterung des Auslesegerätes gelegt. Nach Absenken

des Chips auf das Glasprisma wurde ca. 5 min gewartet, so dass sich ein gleichmäßiger Ölfilm zwischen Chip und Prisma ausbilden konnte.

Für eine Messung wurden normalerweise 120 µl der in Standardhybridisierungspuffer angesetzten Verdünnung der jeweiligen Targetoligonukleotide in den Probencontainer des Sensorchips gegeben, die Verschlussklappe zum Ausschluss von Umgebungslicht aufgesetzt und die Messung mit einer Fließrate von 1 µl/s und einer Belichtungszeit von 5 s gestartet. Während der Messung wurde alle 7 s ein neues Bild aufgenommen. Die Aufnahmen der CCD-Kamera wurden dabei im Modus des 2x2-Binnings gespeichert. Dabei wurden je 2x2 der insgesamt 1024x1024 Pixel zu einem Wert zusammengefasst, wodurch der Speicherplatzbedarf der Messdaten verringert wurde bei gleichzeitig noch ausreichend großer Auflösung der Bildinformation. Da mit einem Sensorchip mehrere Messungen durchgeführt werden können, wurde er nach erfolgter Hybridisierung durch Spülen mit 1x 200 µl Regenerierungslösung und anschließend 2x 200 µl Waschpuffer bei einer Fließrate von jeweils 25 µl/s regeneriert. Danach konnte eine neue Messung gestartet werden.

Die Einzelkomponenten des Sensorchips konnten teilweise mehrfach verwendet werden. Die Chips wurden dafür nach Gebrauch für einige Stunden in Rotisol™ eingelegt, woraufhin die Klebefilme entfernt und die Kunststoffkomponenten nach weiterer Reinigung mit Ethanol erneut benutzt werden konnten.

Die Messung von PCR-Produkten unterschied sich nicht wesentlich von der Messung der Target-Oligonukleotide. Damit die fertige Messlösung dieselbe Zusammensetzung ausweist, wie die synthetischen Target-Oligonukleotide (1 Teil Wasser, 1 Teil Formamid, 2 Teile Ultrahyb), muss bei der Herstellung der Proben der durch das PCR-Produkt bedingte Wasseranteil berücksichtigt werden. Es wurden 0.1 bis 25 µl, in der Regel jedoch 4 µl PCR-Produkt pro 120 µl Probenlösung eingesetzt. Die Proben wurden vor der Messung thermisch denaturiert (5 min 96 °C, 1 min Eis) und dann sofort gemessen, um ein Reannealing der Einzelstränge zu verhindern.

Der Formamidgehalt der Proben wurde bei einigen Messungen von PCR-Produkten variiert. Der entsprechende Hybridisierungspuffer wurde dann jeweils modular aus den drei Komponenten Wasser, Formamid und Ultrahyb hergestellt. Dabei ist zu beachten, dass das Ultrahyb selbst 50 % Formamid enthält. Bei einem Gehalt von 50 % Ultrahyb bedeutet dies, dass der Formamidgehalt der fertigen Probe nur zwischen 25 % (2 Teile Wasser, 2 Teile Ultrahyb) und 75 % (2 Teile Formamid, 2 Teile Ultrahyb) variiert werden kann.

6.4.3 Auswertung einer Messung

Die Auswertung der Messungen am DNA-Biosensor erfolgt mit einer eigens am ICB entwickelten Software, der unter dem Programm *Matlab* betriebenen Routine *Exprimage*. Dabei werden die 16Bit-Graustufenbilder der CCD-Kamera als Intensitäten im Falschfarbenmodus dargestellt. Die Datenverarbeitung erfolgt schrittweise durch Einzelbefehle, die nacheinander abgearbeitet werden: Festlegen des Datenordners, Einlesen der darin gespeicherten Bilddaten, Festlegen der Zeitachse für die Messung, Kontrolle des Signalverlaufs an einzelnen Pixeln, Berechnen des Steigungsbildes, Quantifizierung der dabei erhaltenen Werte.

Die Quantifizierung der Signalsteigungen an den einzelnen Spots erfolgte nach der Mittelwertsmethode, wobei über den Mittelwert der gesamten Fläche des Spots ausgewertet wird. Dazu wurde in *Exprimage* ein Raster über die Sondenspots gelegt, das derart gestaltet ist, dass sich jeder Spot innerhalb einer Zelle befindet und zwischen den Spots jeweils in alle Richtungen eine freie Zelle derselben Größe liegt. Die Mittelwerte der Intensitäten der Pixel in den Zellen mit den Sondenspots wurden berechnet. Die freien Zellen dienen zur Berechnung des Hintergrundes. Dabei wurde der Mittelwert der Intensitäten der vier zur betrachteten Zelle diagonal liegenden Zellen gebildet. Man erhält eine Ergebnismatrix mit den Intensitäten an den einzelnen Sondenspots und eine weitere mit dem Hintergrund, der zu dem betreffenden Spot gehört. Eine Hintergrundkorrektur durch einfache Subtraktion der Matrices voneinander wurde in *Excel* durchgeführt.

6.4.4 Messung am neuen DNA-Biosensor-Chipreader

Für den neu entwickelten Chipreader wurden dieselben Chips verwendet, wie beim ersten Prototyp, allerdings wurde hier auf den Objektträger mit Sondenarray nur ein einziges Plastikteil (PMMA, 55 x 28 mm mit integrierten, kreisförmigen Bohrungen mit Durchmesser 1.5 mm für Zu- und Abfluss der Probe) zur Ausbildung des Fließkanals mittels eines Klebefilms (55 x 28 mm, 50 μ m Höhe mit ovaler Aussparung) aufgeklebt. Auf Grund der anderen optischen Auslegung lag der zentrale Bezugspunkt für den Array um 80 mm in x-Richtung verschoben (Vergl. Abb. 75). Der fertige Sensorchip wurde in die Chiphalterung gelegt und auf das Prisma abgesenkt, auf welches zuvor ein Tropfen Siliconöl gegeben wurde. Nach einer Wartezeit von 5 min hat sich ein homogener Ölfilm ausgebildet und das System war zur Messung bereit. In das Vorlagekarussell werden Eppendorfgeläße (1.5 – 2 ml) mit den benötigten Lösungen gegeben (Waschpuffer, Regenerierungslösung, Hybridisierungspuffer und Probenlösung, sämtlich hergestellt wie beim ersten Prototyp). Eine

Nadel durchstach den Deckel des jeweils gewählten Eppendorfgefäßes und die Flüssigkeit wurde entsprechend der eingestellten Parameter über den Chip gepumpt. Vor der ersten Messung wurde der Fließkanal gefüllt, indem 400 μl Waschpuffer mit 100 $\mu\text{l/s}$ über den Chip gepumpt wurden. Es folgte Regenerierung mit 200 μl Regenerierungspuffer (25 $\mu\text{l/s}$) und 400 μl Waschpuffer (25 $\mu\text{l/s}$). Der Chip war nun bereit für die Messung. Hierbei wurden nacheinander 200 μl Hybridisierungspuffer mit 1 $\mu\text{l/s}$ (dieser Schritt ist optional), 120 bis 500 μl Probe mit 1 $\mu\text{l/s}$, 200 μl Hybridisierungspuffer mit 1 $\mu\text{l/s}$, 200 μl Regenerierungspuffer mit 25 $\mu\text{l/s}$ und 400 μl Waschpuffer mit 25 $\mu\text{l/s}$ über den Chip gepumpt. Die Temperatur konnte frei gewählt werden und betrug, wenn nicht anders erwähnt, 30 °C. Als Belichtungszeit wurde pro Bild 1 s gewählt und es wurde alle 3 s ein neues Bild des Arrays von der CCD-Kamera aufgenommen. Die Aufnahmen wurden ebenfalls im Modus des 2x2-Binnings gespeichert. Da der Sensorchip mit Regenerierungs- und Waschpuffer regeneriert werden kann, waren auch hier mehrere Messungen pro Chip möglich. Das Plastikoberteil konnte ebenfalls wiederverwertet werden.

Für die Auswertung wurde eine neue Matlabroutine geschrieben, die Anwendung *DNA-Chip*. Dies Programm basiert mathematisch auf dem Programm *Exprimage* und die Auswertung erfolgt nach der beschriebenen Mittelwertsmethode. Mit dem neuen Programm ist es dem Anwender jedoch möglich den Messverlauf detaillierter zu betrachten und eine differenziertere Auswertung vorzunehmen.

6.5 Konventionelle Chiphybridisierung

6.5.1 Hybridisierung unter dem Deckgläschen

Bei den Versuchen zur konventionellen Chiphybridisierung wurden als Glasträger ebenfalls die Objektträger im Standardformat (Sigma-Aldrich, Steinheim) verwendet, auf denen der Sondenarray zweifach in angemessenem Abstand immobilisiert wurde (Abb. 76). Die Anordnung der Sonden innerhalb des Arrays erfolgte dabei immer nach dem gleichen Prinzip mit großer Redundanz. Es wurden üblicherweise bei einem Spotabstand von 0.7 mm zehn verschiedene SONDENSEQUENZEN in zwei Reihen à 5 Spots untereinander immobilisiert. Drei dieser identischen Doppelreihen ergaben einen Array, der wiederum viermal innerhalb eines Meta-Arrays aufgebracht wurde.

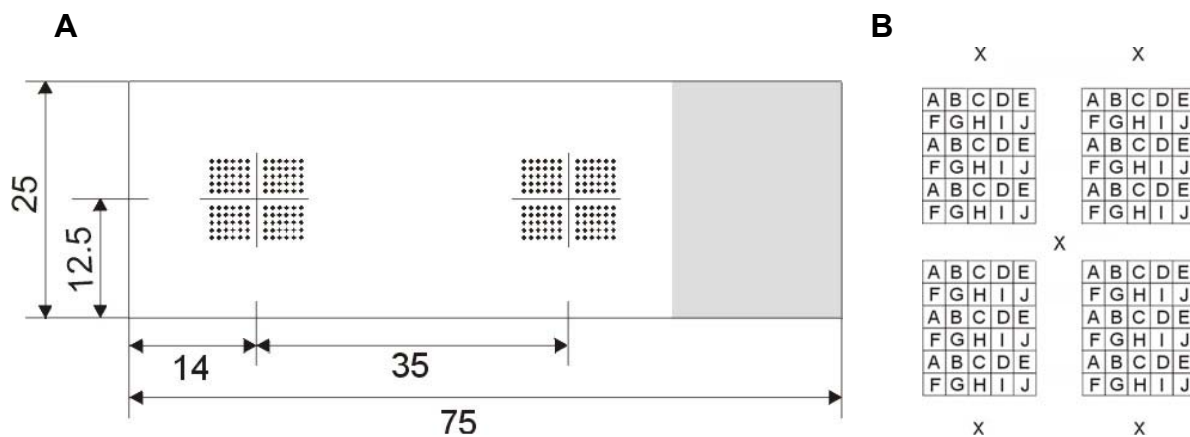


Abbildung 76: Sondenimmobilisierung bei konventioneller Chiphybridisierung

A: Positionierung der Sondenarrays auf den Glasobjektträgern, B: Schema der immobilisierten Sondenarrays mit zehn verschiedenen Sondensequenzen A-J, X: Positionsmarker

Für die Hybridisierung unter dem Deckgläschen wurden ausschließlich PCR-Produkte eingesetzt. Dabei wurden, wenn nicht anders erwähnt, 3,25 µl PCR-Produkt in Standardhybridisierungspuffer auf 13 µl Probenlösung verdünnt, 10 min bei 100 °C denaturiert, auf Eis mindestens 1 min abgeschreckt und mit einer Pipette mittig auf dem Sondenarray aufgebracht. Zur genauen Positionierung der Lösung auf dem Sondenarray wurde der Glasobjektträger auf eine entsprechende Schablone gelegt. Die Probenlösung wurde dann mit einem zuvor mit Ethanol gereinigten 20 mm x 20 mm - Deckgläschen bedeckt und der Objektträger in einer Feuchtbox 1 h bei 37 °C inkubiert. Zur Entfernung der ungebundenen Targetmoleküle wurde er anschließend in einer Schale bei RT dreimal jeweils 5 min in folgenden Lösungen unter schrittweiser Erhöhung der Stringenz gewaschen:

1. 2 x SSC / 0.1 % SDS
2. 1 x SSC / 0.1 % SDS
3. 0.5 x SSC

Nach einem letzten Waschschrift unter fließendem VE-Wasser für ca. 10 s wurde der Glasobjektträger im Stickstoffstrom getrocknet und bis zum Auslesen am Mikroarray-Scanner bei 4°C gelagert.

6.5.2 Auslesen der hybridisierten Glasobjektträger

Die hybridisierten Glasobjektträger wurden in einem GMS418 Mikroarray-Scanner (MWG-Biotech, Ebersberg) im Institut für funktionelle Genomik der Universität Münster ausgelesen. Das Gerät ermöglicht die Anregung der Fluorophore Cy3 und Cy5 durch zwei integrierte Laserquellen der Wellenlängen 532 und 635 nm und detektiert die angeregte Fluoreszenzstrahlung mittels eines Photomultipliers (*photomultiplier tube*, PMT). In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit dem roten Laser bei 635 nm gearbeitet. Mit Hilfe der Software *GMS418 ArrayScanner* wurden die Messungen gesteuert und die aufgenommenen Fluoreszenzbilder betrachtet. Für eine Messung wurde immer nur ein einzelner Glasobjektträger in den Zufuhrschacht des Gerätes gelegt, automatisch eingezogen und mit den eingestellten Parametern gescannt. Variabel waren dabei die Laserleistung (*laser power*, LP), die Verstärkung (*gain*) des Photomultipliers sowie die Größe der gescannten Oberfläche zu wählen. Wenn nicht anders vermerkt, wurde mit 100 % LP gescannt, während die prozentuale PMT-*gain*-Einstellung je nach Intensität der hybridisierten Sondenspots angepasst wurde, um eine Sättigung des Signals zu vermeiden. Die erhaltenen Bilder wurden im 16Bit-Graustufenformat als *tif*-Dateien gespeichert.

6.5.3 Auswertung der Fluoreszenzbilder

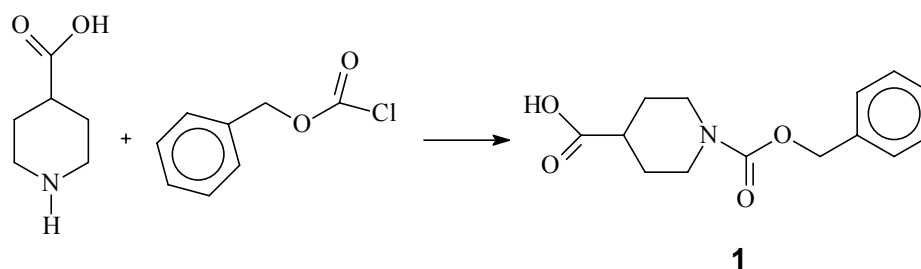
Die Auswertung der am Mikroarrayscanner erhaltenen Bilder erfolgte mit der Software *GenePix ProTM* (Axon Instruments, Foster City, USA), die als Demo-Version zur Verfügung stand. Sie gliedert sich in verschiedene Benutzeroberflächen und ist grundsätzlich für die Analyse von Mikroarrays, auf denen Fluoreszenzmuster auf Basis zweier verschiedener Wellenlängen mit beliebigen Arrayscannern erhalten werden, geeignet. In dieser Arbeit wurden die Bilder zunächst im Anwendungsfenster „*Image*“ geöffnet und durch Bildbearbeitung wie Helligkeit, Kontrast oder Falschfarbendarstellung optimal visualisiert. Anschließend wurde ein dem Format des immobilisierten Sondenarrays entsprechendes Raster über dem Bild positioniert und automatisch vom Programm optimal an den erleuchteten Sondenspots ausgerichtet. Durch Anklicken des „*Analyze*“-Buttons wurden dann die Daten für jeden einzelnen Spot innerhalb des Rasters berechnet und im „*Results*“-Fenster dargestellt. Dabei wurden zum einen die Medianwerte innerhalb der angepassten Kreisfelder als Spotintensitäten berechnet (*F2Median*). Zum anderen wurde als Hintergrundintensität eines Spots der Median über alle Pixel innerhalb der kreisförmigen Umgebung eines Spots gebildet (*B2Median*), wobei die Grenze dieses Umgebungsbereiches durch den dreifachen Durchmesser des jeweiligen Kreisfeldes bestimmt war und benachbarte Spots ignoriert

wurden. Die einzelnen Werte wurden ebenso wie die hintergrundkorrigierten Spotintensitäten ($F2_{Median}-B2$) sowie die Rasterkoordinaten des betrachteten Spots bei den Ergebnissen angegeben.

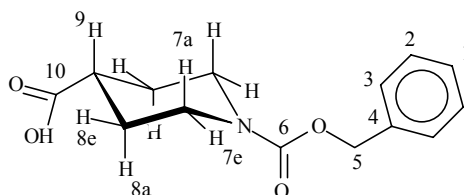
6.6 Synthese der Fluorophore

6.6.1 Synthese der Methylketon-Vorstufen

Synthese von 1-Benzoyloxycarbonylpiperidin-4-carbonsäure (**1**)



In 65 ml NaOH-Lösung (4 mol/l) werden 33.6 g (0.26 mol) Piperidin-4-carbonsäure gelöst und auf 0 °C gekühlt. Unter ständigem Rühren wird langsam eine Lösung von 47.8 g (0.28 mol) Chlorameisensäurebenzylester in 78 ml NaOH-Lösung (4 mol/l) zugetropft. Die klare, farblose Lösung wird noch 30 min bei Raumtemperatur gerührt und dann drei mal mit je 80 ml Diethylether extrahiert. Die wässrige Phase wird mit 6 M Salzsäure auf pH = 3 eingestellt, wobei sich ein farbloses Öl abscheidet. Das Öl wird mit Ethylacetat (3 x 100 ml) extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck abdestilliert, wobei ein farbloses Öl zurückbleibt. Nach Trocknen im Ölpumpenvakuum wird das Produkt (**1**) als weißer, kristalliner Feststoff erhalten.



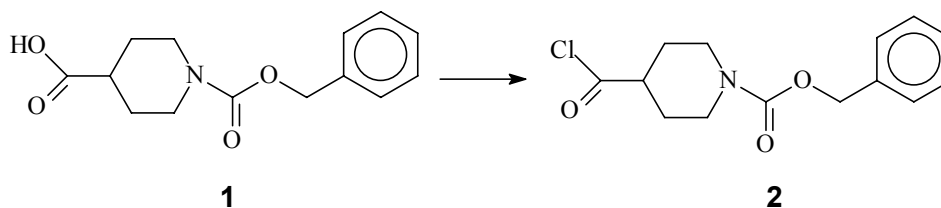
Ausbeute: 63.92 g (0.256 mol, 98.5 % d.T.)

¹H-NMR (300 MHz), δ (ppm): 1.65 (2H, tq, $^3J(8a,7a) = 21.75$ Hz, $^3J(8a,9e) = 11.31$ Hz, $^2J(8a,8e) = 4.35$ Hz, $^3J(8a,7e) = 1.74$ Hz, 8a-H), 1.90 (2H, dd, $^3J(8e,7e) = 13.92$ Hz, $^2J(8e,8a) = 2.61$ Hz, $^3J(8e,9e) = 2.61$ Hz, 8e-H), 2.45 (1H, tt, $^3J(9e,8a) = 11.31$ Hz, $^3J(9e,8e) = 4.35$ Hz, 9e-H), 2.95 (2H, ddd, $^3J(7a,8a) = 20.01$ Hz, $^2J(7a,7e) = 9.57$ Hz, $^3J(7a,8e) = 2.61$ Hz, 7a-H), 4.05 (2H, d, $^3J(7e,8e) = 13.92$ Hz, 7e-H), 5.05 (s, 2H, 5-H), 7.25 (5H, m, 1-H, 2-H, 3-H)

¹³C-NMR (300 MHz), δ (ppm): 27.63 (2C, 8-C), 40.57 (1C, 9-C), 43.16 (2C, 7-C), 67.21 (1C, 5-C), 127.85 (1C, 1-C), 127.99 (2C, 2-C), 128.47 (2C, 3-C), 136.68 (1C, 4-C), 155.24 (1C, 6-C), 179.71 (1C, 10-C)

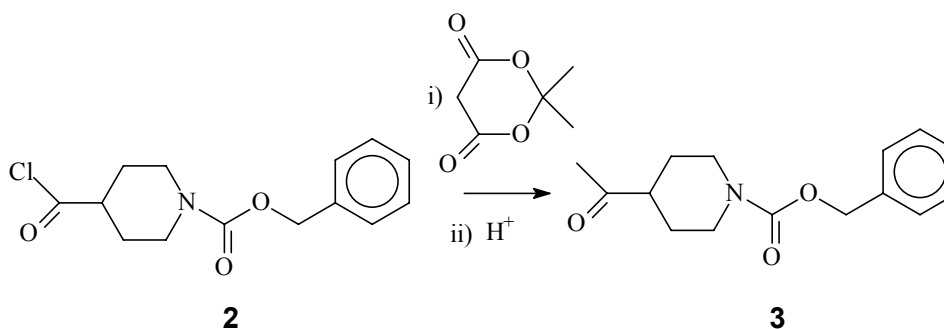
ES⁻, m/z: 262.0 (32 %), 106.9 (100 %), 79.9 (24 %), 42.1 (8 %)

ES⁺, m/z: 263.7 (5 %), 219.8 (28 %), 171.7 (10 %), 127.7 (12 %), 90.8 (100 %)

Synthese von 1-Benzyloxycarbonylpiperidin-4-carbonsäurechlorid (**2**)

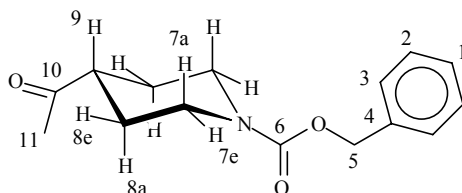
60.6 g (0.23 mol) 1-Benzyloxycarbonylpiperidin-4-carbonsäure (**1**) werden unter Schutzgasatmosphäre in 1.5 l wasserfreiem Toluol (getrocknet durch azeotrope Destillation) gelöst und 55.4 ml (0.76 mol, 90.9 g) Thionylchlorid werden bei Raumtemperatur unter Rühren langsam zugegeben. Die Lösung wird mit drei Tropfen DMF versetzt und solange zum Sieden erhitzt, bis keine Gasentwicklung mehr festzustellen ist. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck abdestilliert, wobei ein gelbes Öl zurückbleibt. Es werden mehrfach kleine Mengen wasserfreies Toluol zugegeben und abdestilliert, bis das überschüssige Thionylchlorid vollständig entfernt ist. Anschließend wird das Öl unter Ölpumpen-Vakuum im Exsikkator über P_2O_5 getrocknet, wobei es kristallisiert. Das gelbe, kristalline Rohprodukt (**2**) wird direkt in der folgenden Synthese weiter eingesetzt.

Ausbeute: 64.2 g (0.228 mol, 99.1 %)

Synthese von 1-Benzyloxycarbonylpiperidin-4-methylketon (**3**)

i) 31.7 g (0.22 mol) Meldrumssäure werden in 250 ml wasserfreiem Dichlormethan und 35.4 ml (0.44 mol, 34.8 g) wasserfreiem Pyridin unter Schutzgasatmosphäre gelöst und auf 0 °C gekühlt. Das Rohprodukt (**2**) (64.2 g, 0.228 mol) wird in 50 ml wasserfreiem Dichlormethan gelöst, in einen Tropftrichter überführt und innerhalb einer Stunde zugegeben, wobei sich die Lösung trübt und rotbräunlich färbt. Nach beendeter Zugabe wird noch eine Stunde bei 0 °C und 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die Mischung viermal mit je 100 ml Wasser extrahiert. Die bräunliche, organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels bleibt das Acylierungsprodukt als braunes, hochviskoses Öl zurück, das ohne weitere Reinigung direkt verseift wird.

ii) Zum Rohprodukt der Acylierung werden 300 ml einer wässrigen Essigsäurelösung (HAc:H₂O = 2:1) zugegeben und es wird am Rückfluss erhitzt, bis kein CO₂ mehr entweicht. Die wässrige Lösung wird anschließend dreimal mit je 80 ml Chloroform extrahiert, wobei die wässrige Phase vorher mit NaCl gesättigt wird. Anschließend werden die vereinigten organischen Phasen mit einer konzentrierten, wässrigen Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, bis kein CO₂ mehr entweicht. Die organische Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck abdestilliert. Man erhält ein gelbes Öl, das im Ölpumpenvakuum kristallisiert. Zum umkristallisieren wird das Rohprodukt in 150 ml heißem Ethanol gelöst. 300 ml Wasser werden langsam unter kräftigem Rühren zugegeben, worauf sich ein Öl abscheidet, das bei Erkalten unter ständigem Rühren nach wenigen Stunden kristallisiert. Das Produkt wird abfiltriert und im Exsikkator unter Vakuum getrocknet. Man erhält das Produkt als farblose Kristalle.



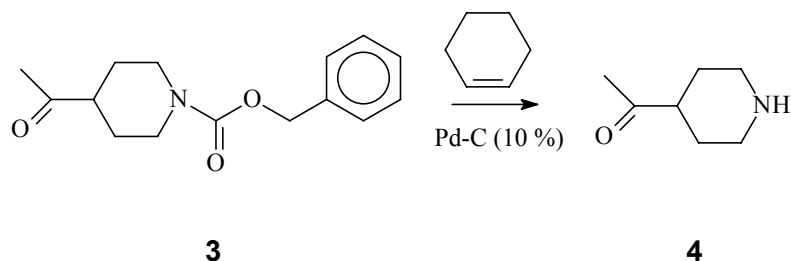
Ausbeute: 41.0 g (0.16 mmol, 71.3 % d.T.)

¹H-NMR (300 MHz), δ (ppm): 1.50 (2H, tq, ³J(8a,7a) = 21.75 Hz, ³J(8a,9e) = 11.31 Hz, ²J(8a,8e) = 4.35 Hz, ³J(8a,7e) = 1.74 Hz, 8a-H), 1.80 (2H, dd, ³J(8e,7e) = 13.92 Hz, ²J(8e,8a) = 2.61 Hz, ³J(8e,9e) = 2.61 Hz, 8e-H), 2.10 (3H, s, 11-H), 2.45 (1H, tt, ³J(9e, 8a) = 11.31 Hz, ³J(9e,8e) = 4.35 Hz, 9e-H), 2.80 (2H, ddd, ³J(7a,8a) = 20.01 Hz, ²J(7a,7e) = 9.57 Hz, ³J(7a,8e) = 2.61 Hz, 7a-H), 4.10 (2H, d, ³J(7e,8e) = 13.92 Hz, 7e-H), 5.10 (s, 2H, 5-H), 7.30 (5H, m, 1-H, 2-H, 3-H)

¹³C-NMR (300 MHz), δ (ppm): 27.35 (2C, 8-C), 27.83 (1C, 11-C), 43.41 (2C, 7-C), 48.97 (1C, 9-C), 67.23 (1C, 5-C), 127.88 (1C, 1-C), 128.00 (2C, 2-C), 128.49 (2C, 3-C), 137.34 (1C, 4-C), 155.16 (1C, 6-C), 209.84 (1C, 10-C)

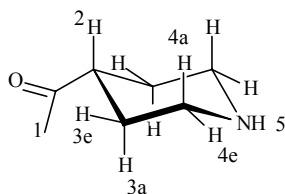
ES⁺, m/z: 261.9 (12 %), 217.8 (49 %), 169.7 (15 %), 125.7 (16 %), 90.8 (100 %)

Synthese von Methyl-4-piperidylketon (**4**)



Unter Schutzgasatmosphäre werden 20.9 g (0.08 mol) des Cbz-geschützten Methyl-4-piperidylketons (**3**) und 2 g Palladium auf Aktivkohle (10 %) in 300 ml Ethanol absolut und 200 ml Cyclohexen gelöst. Die Mischung wird 6 h unter Rückfluss erhitzt, wobei eine starke Gasentwicklung zu beobachten ist. Nach Erkalten wird das Palladium an Aktivkohle abfiltriert und mit Ethanol absolut gewaschen. Das gelbe Filtrat wird am Rotationsverdampfer

eingengt und das zurückbleibende braune Öl im Vakuum destilliert (b.p. = 75 – 76 °C, 2 mbar). Man erhält das Produkt als farblose, klare Flüssigkeit.

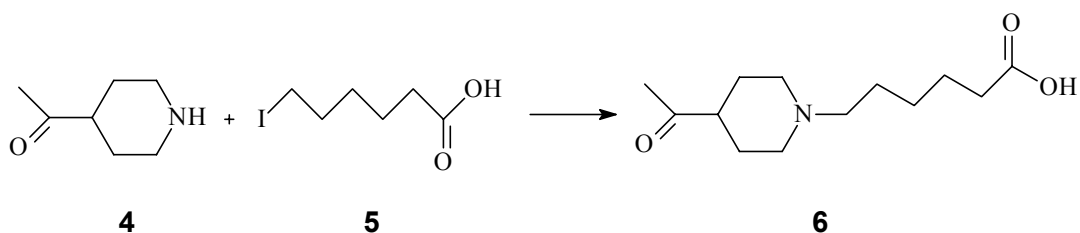


Ausbeute: 8.69 g (68.3 mmol, 85.4 % d.T.)

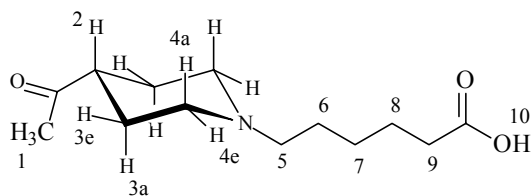
¹H-NMR (300 MHz), δ (ppm): 1.40 (2H, dq, $^2J(3a,3e) = 8.8$ Hz, $^3J(3a,4a) = 8.8$ Hz, $^3J(3a,2) = 8.8$ Hz, $^3J(3a,4e) = 2.7$ Hz, 3a-H), 1.75 (2 H, d, $^3J(3e,3a) = 8.8$ Hz, 3e-H), 2.05 (3H, s, 1-H), 2.35 (1H, tt, $^3J(2,3a) = 8.8$ Hz, $^3J(2,3e) = 2.7$ Hz, 2-H), 2.55 (2H, dt, $^2J(4a,4e) = 8.8$ Hz, $^3J(4a,3a) = 8.8$ Hz, $^3J(4a,3e) = 2.0$ Hz, 4a-H), 3.05 (2H, td, $^2J(4e,4a) = 8.8$ Hz, $^2J(4e,3e) = 2$ Hz, $^3J(4e,3e) = 2$ Hz, $^3J(4e,3a) = 2.7$ Hz, 4e-H)

ES+, m/z: 128 (33%), 110 (59 %), 93 (26 %), 81 (43 %), 77 (14 %), 68 (18 %), 55 (28 %), 42 (100 %), 30 (8%)

Synthese von 1-(5-Carboxypentyl)piperidyl-4-methylketon (**6**)



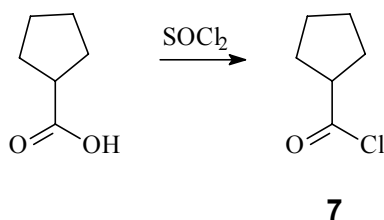
0.596 g (4.69 mmol) Piperidinmethylketon (**4**), 1.247 g (5.15 mmol) Iodhexansäure (**5**) und 1.949 g (14.1 mmol) Kaliumcarbonat werden in 10 ml Ethanol absolut gelöst und 8 h am Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abdestilliert und der Rückstand wird in 10 ml Wasser aufgenommen. Überschüssige Iodhexansäure wird mit Diethylether extrahiert. Die wässrige Phase wird eingengt und das Produkt wird säulenchromatographisch gereinigt (RP 18, Methanol/Wasser 1:2). Das Produkt wird als hellrosa Feststoff erhalten.



Ausbeute: 0.88 g (3.65 mmol, 77.8 % d.T.)

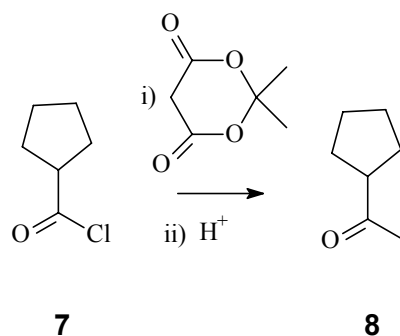
¹H-NMR (300 MHz), δ (ppm): 1.25 (2H, quin, $^3J(7,6) = 8$ Hz, $^3J(7,8) = 8$ Hz, 7-H), 1.50 (4H, m, 6-H, 8-H), 1.75 (2H, q, $^3J(3a,4a) = 22$ Hz, $^3J(3a,4e) = 10$ Hz, 3a-H), 1.90 (2H, d, $^3J(3e,4e) = 13.92$ Hz, 3e-H), 2.05 (3H, s, 1-H), 2.10 (2H, t, $^3J(9,8) = 10$ Hz, 9-H), 2.35 (3H, m, 2a-H, 5-H), 2.55 (2H, dd, $^3J(4a,3a) = 22$ Hz, $^2J(4a,4e) = 9.57$ Hz, 4a-H), 3.15 ((2H, d, $^3J(4e,3e) = 13.92$ Hz, 4e-H),

ES+, m/z: 242.1 (14 %), 224.1 (14 %), 127.8 (13 %), 110.0 (30 %), 96.9 (13 %), 81.0 (12 %), 73.0 (19 %), 69 (100 %), 55.0 (11 %), 41.2 (11 %)

Synthese von Cyclopentancarbonsäurechlorid (**7**)

4.75 ml (5 g, 43.8 mmol) Cyclopentylcarbonsäure und 3 Tropfen Dimethylformamid werden unter Schutzgasatmosphäre in 800 ml Toluol (getrocknet durch azeotrope Destillation) gelöst. 10.58 ml (17.25 g, 0.145 mol) Thionylchlorid werden über einen Tropftrichter langsam zugegeben. Die Reaktionsmischung wird am Rückfluss erhitzt, bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten ist (ca. 2.5 h). Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abdestilliert und das zurückbleibende gelbe Öl wird noch mehrfach mit kleinen Portionen trockenem Toluol gewaschen, bis der charakteristische Thionylchloridgeruch verschwindet. Das Produkt wird im Ölpumpenvakuum getrocknet, wobei es als hellgelber Feststoff kristallisiert. Das Produkt wird direkt in der folgenden Synthese eingesetzt.

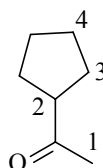
Ausbeute: 5.74 g (43.3 mmol, 98.9 % d.T.)

Synthese von Cyclopentylmethylketon (**8**)

i) Unter Schutzgasatmosphäre werden 2.42 g (16.8 mmol) Meldrumssäure und 2.7 ml (2.66 g, 33.6 mmol) Pyridin in 20 ml trockenem Chloroform gelöst und auf 0 °C gekühlt. Über einen Tropftrichter wird eine Lösung aus 2.23 g (16.8 mmol) des Cyclopentylsäurechlorids (**7**) in 10 ml trockenem Chloroform langsam (10 min) zugegeben. Die Reaktionsmischung färbt sich dabei dunkelrot. Es wird 1 h bei 0 °C und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wird dreimal mit je 10 ml Wasser extrahiert, mit Magnesiumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das zurückbleibende rotbraune Öl wird sofort weiter umgesetzt.

Ausbeute: 2.03 g (8.41 mmol, 50.1 % d.T.)

ii) Das Acylierungsprodukt aus i) wird in 150 ml wässriger Essigsäure (HAc/H₂O 2:1) gelöst und am Rückfluss erhitzt, bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten ist (6 – 8 h). Anschliessend wird die Lösung noch über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die wässrige Lösung wird mit Natriumchlorid gesättigt und das Produkt mehrfach mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen, bis kein CO₂ mehr entsteht und mit Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abdestilliert und das zurückbleibende Öl wird im Vakuum destilliert (b.p. 39 – 41 °C, 12 – 15 mbar). Das Produkt wird als klare, farblose Flüssigkeit erhalten.

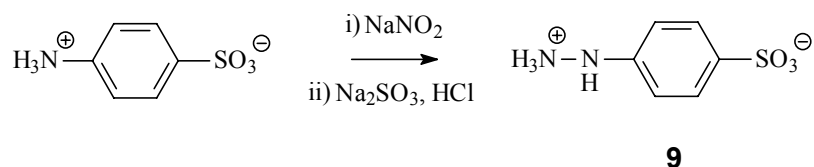


Ausbeute: 0.558 g (5.47 mmol, 64.9 % d.T.)

¹H-NMR (300 MHz), δ (ppm): 1.55 (4H, m, 4-H), 1.75 (4H, m, 3-H), 2.10 (3H, s, 1-H), 2.80 (1H, quin, ³J(2,3) = 7.5 Hz)

6.6.2 Indolsynthesen

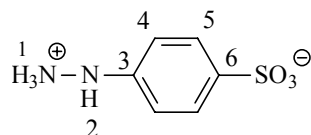
Synthese von Phenylhydrazin-4-Sulfonsäure (**9**)



i) 26 g (0.15 mol) Sulfanilsäure und 8.25 g Natriumcarbonat werden in 100 ml heißem Wasser gelöst. Die Lösung wird filtriert und auf Raumtemperatur abgekühlt. Unter Rühren werden langsam 17.5 g konzentrierte Schwefelsäure zugetropft. Die Mischung wird im Eisbad abgekühlt und in einem Zeitraum von 15 min werden unter Rühren 13 g Natriumnitrit in 25 ml Wasser zugegeben, wobei die Temperatur 10 °C nicht übersteigen soll. Es wird noch weitere 15 min in der Kälte gerührt, dann wird die kristalline Diazoverbindung in der Kälte abfiltriert und es wird mit wenig Eiswasser nachgewaschen. Produkt nicht vollständig trocknen lassen, Explosionsgefahr.

ii) Die noch feuchte Diazoverbindung wird unter kräftigem Rühren in eine eisgekühlte Lösung von 85 g (0.325 mol) Natriumsulfit in 125 ml Wasser gegeben. Dabei soll die Temperatur unter 5 °C bleiben. Es wird eine Stunde unter Eiskühlung gerührt, wobei sich die Lösung orange färbt. Anschliessend wird die Mischung zum Sieden erhitzt und innerhalb von 30 min werden 100 ml konz. Salzsäure zugetropft. Die Lösung entfärbt sich dabei und ist zum

Schluss hellgelb. Zur vollständigen Entfärbung wird etwas Zinkstaub zugesetzt. Schon in der Wärme beginnt das Produkt (**9**) in Form glänzender, farbloser Schuppen zu kristallisieren. Die Mischung wird über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und die entstehenden Kristalle werden anschließend abfiltriert und im Exsikkator über P_2O_5 unter Vakuum getrocknet. Geringfügiges Einengen der Mutterlauge liefert noch weiteres Produkt (**9**). Man erhält 26.5 g (0.14 mol) farbloser Kristalle. Die Ausbeute beträgt 94 %.



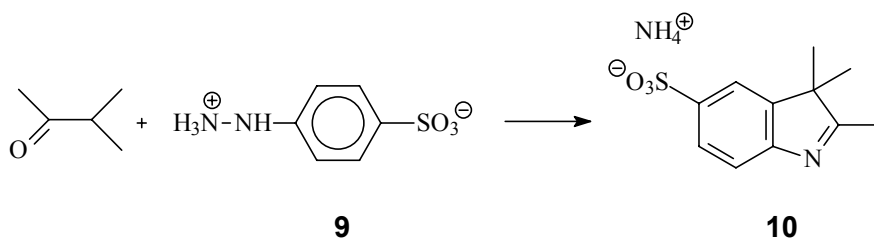
Ausbeute: 26.5 g (0.14 mol, 94 % d.T.)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz), δ (ppm): 6.90 (2H, d, 5-H), 7.70 (2H, d, 4-H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (300 MHz), δ (ppm): 116.39 (2C, 5-C), 129.23 (2C, 4-C), 138.78 (1C, 6-C), 148.51 (1C, 3-C)

ES-, m/z: 186.9 (99 %), 170.8 (100 %), 79.8 (9 %)

Synthese von 2-Methyl-3-dimethyl-5-sulfo-3*H*-indol (**10**)

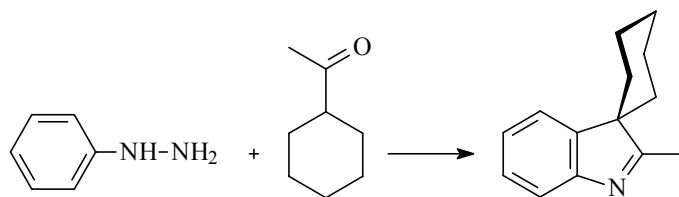


10 mmol (0.86 g) Isopropylmethylketon und 10 mmol (1.89 g) Phenylhydrazinsulfonsäure (**9**) werden in 20 ml Eisessig gelöst und 24 h am Rückfluß erhitzt. Die Essigsäure wird am Rotationsverdampfer abdestilliert. Das zurückbleibende Öl wird in Ethanol aufgenommen und über Aluminiumoxid filtriert. Das Lösungsmittel wird abdestilliert, zuletzt im Ölpumpenvakuum. Das Produkt erstarrt glassartig und wird mit dem Spatel zu einem feinen, hellbraunen Pulver zerstoßen.

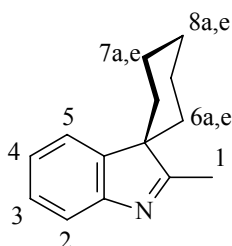
Ausbeute: 2.0 g (8.4 mol, 84 % d.T.)

ES-, m/z: 238 (100 %)

ES+,-, m/z: 262 (73 %), 284 (100 %), 353 (28 %)

Synthese von 2-Methyl-3-spiro-cyclohexan-3*H*-indol (**11**)**11**

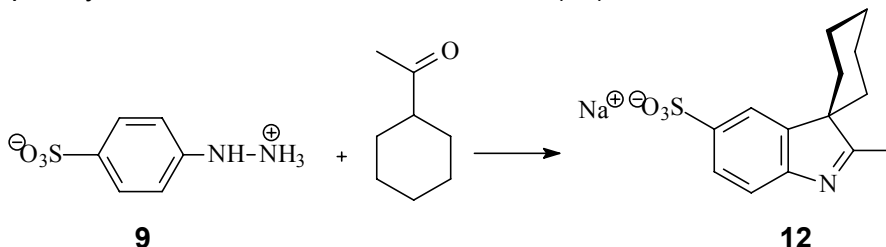
Eine Mischung aus 1.25 mol (135.2 g, 123 ml) Phenylhydrazin, 1.5 mol (189.3 g, 206 ml) Acetylcyclohexan und 1.25 l Essigsäure wird 3 h unter Schutzgasatmosphäre am Rückfluss erhitzt. Nach Erkalten wird die Essigsäure am Rotationsverdampfer abdestilliert. Der Rückstand wird mit 1 l Wasser verrührt und viermal mit je 200 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Natriumsulfat getrocknet. Das Rohprodukt wird destilliert (bp.143°C/3mbar). Man erhält das Produkt (**11**) als farbloses Öl, das sich nach längerem Aufbewahren gelb-braun färbt.



Ausbeute: 131.3 g (0.66 mmol, 52.8 % d.T.)

¹H-NMR (300 MHz), δ (ppm): 1.2 (2H, d, $^2J(6e,6a) = 13$ Hz, 6e-H), 1.7 (5H, m, 8e-H, 7e-H, 6a-H), 1.85 (3H, m, 8a-H, 7a-H), 2.2 (3H, s, 1-H), 7.05 (1H, dt, $^3J(4,5) = 7.2$ Hz, $^3J(4,3) = 7.2$ Hz, $^4J(4,2) = 1$ Hz, 4-H), 7.25 (1H, dt, $^3J(3,2) = 7.6$ Hz, $^3J(3,4) = 7.6$ Hz, $^4J(3,5) = 1$ Hz, 3-H), 7.45 (1H, dd, $^3J(2,3) = 7.7$ Hz, $^4J(2,4) = 1$ Hz, 2-H), 7.60 (1H, dd, $^3J(5,4) = 7.7$ Hz, $^4J(5,3) = 1$ Hz, 5-H)

ES⁺, m/z: 200 (48 %), 185 (8 %), 158 (6%), 144 (100 %), 69 (4 %)

2-Methyl-3-spiro-cyclohexan-5-sulfo-3*H*-indol Na-Salz (**12**)**9****12**

0.390 mol (73.40 g) Phenylhydrazin-4-sulfonsäure (**9**) und 0.466 mol (58.78 g) Acetylcyclohexan werden in 300 ml Essigsäure unter Schutzgasatmosphäre 48 h am Rückfluss erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die Essigsäure am Rotationsverdampfer abdestilliert, der Rückstand wiederholt in Wasser aufgenommen und das Wasser jeweils am Rotationsverdampfer abdestilliert. Sobald die Essigsäure und überschüssiges Acetylcyclohexan entfernt sind, setzt man eine Lösung aus 15.6 g NaOH in 100 ml Wasser

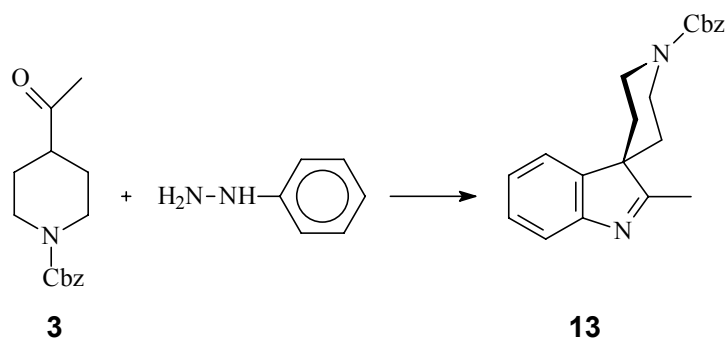
zu und wiederholt die Prozedur, bis der Geruch nach Ammoniak verschwunden ist. Anschließend wird mit 1 M H₂SO₄ angesäuert und mit NaHCO₃ abgestumpft. Die Lösung wird am Rotationsverdampfer zur Trockene eingedampft und der Rückstand im Ölpumpenvakuum bei 60 °C getrocknet (~ 8 h). Das pulverige Rohprodukt wird mit Ethanol aufgenommen und über Aluminiumoxid filtriert. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abdestilliert, zum Schluss im Ölpumpenvakuum. Man erhält das Indol (**12**) als hellgelbes Produkt.

Ausbeute: 77.47 g (0.278 mol, 66.0 % d.T.)

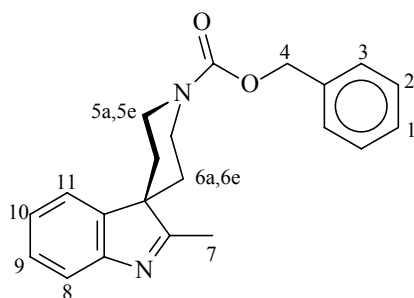
ES-, m/z: 278 (100 %)

ES+-, m/z: 324 (100 %)

Synthese von 2-Methyl-3-spiro-4'-(1'-benzyloxycarbonyl)-piperidin-3H-indol (**13**)



4.31 g (16.5 mmol) Piperidylmethylketon (**3**) und 1.48 ml (1.62 g, 15 mmol) Phenylhydrazin werden in 15 ml Eisessig gelöst und 3.5 h am Rückfluss erhitzt. Die Essigsäure wird am Rotationsverdampfer abdestilliert, wobei ein braunes Öl zurück bleibt. Das Öl wird säulenchromatographisch gereinigt (SP, Dichlotmethan/Ethylaetat 2:1). Das Produkt (**13**) wird als rotbrauner, pulveriger Feststoff erhalten.



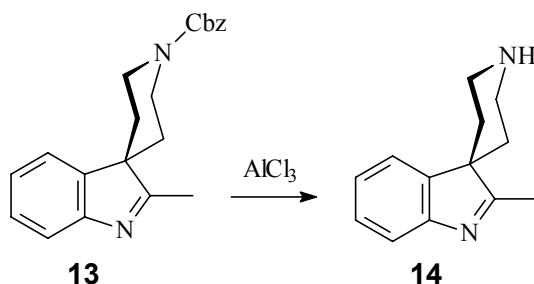
Ausbeute: 3.23 g (9.7 mmol, 64 % d.T.)

¹H-NMR (300 MHz), δ (ppm): 1.3 (2H, td, ²J(5e,5a) = 9 Hz, ³J(5e,6e) = 3 Hz, ³J(5e,6a) = 3 Hz, 5e-H), 1.95 (2H, dt, ²J(5a,5e) = 9 Hz, ³J(5a,6a) = 9 Hz, ³J(5a,6e) = 3 Hz, 5a-H), 2.3 (3H, s, 7-H), 3.4 (2H, dt, ²J(6a,6e) = 9 Hz, ³J(6a,5a) = 9 Hz, ³J(6a,5e) = 3 Hz, 6a-H), 4.25 (2H, td, ²J(6e,6a) = 9 Hz, ³J(6e,5e) = 3 Hz, ³J(6e,5a) = 3 Hz, 6e-H), 5.15 (2H, s, 4-H), 7.15 (1H, dt, ³J(10,9) = 7.8 Hz, ³J(10,11) = 7.8 Hz, ⁴J(10,8) = 1 Hz, 10-H), 7.25 (1H, d,

$^3J(8,9) = 7.8$ Hz, 8-H), 7.35 (1H, d, $^3J(11,10) = 7.8$ Hz, 11-H), 7.30 (5H, m, 1-H, 2-H, 3-H), 7.60 (1H, dt, $^3J(9,10) = 7.8$ Hz, $^3J(9,8) = 7.8$ Hz, $^4J(9,10) = 1$ Hz, 9-H)

ES+, m/z: 335 (15 %), 291 (21 %), 262 (12 %), 248 (9 %), 234 (7 %), 91 (100 %)

Synthese von 2-Methyl-3-spiro-4'-piperidin-3H-indol (**14**)

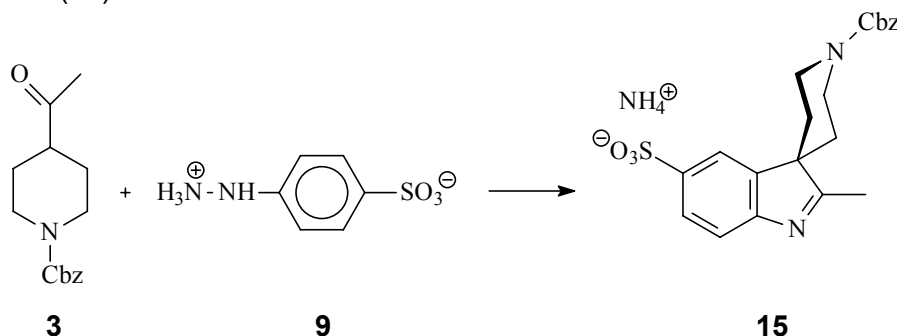


2.57 g (7.69 mmol) des Cbz-geschützten Indols (**13**) werden in 60 ml trockenem Dichlormethan und 10 ml Anisol gelöst. Die Lösung wird auf 0 °C gekühlt. Über einen Tropftrichter wird sehr langsam unter kräftigem Rühren eine Lösung von 12.29 g (92.2 mmol) Aluminiumchlorid in 30 ml Nitromethan zugegeben, wobei sich die Reaktionsmischung dunkelrot färbt. Die Lösung wird anschließend noch 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Unter kräftigem Rühren werden vorsichtig 150 ml Wasser zugegeben. Die Phasen werden im Schütteltrichter getrennt und die organische Phase wird noch zweimal mit je 50 ml Wasser extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen werden mit konz. Ammoniak versetzt, bis kein Aluminiumhydroxid mehr ausfällt. Der Feststoff wird abfiltriert und mit verd. Ammoniaklösung gewaschen. Das gelbe Filtrat wird mehrfach mit kleinen Portionen Chloroform extrahiert, bis sich dünnschichtchromatographisch kein Produkt mehr in der wässrigen Phase nachweisen lässt. Die vereinigten Chloroformphasen werden mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abdestilliert. Das zurückbleibende gelbe Öl kristallisiert in Form hellgelber Kristalle im Eisfach aus.

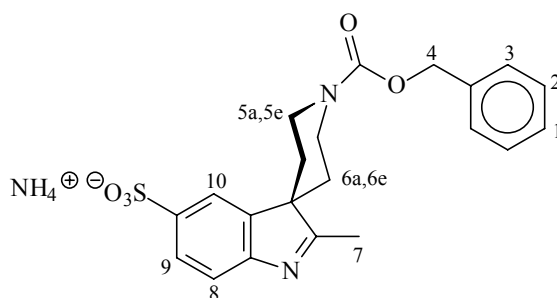
Ausbeute: 0.89 g (4.89 mmol, 63.6 % d.T.)

ES+, m/z: 435.5 (8 %), 229.1 (100%)

Synthese von 2-Methyl-3-spiro-4'-(1'-benzyloxycarbonyl)-piperidin-5-sulfo-3H-indol Ammoniumsalz (**15**)



0.1 mol (26.13 g) 1-Carboxybenzylpiperidin-4-methylketon (**3**) und 0.1 mol (18.82 g) Phenylhydrazinsulfonsäure (**9**) werden in 150 ml Eisessig gelöst. Die hellbraune, trübe Lösung wird 24 h am Rückfluss erhitzt, wobei sie sich rotbraun färbt. Die Essigsäure wird am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck abdestilliert, es bleibt ein rotbraunes, hochviskoses Öl zurück. Das Öl wird in wenig Methanol gelöst und über Aluminiumoxid filtriert (Laufmittel: Methanol). Das Lösungsmittel wird unter vermindertem Druck, zuletzt unter Ölpumpenvakuum abdestilliert, wobei das zunächst ölige Produkt (**15**) zu einem glassartigen, rotbraunen Schaum erstarrt, der mit einem Spatel zu einem feinen Pulver zerstoßen wird.

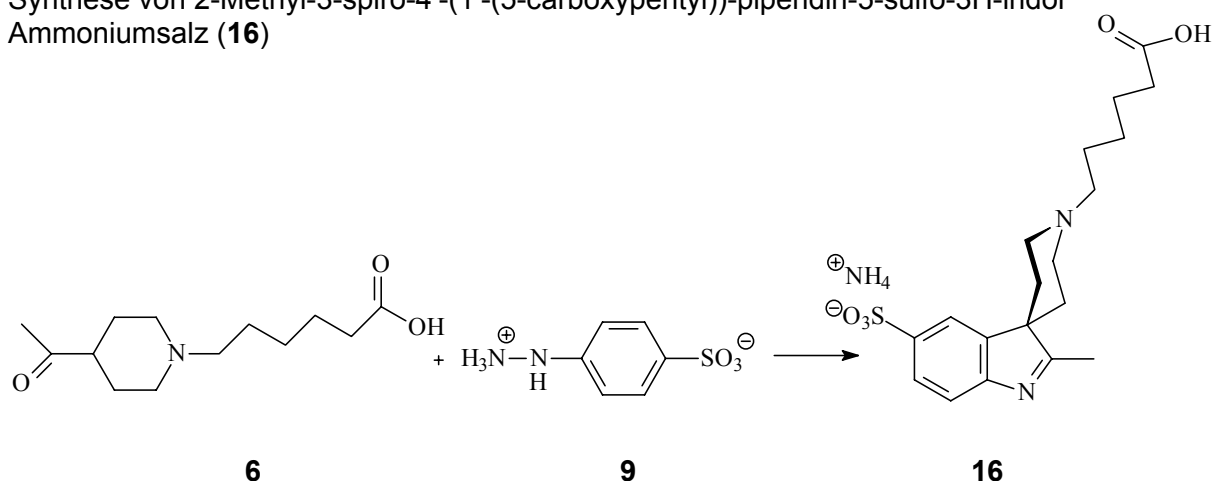


Ausbeute: 31.1 g (68.5 mmol, 68.5 % d.T.)

¹H-NMR (300 MHz), δ (ppm): 1.55 (2H, td, $^2J(5e,5a) = 9$ Hz, $^3J(5e,6e) = 3$ Hz, $^3J(5e,6a) = 3$ Hz, 5e-H), 2.35 (2H, dt, $^2J(5a,5e) = 9$ Hz, $^3J(5a,6a) = 9$ Hz, $^3J(5a,6e) = 3$ Hz, 5a-H), 2.5 (3H, s, 7-H), 3.8 (2H, dt, $^2J(6a,6e) = 9$ Hz, $^3J(6a,5a) = 9$ Hz, $^3J(6a,5e) = 3$ Hz, 6a-H), 4.55 (2H, td, $^2J(6e,6a) = 9$ Hz, $^3J(6e,5e) = 3$ Hz, $^3J(6e,5a) = 3$ Hz, 6e-H), 5.40 (2H, s, 4-H), 7.60 (5H, m, 1-H, 2-H, 3-H), 7.75 (1H, d, $^3J(8,9) = 7.8$ Hz, 8-H), 8.10 (1H, d, $^3J(9,8) = 7.8$ Hz, 9-H), 8.5 (1H, s, 10-H)

ES-, m/z: 413 (76 %), 397 (13 %), 276.9 (22 %), 263.0 (29 %), 235.9 (28 %), 221.8 (100 %), 199.0 (14 %), 79.8 (12 %)

Synthese von 2-Methyl-3-spiro-4'-(1'-(5-carboxypentyl))-piperidin-5-sulfo-3H-indol Ammoniumsalz (**16**)



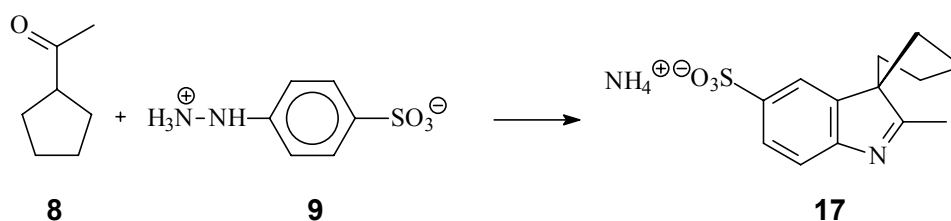
Das Carboxypentyl-derivatisierte Piperidylmethylketon (**6**) (0.847 g, 3.51 mmol) wird zusammen mit der Phenylhydrazinsulfonsäure (**9**) (0.661 g, 3.51 mmol) in 10 ml Eisessig gelöst und 48 h am Rückfluss erhitzt. Am Rotationsverdampfer wird die Essigsäure abdestilliert, es bleibt ein braunes Öl zurück. Das Öl wird Ethanol aufgenommen und über

Aluminiumoxid filtriert. Das Eluat wird eingengt und das zurückbleibende hellbraune Öl wird säulenchromatographisch gereinigt (RP18, Methanol/Wasser 4:1). Das Produkt wird als hellgelbes, hochviskoses Öl erhalten (Ausbeute: 0.564 g, 1.37 mmol, 39.1 % d. T.).

Ausbeute: 0.564 g (1.37 mmol, 39.1 % d.T.)

ES+, m/z: 393.2 (62 %), 375.2 (8 %), 279.0 (8 %), 263.0 (7 %), 250.0 (8 %), 234.9 (42 %), 221.9 (33 %), 155.9 (7 %), 79.9 (100 %)

Synthese von 2-Methyl-3-spiro-1'-cyclopentyl-5-sulfo-3H-indol Ammoniumsalz (**17**)



Das Cyclopentylmethylketon (**8**) (0.3 g, 2.94 mmol) und die Phenylhydrazinsulfonsäure (**9**) (0.553 g, 2.94 mmol) werden in 5 ml Eisessig gelöst und 24 h am Rückfluss erhitzt, wobei die Reaktionsmischung braun und trüb wird. Die Essigsäure wird am Rotationsverdampfer abdestilliert und das zurückbleibende Öl wird über Aluminiumoxid filtriert (Laufmittel: Ethanol). Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abdestilliert, zuletzt unter Ölpumpenvakuum. Das hellbraune Öl schäumt dabei auf und erstarrt glasartig. Nach zerstoßen erhält man das Produkt als hellbraunes Pulver.

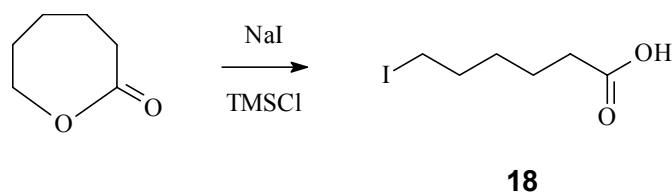
Ausbeute: 0.72 g (2.56 mmol, 87 % d.T.)

ES-, m/z: 354.1 (7 %), 308.1 (8 %), 264.0 (100 %), 229.0 (22 %), 213.9 (25 %)

6.6.3 Synthese von quaternären Indolen

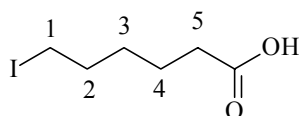
6.6.3.1 Synthese von Quaternierungsmitteln

Synthese von 6-Iodhexansäure (**18**)



0.12 mol (17.99 g) Natriumiodid werden in 100 ml Acetonitril (abs.) gelöst und nacheinander mit 0.1 mol (11,42 g) ω -Caprolacton und 0.12 mol (13.04 g) Chlortrimethylsilan (über CaH_2 getrocknet) versetzt. Die Mischung wird 5 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend werden

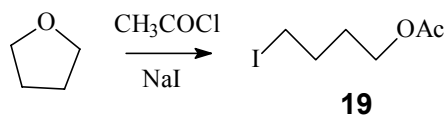
150 ml Wasser zugegeben, wobei sich ein braunes Öl abscheidet. Es werden 50 ml Diethylether zugegeben und die organische Phase wird mit wenig $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung (1% in Wasser) entfärbt. Nach abtrennen der organischen Phase wird die wässrige Phase noch zweimal mit je 50 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten Etherextrakte werden über MgSO_4 getrocknet und der Ether wird im Vakuum abdestilliert. Man erhält das Rohprodukt als schwach gelbe Kristalle, überführt diese in eine Extraktionshülse und extrahiert in einer 100 ml-Soxhlet-Extraktions-Apparatur mit 160 ml Petrolether. Nach beendeter Extraktion wird die Petroletherlösung für längere Zeit bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ stehen gelassen. Das Produkt (**18**) fällt in Form farbloser Kristalle aus (Ausbeute: 23.80 g, 98 %).



Ausbeute: 23.8 g (92.2 mmol, 98 % d.T.)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz), δ (ppm): 1.25 (2H, quin, $^3\text{J}(3,2) = 12\text{ Hz}$, $^3\text{J}(3,4) = 12\text{ Hz}$, 3-H), 1.40 (2H, quin, $^3\text{J}(4,3) = 12\text{ Hz}$, $^3\text{J}(4,5) = 12\text{ Hz}$, 4-H), 1.65 (2H, quin, $^3\text{J}(2,1) = 12\text{ Hz}$, $^3\text{J}(2,3) = 12\text{ Hz}$, 2-H), 2.10 (2H, t, $^3\text{J}(5,4) = 7.5\text{ Hz}$, 5-H), 3.05 (2H, t, $^3\text{J}(1,2) = 7.5\text{ Hz}$, 1-H)

Synthese von 4-Iodbutylacetat (**19**)

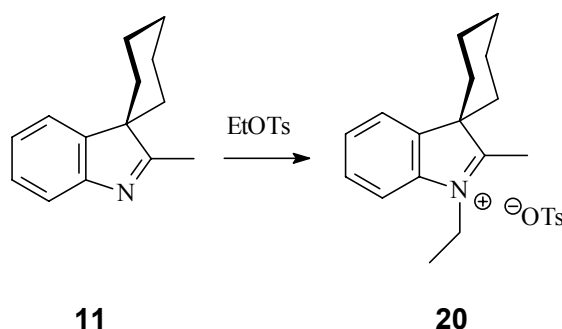


Zu einer Lösung von 0.425 mol (30.65 g, 34.5 ml) Tetrahydrofuran und 0.5 mol (74.95 g) Natriumiodid in 250 ml Acetonitril tropft man bei $0\text{ }^\circ\text{C}$ eine Lösung von 0.425 mol (33.36 g, 30.3 ml) Acetylchlorid in 25 ml Acetonitril. Die Mischung wird 24 h bei RT gerührt, das ausgefallenen NaCl wird abfiltriert und die Lösung im Vakuum eingeeengt. Die Verbleibende Lösung wird gequenched und entfärbt durch Zugabe von ges. NaHCO_3 - und 1 %iger $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung. Es wird dreimal mit je 100 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten Etherextrakte werden mit MgSO_4 getrocknet. Das Rohprodukt wird im Ölpumpenvakuum destilliert. Man erhält das Produkt (**19**) als farblose, mit der Zeit gelb werdende Flüssigkeit (b.p. = $92 - 95\text{ }^\circ\text{C}$, 0.5 mm).

Ausbeute: 91.99 g (38 mmol, 89 % d.T.)

ES+,-, m/z: 265 (100 %)

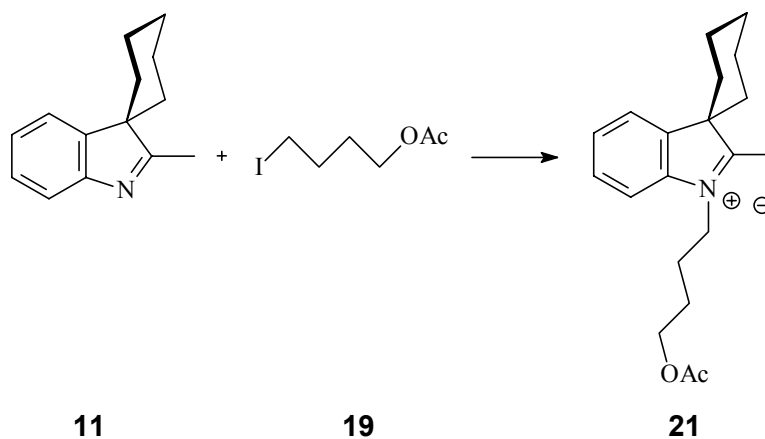
6.6.3.2 Synthese von quaternären, nicht-sulfo­nierten Indolen

Synthese von 1-Ethyl-2-methyl-3-spiro-cyclohexan-3*H*-indolium tosylat (**20**)

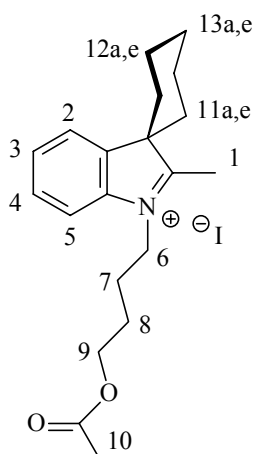
61 mmol (12.15 g) 2-Methyl-3-spiro-cyclohexan-3*H*-indol (**11**) und 65 mmol (13.02 g) 4-Toluolsulfonsäureethylester werden 5 h bei 110 °C gerührt. Nach Erkalten wird die Mischung mit 150 ml Diethylether überschichtet und über Nacht gerührt. Das Produkt kristallisiert und wird abfiltriert. Nach digerieren mit Diethylether und Trocknen im Vakuum erhält man das Produkt als hellbraunen Feststoff.

Ausbeute: 19.02 g (47.6 mmol, 78 % d.T.)

ES+·, m/z: 228 (100 %)

Synthese von 1-(4-Acetoxybutyl)-2-methyl-3-spiro-cyclohexan-3*H*-indolium iodid (**21**)

0.273 mol (54.32 g) 2-Methyl-3-spiro-cyclohexan-3*H*-indol (**11**) und 0.273 mol (65.97 g) 4-Iodbutylacetat (**19**) werden gemischt und ohne Lösungsmittel 5 h auf 110 °C erhitzt. Nach dem Erkalten wird die Mischung in 100 ml Dichlormethan aufgenommen und langsam mit 500 ml Diethylether versetzt. Zunächst bilden sich 2 Phasen. Nach längerem Rühren kristallisiert das Produkt. Es wird abfiltriert, mit Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Man erhält das Produkt (**21**) als beiges Pulver.

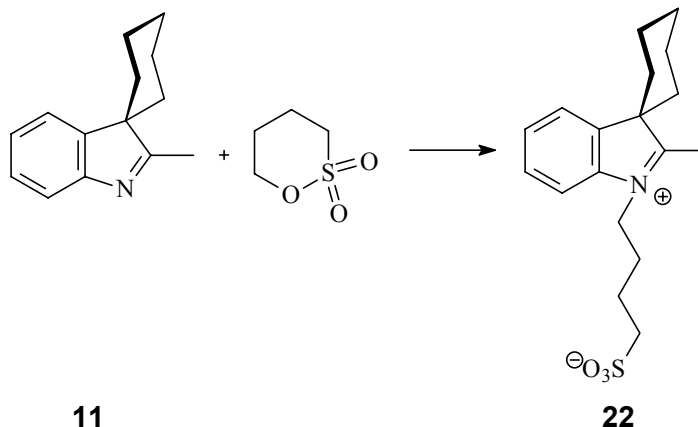


Ausbeute: 104.86 g (206 mmol, 87 % d.T.)

ES+, m/z: 314 (55 %), 258 (27 %), 254 (40 %), 212 (48 %), 200 (31 %), 198 (100 %), 185 (17 %), 144 (44 %), 73 (17 %), 55 (47 %), 43 (15 %)

¹H-NMR (300 MHz), δ (ppm): 1.55 (2H, d, $^2J(11e,11a) = 12.8$ Hz, 11e-H), 1.80 – 2.00 (12H, m, 7-H, 8-H, 11a-H, 12a-H, 12e-H, 13a-H, 13e-H), 2.1 (3H, s, 1-H), 4.05 (2H, t, $^3J(6,7) = 5.9$ Hz, 6-H), 4.70 (2H, t, $^3J(7,6) = 6.5$ Hz, 7-H), 7.5 (1H, dt, $^3J(4,3) = ^3J(4,5) = 7.2$ Hz, $^4J(4,2) = 1$ Hz, 4-H), 7.6 (1H, dt, $^3J(3,4) = ^3J(3,2) = 7.2$ Hz, $^4J(3,5) = 1$ Hz, 3-H), 7.8 (1H, dd, $^3J(5,4) = 7.9$ Hz, $^4J(5,3) = 1$ Hz, 5-H), 7.9 (1H, dd, $^3J(2,3) = 7.2$ Hz, $^4J(2,4) = 1$ Hz, 2-H)

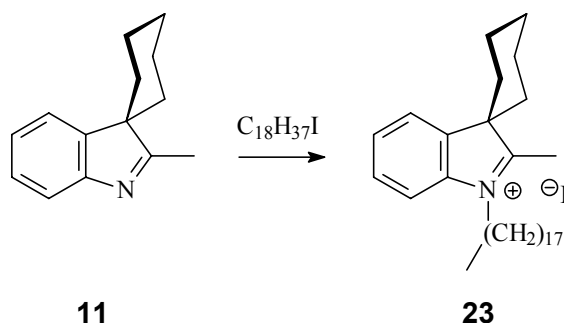
Synthese von 2-Methyl-3-spiro-cyclohexan-1-(4-sulfobutyl)3H-indolium betain (**22**)



Das Indol (**11**) (5.716 g, 28.7 mmol) wird in 3.3 ml (4.36 g, 32 mmol) Butansulfon 4h auf 120 °C erwärmt. Das entstehend, hochviskose Öl wird durch rühren mit 50 ml Diethylether zur Kristallisation gebracht. Das Produkt wird abfiltriert, zweimal mit je 10 ml Ethylacetat und einmal mit 10 ml Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 7.93 g (23.5 mmol, 82 % d.T.)

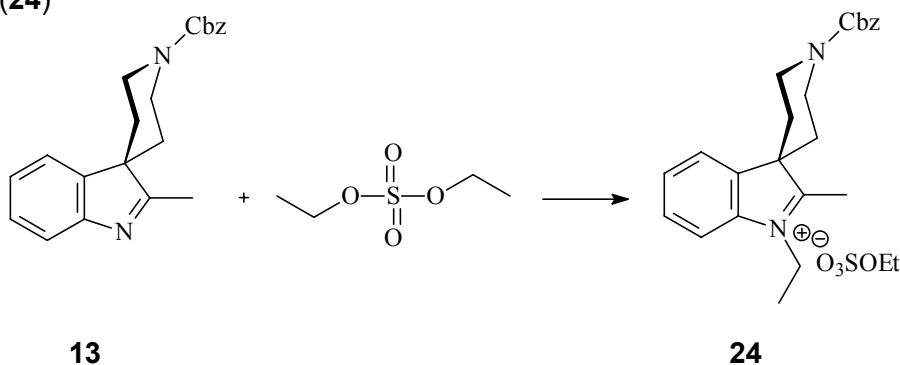
ES+,-, m/z: 358 (100 %), 336 (16 %)

Synthese von 2-Methyl-1-octadecyl-3-spiro-cyclohexan-3H-indolium iodid (**23**)

25 mmol (4.98 g) des Cyclohexylindols (**11**) und 25 mmol Stearyliodid (9.51 g) werden gemischt und 3 h auf 120 °C erhitzt. Die anfangs gelbliche Mischung färbt sich im Laufe der Synthese dunkelbraun und wird nach Abkühlen fest. Der Feststoff wird in 15 ml Dichlormethan gelöst und das Produkt wird durch Zugabe von Diethylether gefällt. Der hellrosafarbene Feststoff wird abfiltriert und mit viel Ether gewaschen, bis er farblos ist.

Ausbeute: 8.63 g (14.9 mmol, 59.5 % d.T.)

ES⁺, m/z: 452 (100 %)

Synthese von 1-Ethyl-2-methyl-3-spiro-4'-(1'-benzyloxycarbonyl)piperidin-3H-indolium Ethylsulfat (**24**)

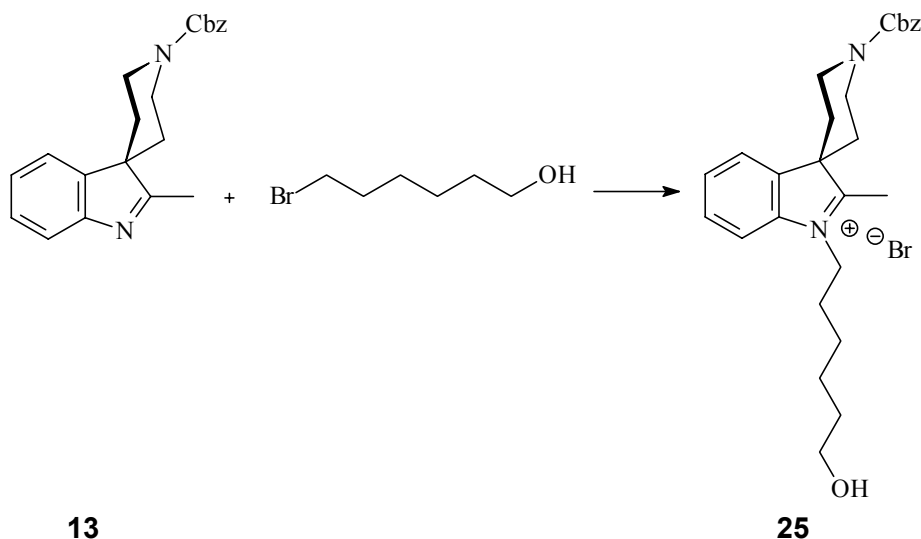
Unter Schutzgasatmosphäre werden 2.06 g (6 mmol) des Indols (**13**) in 3 ml Toluol gelöst. Mit einer Spritze werden 1.02 g (0.89 ml, 6.6 mmol) Diethylsulfat zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 3.5 h am Rückfluß erhitzt, wobei sich ein dunkel-violettes Öl abscheidet, das nach Erkalten fest wird. Die überstehende Lösung wird abdekantiert und der Rückstand wird mehrfach mit kleinen Portionen Toluol gewaschen. Der Feststoff wird säulenchromatographisch über Kieselgel gereinigt (SP, Aceton/Eisessig = 10:2). Man erhält das quaternierte Indol (**24**) als rötliches, hochviskoses Öl.

Ausbeute: 1.32 g (2.7 mmol, 45 % d.T.)

ES⁺, m/z: 363 (28 %), 290 (5 %), 276 (6 %), 272 (38 %), 257 (13 %), 243 (6 %), 228 (5 %), 212 (13 %), 198 (6 %), 186 (20 %), 172 (50 %), 91 (100 %)

ES⁻, m/z: 125 (100 %)

Synthese von 1-(6-hydroxyhexyl)-2-methyl-3-spiro-4'-(1'-benzyloxycarbonyl)-piperidin-3H-indolium bromid (**25**)

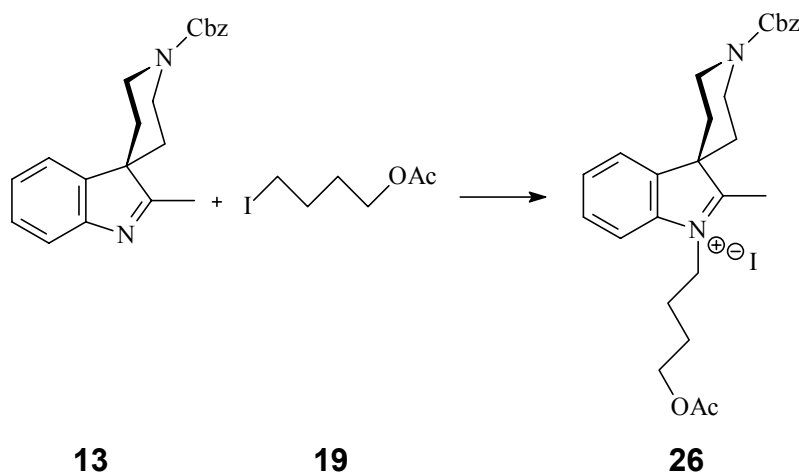


Das Indol (**13**) (1.14 g, 3.4 mmol) und 0.52 ml (0.724 g, 4 mmol) Bromhexanol werden unter Schutzgasatmosphäre in 1 ml Toluol gelöst und sieben Stunden auf 80 °C erwärmt. Im Laufe der Reaktion scheidet sich ein dunkelbraunes Öl ab, das nach Erkalten zu einer hochviskosen Masse wird. Das Öl wird mehrfach mit Toluol gewaschen und anschließend säulenchromatographisch über Kieselgel gereinigt (SP, Aceton/Eisessig = 10 : 2). Das Produkt wird als rotbraunes Öl erhalten (0.71 g, 1.6 mmol, 48 % d. Th.).

Ausbeute: 0.71 g (1.6 mmol, 48 % d.T.)

ES+, m/z: 534 (100 %), 385 (9 %), 139 (7 %)

Synthese von 1-(4-Acetoxybutyl)-2-methyl-3-spiro-4'-(1'-benzyloxycarbonyl)-piperidin-3H-indolium iodid (**26**)



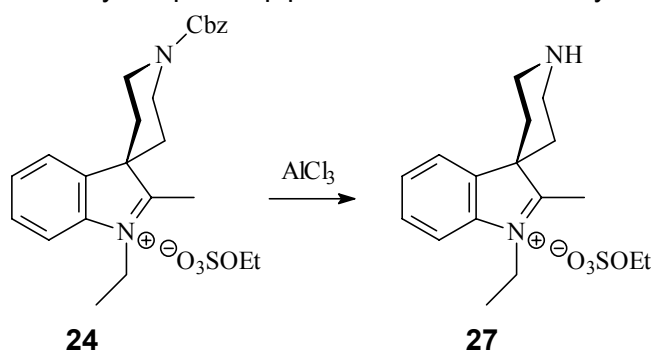
Das Indol (**13**) (2.41 g, 7.2 mmol) wird in 5 ml Toluol gelöst. 3.63 g (15 mmol) Iodbutylacetat (**19**) werden zugegeben und die Mischung wird 4 h auf 120 °C erwärmt. Die Lösung färbt

sich im Laufe der Zeit tief violett und ein dunkles Öl scheidet sich ab. Nach Abkühlen der Reaktionsmischung werden 20 ml Diethylether unter kräftigem Rühren zugegeben, wobei das Öl kristallisiert. Der Ether wird abdekantiert und der zurückbleibende dunkel violette Feststoff wird in sehr wenig Dichlormethan gelöst. Durch Zugabe von Diethylether wird das Produkt erneut gefällt. Das derart vorgereinigte Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (SP, Aceton/Dichlormethan 1:2). Man erhält das Produkt als hellvioletten Feststoff.

Ausbeute: 3.73 g (6.5 mmol, 90 % d.T.)

ES+, m/z: 449.4 (100 %), 315.4 (12 %)

Synthese von 1-Ethyl-2-methyl-3-spiro-4'-piperidin-3H-indolium Ethylsulfat (**27**)

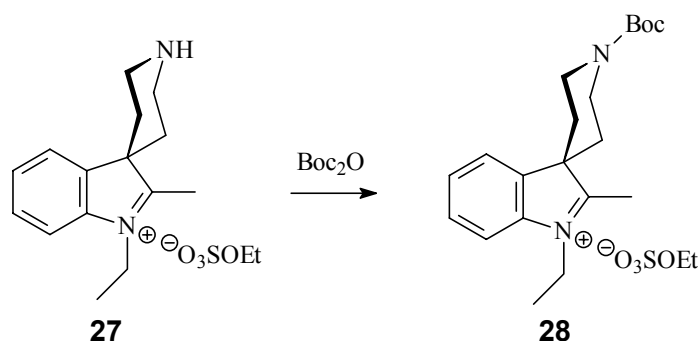


Das geschützte Indol (**24**) (2.13 g, 4.36 mmol) wird in 40 ml trockenem Dichlormethan und 5.7 ml Anisol gelöst und auf 0 °C gekühlt. Mit Hilfe eines Tropftrichters wird innerhalb von 30 min eine Lösung von 6.97 g (52.3 mmol) Aluminiumchlorid in 20 ml Nitromethan unter kräftigem Rühren zugegeben. Die Mischung wird anschließend noch 4 h bei Raumtemperatur gerührt. Es werden anschließend unter Eiskühlung langsam 80 ml Wasser zur Reaktionsmischung zugesetzt. Die Phasen werden in einem Schütteltrichter getrennt und die organische Phase wird noch zweimal mit je 30 ml Wasser extrahiert. Die rötliche, wässrige Phase wird mit konz. Ammoniak versetzt, bis kein weiteres Aluminiumhydroxid mehr ausfällt. Das Aluminiumhydroxid wird abfiltriert und die nun gelbe, wässrige Phase wird mit Natriumchlorid gesättigt. Das Produkt wird mit Chloroform extrahiert. Die Extraktion muss sehr häufig (mind. 10 mal) mit kleinen Portionen Chloroform durchgeführt werden. Auch dann lässt sich das Produkt nicht vollständig in die organische Phase extrahieren. Einengen der Wasserphase und erneutes häufiges Extrahieren kann die Ausbeute erhöhen. Die vereinigten Chloroformphasen werden mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abdestilliert. Trocknen des Produktes im Ölpumpenvakuum führt zu Kristallisation des gelblichen Öls.

Ausbeute: 0.64 g (1.59 mmol, 36.4 % d.T.)

ES+, m/z: 435.5 (8 %), 229.1 (100 %)

Synthese von 1-Ethyl-2-methyl-3-spiro-4'-(1'-tert.-butyloxycarbonyl)-piperidin-3H-indolium Ethylsulfat (**28**)

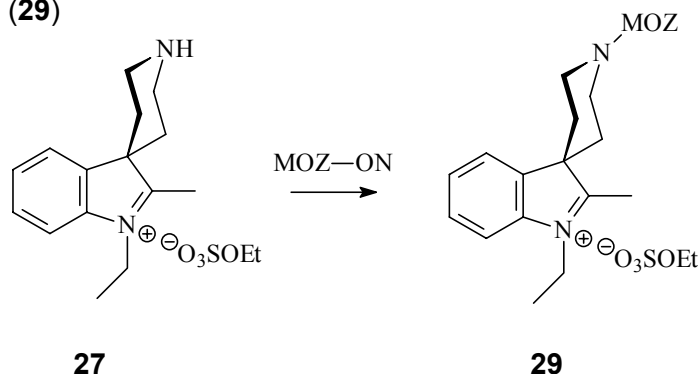


92.7 mg (0.23 mmol) des entschützten Indols (**27**) werden in 0.7 ml trockenem Methanol und 0.3 ml Triethylamin gelöst. Zu der gelblichen Lösung werden 100 mg (0.46 mmol) Boc-Anhydrid gegeben. Die Reaktionsmischung wird 30 min bei Raumtemperatur gerührt und dann 5 min auf 50 °C erwärmt. Die Mischung wird am Rotationsverdampfer eingeeengt, wobei ein hellbraunes Öl zurück bleibt. Es wird 1 ml verdünnte HCl (pH > 2.15) zugegeben und die Mischung wird 10 min bei 0 °C gerührt. Das Produkt wird mit Dichlormethan extrahiert und die organische Phase wird mit verdünnter Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die gelbe, organische Phase wird mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert. Das Produkt (**28**) fällt als hellbraunes Öl an.

Ausbeute: 80.4 mg (0.18 mmol, 76.9 % d.T.)

ES⁺, m/z: 329.6 (22 %), 273.4 (100 %), 229.5 (23 %), 202.6 (8 %), 172.6 (8%)

Synthese von 1-Ethyl-2-methyl-3-spiro-4'-(1'-(4-methoxybenzyl)oxycarbonyl)-piperidin-3H-indolium Ethylsulfat (**29**)



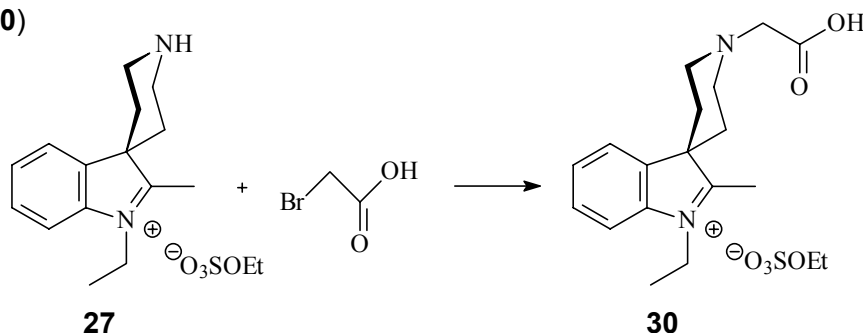
Das entschützte Indol (**27**) (22 mg, 55 µmol) und 34.2 mg (110 µmol) α-(4-Methoxybenzyloxycarbonyloxyimino)phenylacetonitril (Moz-ON) werden in 1 ml Ethanol absolut und 0.02 ml Triethylamin unter Schutzgasatmosphäre gelöst. Die Mischung wird 24 h bei Raumtemperatur gerührt und färbt sich dabei rötlich. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abdestilliert und das zurückbleibende rote Öl wird in Dichlormethan aufgenommen. Es wird drei mal mit kleinen Portionen Wasser extrahiert. Die organische Phase wird mit Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer

abdestilliert. Das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (SP, Methanol/Dichlormethan 1:10). Man erhält das Produkt als hellrosa Feststoff.

Ausbeute: 9.1 mg (17.6 μ mol, 32 % d.T.)

ES+, m/z: 393.3 (15 %), 186 (11 %), 121.1 (100 %)

Synthese von 1-Ethyl-2-methyl-3-spiro-4'-(1'-carboxymethyl)-piperidin-3H-indolium Ethylsulfat (**30**)

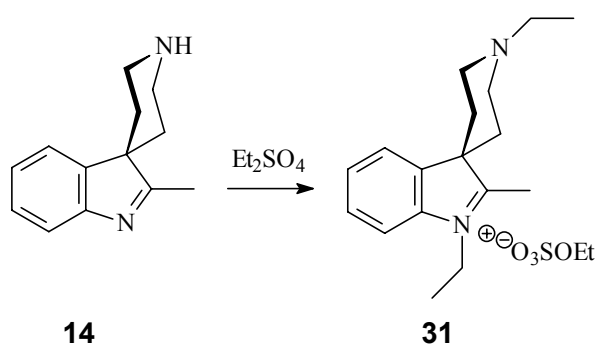


32 mg (0.1 mmol) des Indols (**27**) werden in 3 ml Ethanol und 3 ml Wasser gelöst. 0.139 g (1 mmol) Bromoessigsäure werden zugegeben und der pH wird mit verdünnter NaOH auf 7 – 8 eingestellt. Die Reaktionsmischung wird 1 h 15 min bei 50 °C und 1 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei der pH gelegentlich durch Zugabe einiger Tropfen verd. NaOH nachgeregelt wird. Das Ethanol wird am Rotationsverdampfer abdestilliert und es werden noch 5 ml Wasser zugegeben. Die wässrige Phase wird mit NaCl gesättigt und mit NaOH konz. auf pH 14 gebracht. Das Produkt (als Na⁺-Salz) fällt als farbloser Feststoff aus und wird abfiltriert. (Ausbeute: 10 mg, 23 μ mol, 23 %)

Ausbeute: 10 mg (23 μ mol, 23 % d.T.)

ES+, m/z: 286.9 (16 %), 199.8 (16 %), 185.8 (100 %), 171.8 (14 %), 87.7 (11 %), 9.7 (10 %)

Synthese von 1-Ethyl-2-methyl-3-spiro-4'-(1'-ethyl)-piperidin-3H-indolium Ethylsulfat (**31**)



Unter Schutzgasatmosphäre werden 0.5 g (2.5 mmol) des entschützten Indols (**14**) und 1.35 ml (1.55 g, 10 mmol) Diethylsulfat in 5 ml Toluol gelöst und 4 h am Rückfluss erhitzt. Die Reaktionsmischung färbt sich tiefviolett und das Produkt scheidet sich zum Teil ölig ab. Nach Erkalten werden 15 ml Aceton unter kräftigem Rühren zur Reaktionsmischung

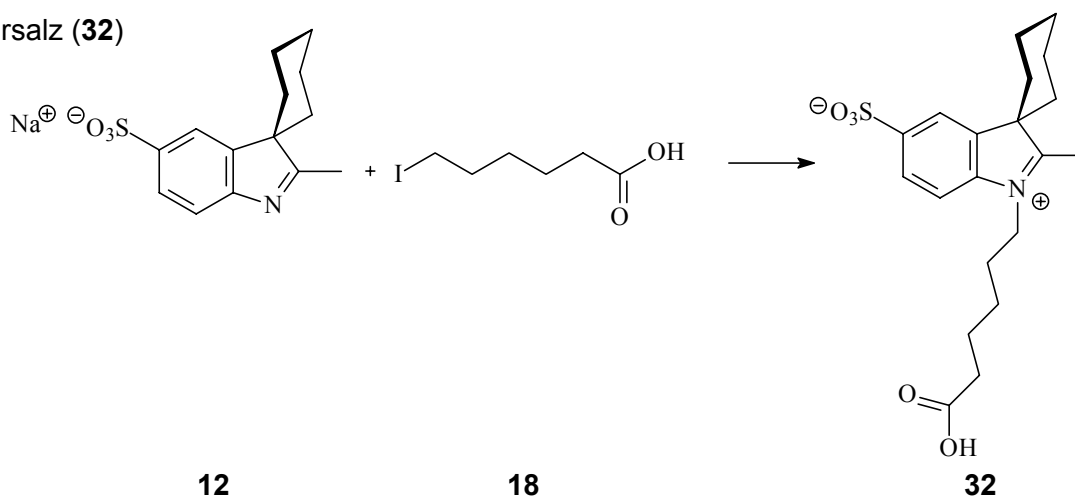
gegeben. Das Produkt (**31**) kristallisiert als farbloser Feststoff und wird abfiltriert. Es wird mit sehr viel Aceton gewaschen und im Ölpumpenvakuum getrocknet. Man erhält 0.77 g (2.02 mmol, 81 %) des feinpulvrigen Produktes.

Ausbeute: 0.77 g (2.02 mmol, 81 % d.T.)

ES+, m/z: 256.2 (35 %), 202.1 (100 %), 160.2 (7 %)

6.6.3.3 Synthese von quaternären, sulfonierten Indolen

Synthese von 1-(5-Carboxypentyl)-2-Methyl-3-spiro-cyclohexan-5-sulfo-3*H*-indolium Innersalz (**32**)



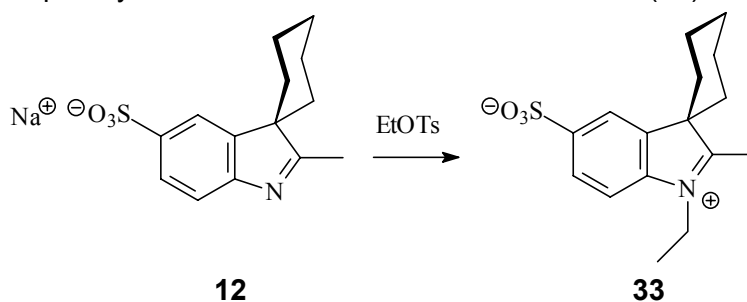
25 mmol (7.94 g) Indols (**12**) und 50 mmol (9.78 g) 6-Iodhexansäure (**18**) werden ohne Lösungsmittel 5 h bei 120 °C zusammengeschmolzen. Nach dem Abkühlen wird die Zähle Mischung mit Aceton digeriert und im Vakuum getrocknet. Man erhält das Produkt (**32**) als hellbraunes Pulver.

Ausbeute: 9.49 g (18.5 mmol, 74 % d.T.)

ES-, m/z: 392 (100 %)

ES+,-, m/z: 416 (1100 %)

1-Ethyl-2-Methyl-3-spiro-cyclohexan-5-sulfo-3*H*-indolium Innersalz (**33**)



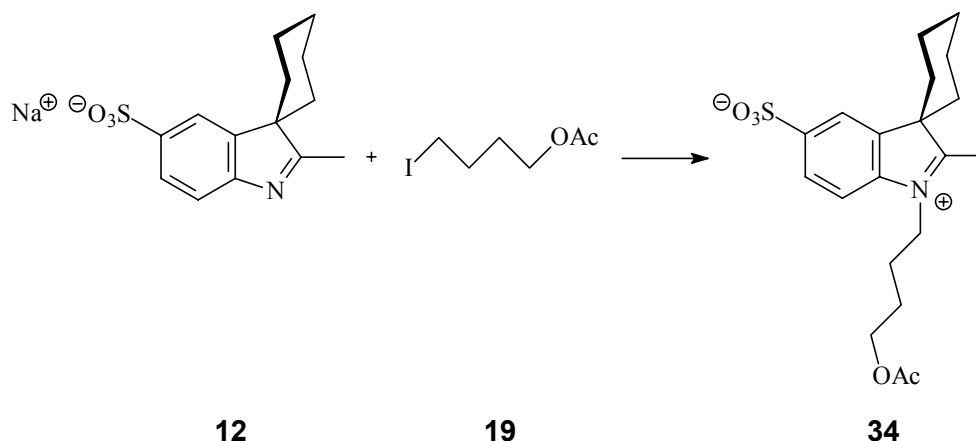
20 mmol (6.402 g) Indol (**12**) und 60 mmol (12.015 g) 4-Toluolsulfonsäureethylester werden in 25 ml 1,2-Dichlorbenzol 17 h auf 130 °C erhitzt. Nach Abkühlen werden 30 ml Aceton

zugesezt, wobei das Produkt (**33**) kristallisiert. Das Produkt wird abfiltriert und mit Aceton digeriert. Zum Schluss wird mit Ether gewaschen und das Produkt im Vakuum getrocknet. Man erhält 8.484 g (16.4 mmol, 82 % d. T.).

Ausbeute: 8.48 g (16.4 mmol, 82 % d.T.)

ES+,-, m/z: 330 (100 %), 308 (7 %)

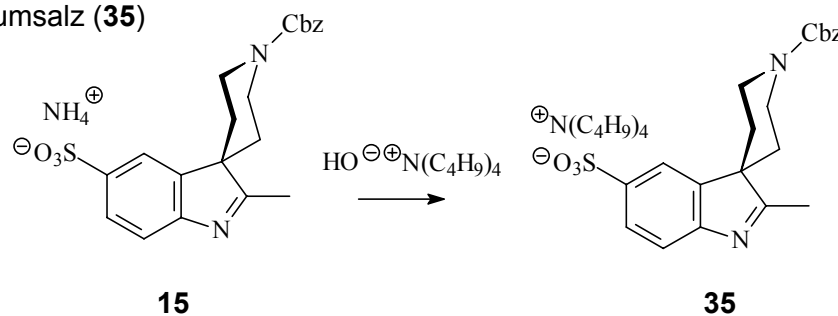
1-(4-Acetoxybutyl)-2-methyl-3-spiro-cyclohexan-5-sulfo-3H-indolium Innersalz (**34**)



6.402 g (20 mmol) Indol (**12**) und 14.52 g (60 mmol) 4-Iodbutylacetat (**19**) werden bei 120 °C für 4 h erhitzt. Das überschüssige 4-Iodbutylacetat wird abdekantiert. Der Rückstand wird mit Aceton gewaschen, in sehr wenig Dimethylformamid gelöst und das Produkt aus der Lösung mit Aceton gefällt. Der Niederschlag wird bei 60 °C im Ölpumpenvakuum getrocknet. Die teerartige Masse schäumt dabei auf und erstarrt in glassartiger Form. Man erhält 5.57 g (14.2 mmol, 71 % d. T.) des braunen Produktes.

Ausbeute: 5.57 g (14.2 mmol, 71 % d.T.)

Synthese von 2-Methyl-3-spiro-4'-(1'-benzyloxycarbonyl)-piperidin-5-sulfo-3H-indol tert.-Butylammoniumsalz (**35**)



3.0 g (6.94 mmol) des Ammonimasalzes des Indols (**15**) werden in Wasser gelöst und über einen stark sauren Ionentauscher (Amberlite IR- 120) filtriert. Das Filtrat wird bei Raumtemperatur unter Rühren mit 4.7 ml (7 mmol) Tetrabutylammonium Hydroxid Lösung (1.5 M) versetzt, wobei das Produkt zum teil ölig ausfällt. Zur Entfernung des überschüssigen

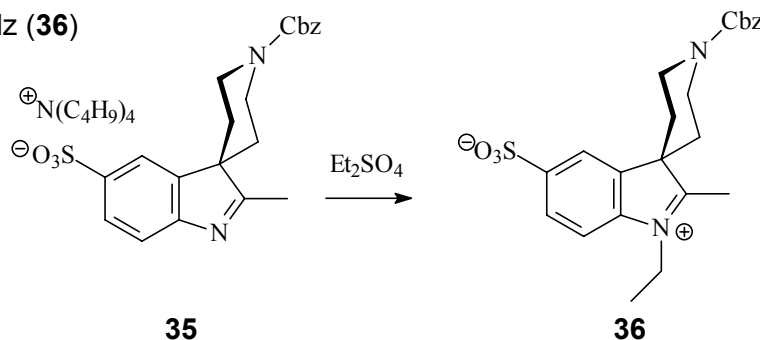
Tetrabutylammonium Hydroxids wird eine Spatelspitze schwach sauren Ionentauschers (Amberlite IRC-86) zugegeben und nach 5 min rühren wieder abfiltriert. Nach abdestillieren des Wassers am Rotationsverdampfer und mehrfachem waschen des Destillationsrückstandes mit absolutem Ethanol erhält man das Tetrabutylammoniumsalz des Indols (**35**) als braunes Öl. Das Produkt wird in wenig Dichlormethan aufgenommen und säulenchromatographisch gereinigt (SP, Aceton/Methanol/Dichlormethan 1:1:4). Man erhält 3.43 g (5.21 mmol, 75.1 % d. T.) des Produktes (**35**) als hellbraunes Pulver.

Ausbeute: 3.43 g (5.21 mmol, 75.1 % d.T.)

ES+, m/z: 242 (100 %)

ES-, m/z: 413 (27 %), 397 (14 %), 277 (28 %), 263 (24 %), 236 (36 %), 222 (100 %), 199 (20 %), 80 (23 %), 65 (9 %)

Synthese von 1-Ethyl-2-methyl-3-spiro-4'-(1'-benzyloxycarbonyl)-piperidin-5-sulfo-3*H*-indolium Innersalz (**36**)



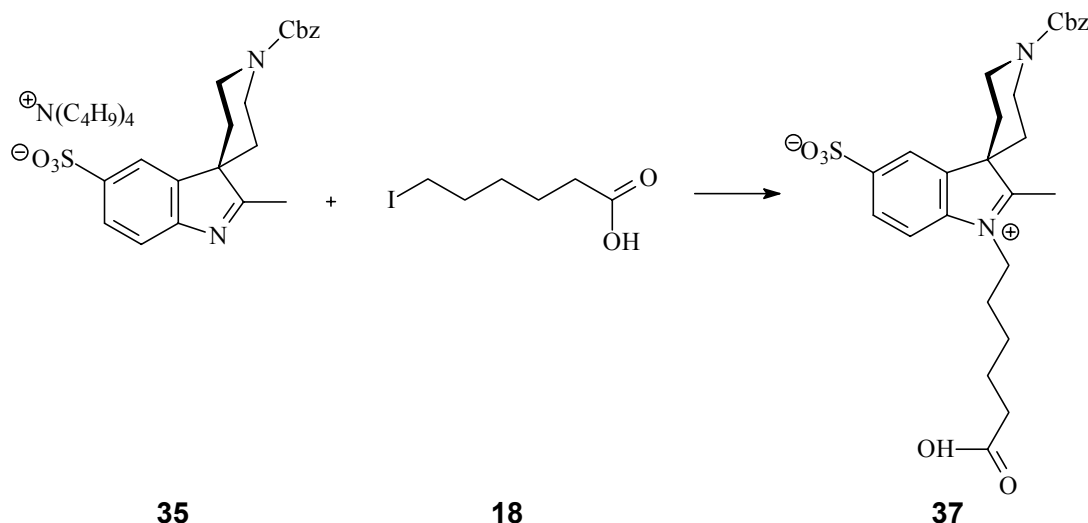
0.709 g (1.08 mmol) des Indols (**35**) und 0.323 g (1.62 mmol) Diethylsulfat werden in 6 ml Acetonitril gelöst und 24 h am Rückfluss erhitzt. Die dunkelviolette Lösung wird am Rotationsverdampfer eingeeengt. Das zurückbleibende violette Öl wird in sehr wenig Dichlormethan gelöst und das Produkt wird durch Zugabe von Aceton ausgefällt, abfiltriert und mit Aceton gewaschen. Man erhält ein hellviolettes, feinpulvriges Produkt (**36**).

Ausbeute: 0.28 g (0.64 mmol, 59 % d.T.)

ES+, m/z: 481 (12 %), 465 (29 %), 443 (12 %), 265 (18 %), 137 (27 %), 60 (100 %)

ES-, m/z: 441 (49 %), 291 (9 %), 277 (7%), 251 (6 %), 222 (100 %)

Synthese von 1-(5-Carboxypentyl)-2-Methyl-3-spiro-4'-(1'-benzyloxycarbonyl)-piperidin-5-sulfo-3H-indolium Innersalz (**37**)



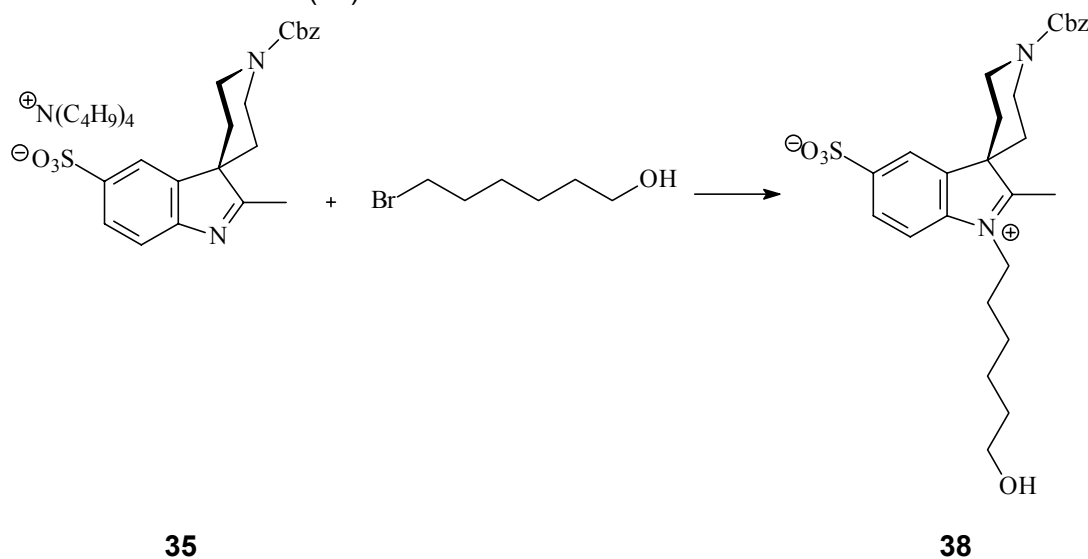
Das Indol (**35**) (3.43 g, 5.21 mmol) und 1.26 g (5.21 mmol) Iodhexansäure (**18**) werden in 20 ml Acetonitril gelöst und 30 h am Rückfluß erhitzt, wobei sich die Lösung violett färbt und ein farbloser Feststoff ausfällt. Der Feststoff wird abfiltriert und noch mehrfach mit kleinen Portionen Acetonitril gewaschen. Nach Trocknem im Exsikkator unter Ölpumpenvakuum erhält man das quaternierte Indol (**37**) als hellviolett Pulver.

Ausbeute: 1.10 g (2.08 mmol, 39.9 % d.T.)

ES+, m/z: 529.4 (100 %)

ES-, m/z: 526.9 (88 %), 483.0 (7 %), 412.9 (6 %), 276.8 (7 %), 221.6 (100 %)

Synthese von 1-(6-Hydroxyhexyl)-2-Methyl-3-spiro-4'-(1'-benzyloxycarbonyl)-piperidin-5-sulfo-3H-indolium Innersalz (**38**)



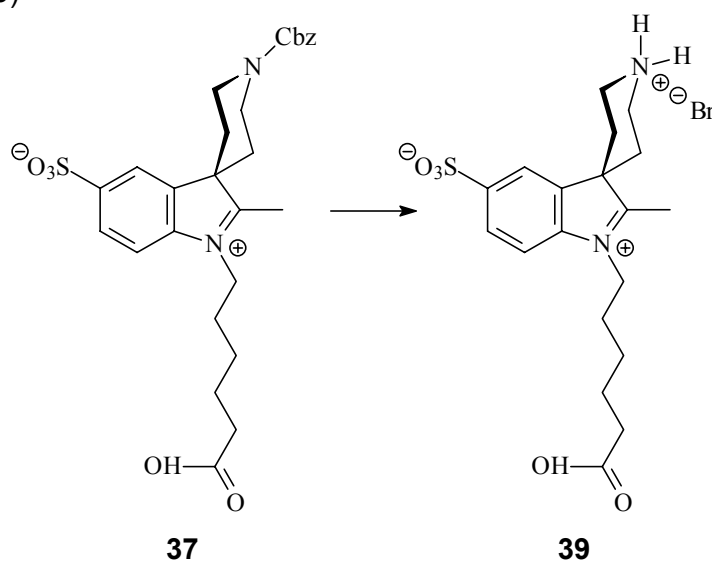
0.43 g (0.65 mmol) des Indols (**35**) und 0.18 g (0.13 ml, 0.98 mmol) Bromhexanol werden in 5 ml Acetonitril gelöst und 24 h am Rückfluss erhitzt. Die dunkelviolette Lösung wird am

Rotationsverdampfer eingengt und das zurückbleibende violette Öl wird in sehr wenig Dichlormethan gelöst. Durch Zugabe von Aceton wird das Produkt gefällt. Man erhält das Produkt (**38**) als dunkelvioletten, leicht öligen Feststoff (0.15 g, 0.3 mmol, 67 % d. T.).

Ausbeute: 0.15 g (0.3 mmol, 67 % d.T.)

ES-, m/z: 513 (52 %), 363 (7 %), 277 (8 %), 222 (100 %)

Synthese von 1-(5-Carboxypentyl)-2-Methyl-3-spiro-4'-piperidinium-bromid-5-sulfo-3H-indolium Betain (**39**)

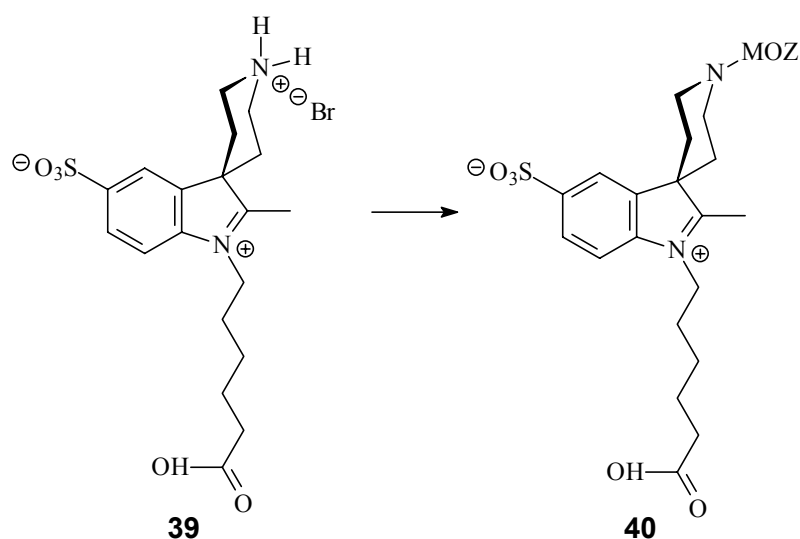


Das geschützte Indol (**37**) (1.101 g, 2.09 mmol) und 1 ml Anisol werden unter Schutzgasatmosphäre in 10 ml einer 33 %igen Mischung von HBr in Eisessig gegeben. Die dunkelrote Lösung wird 2.5 h bei Raumtemperatur gerührt, wobei leichte Gasentwicklung zu beobachten ist. Es werden 80 ml Diethylether zugegeben und die Mischung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt kristallisiert als dunkelroter Feststoff, der abfiltriert und mit viel Diethylether gewaschen wird. Das Produkt wird im Exsikkator über P₂O₅ im Ölpumpenvakuum getrocknet und gelagert. (Ausbeute: 0.97 g, 2.05 mmol, 98 % d. T.).

Ausbeute: 0.97 g (2.05 mmol, 98 % d.T.)

ES+, m/z: 395.4 (100 %)

Synthese von 1-(5-Carboxypentyl)-2-methyl-3-spiro-4'-(1'-(4-methoxybenzyl)oxycarbonyl)-piperidin-5-sulfo-3H-indolium Betain (**40**)

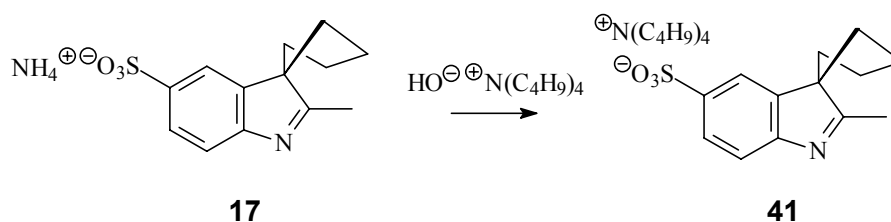


Das Indol (**39**) (0.356 g, 0.749 mmol) wird in 5 ml DMF gelöst. 0.3 ml Triethylamin und 0.465 g MOZ-ON (1.5 mmol) werden zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt, wobei sich die vorher tiefviolette Lösung gelb-orange färbt. Die Lösung wird am Rotationsverdampfer eingeengt und das Produkt durch Zugabe von Aceton gefällt. Der hellbraune Feststoff (**40**) wird abfiltriert und im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Ausbeute: 0.155 g (0.277 mmol, 37 % d.T.)

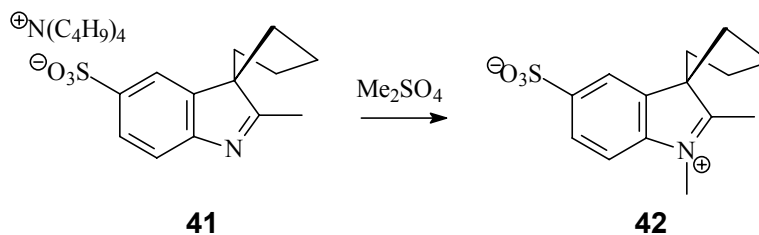
ES-, m/z: 557.4 (15 %), 81 (100 %)

Synthese von 2-Methyl-3-spiro-cyclopentan-5-sulfo-3H-indol Tetrabutylammoniumsalz (**41**)



Das Indol (**17**) (0.97 g, 3.44 mmol) wird in wässriger Lösung über einen stark sauren Ionentauscher filtriert (Amberlite IR-120). Zu der wässrigen Lösung werden 2.3 ml (3.4 mmol) Tetrabutylammonium Hydroxid Lösung (1.5 M) gegeben und die Lösung wird 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Es wird eine Spatelspitze schwach sauren Ionentauschers (Amberlite IRC-86) zugegeben und nach 5 min rühren wieder abfiltriert. Das Wasser wird am Rotationsverdampfer abdestilliert und das zurückbleibende hellbraune Öl wird mehrfach mit absolutem Ethanol gewaschen. Das Rohprodukt (**41**) wird direkt weiter in der Synthese eingesetzt.

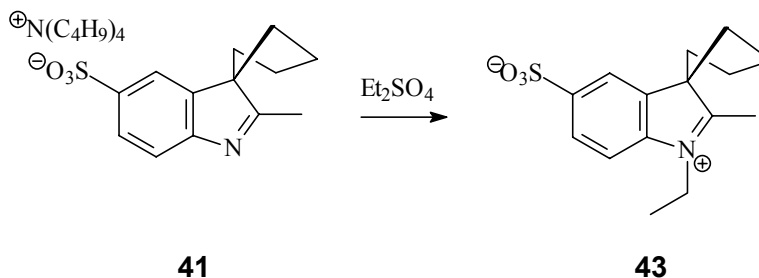
Ausbeute: 0.82 g (2.89 mmol, 84 % d.T.)

Synthese von 1,2-Dimethyl-3-spiro-cyclopentan-5-sulfo-3H-indolium Betain (**42**)

0.65 g (2.29 mmol) des Indols (**41**) und 0.33 ml (0.434 g, 3.44 mmol) Dimethylsulfat werden in 6 ml Acetonitril gelöst und 20 h auf 80 °C erwärmt. Zu der dunkelbraunen Lösung werden nach Erkalten unter kräftigem Rühren 15 ml Aceton gegeben. Das Produkt fällt als hellbrauner Feststoff aus und wird abfiltriert. Bei Luftkontakt wird das Produkt jedoch schnell wieder ölig und wird daher über P₂O₅ im Vakuum im Exsikkator aufbewahrt oder direkt in weiteren Synthesen eingesetzt. (Ausbeute: 0.5 g, 1.79 mmol, 78 % d. T.)

Ausbeute: 0.5 g (1.79 mmol, 78 % d.T.)

ES+, m/z: 280.2 (29 %), 265.0 (14 %), 238.2 (29 %), 199.1 (100 %), 184.0 (11 %), 171.2 (39 %)

Synthese von 1-Ethyl-2-methyl-3-spiro-cyclopentan-5-sulfo-3H-indolium Innersalz (**43**)

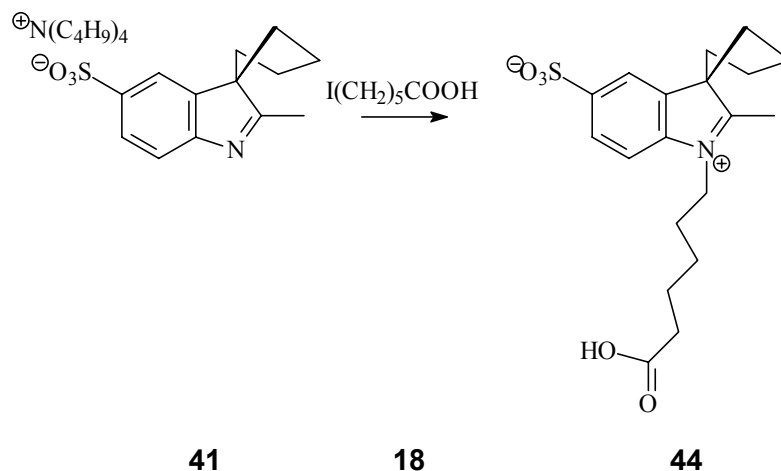
Das Indol (**41**) (5.256 g, 10.37 mmol) und 1.96 ml (2.313 g, 15 mmol) Diethylsulfat werden in 10 ml Acetonitril gelöst und 30 h am Rückfluss erhitzt. Die Reaktionsmischung färbt sich violett und das Produkt (**43**) fällt teilweise als öliger Niederschlag aus. Nach Erkalten werden unter kräftigem Rühren 30 ml Aceton zugegeben. Das Produkt fällt als hellvioletter Feststoff aus, wird abfiltriert, mit viel Aceton gewaschen und im Ölpumpenvakuum über P₂O₅ getrocknet.

man 0.716 g (2.44 mmol, 24.7 % d.T.) des Produktes.

Ausbeute: 0.716 g (2.44 mmol, 24.7 % d.T.)

ES+, m/z: 332.1 (42 %), 316.1 (55 %), 294.1 (100 %), 222.6 (35 %)

Synthese von 1-(5-Carboxypentyl)-2-methyl-3-spiro-cyclopentan-5-sulfo-3H-indolium Betain (**44**)



0.32 g (1.15 mmol) des Indols (**41**) und 0.419 g (1.73 mmol) Iodhexansäure (**18**) werden in 3 ml Acetonitril gelöst und 24 h am Rückfluss erhitzt. Zu der dunkelbraunen, trüben Lösung werden nach Erkalten 10 ml Aceton unter kräftigem Rühren zugegeben. Das Produkt (**44**) fällt als dunkelbraunes Öl. Das Lösungsmittel wird vom Öl abdekantiert und das Öl noch mehrfach mit kleinen Portionen Aceton gewaschen. Zum Schluss wird es im Ölpumpenvakuum getrocknet, wobei es teilweise kristallisiert. Das hygroskopische Produkt kann im Exsikkator über P_2O_5 unter Vakuum gelagert werden oder direkt in weiteren Synthesen verwendet werden.

Ausbeute: 0.27 g (0.71 mmol, 62 % d.T.)

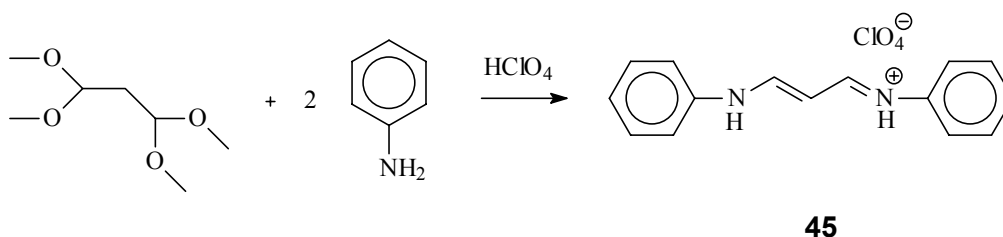
ES+, m/z: 380.3 (16 %), 338.1 (8 %), 299.4 (18 %), 298.3 (16 %), 271.4 (19 %), 224.2 (16 %), 198.2 (86 %), 185.2 (32 %), 157.3 (8 %), 97.0 (14 %), 73.2 (22 %), 69.3 (100 %)

ES-, m/z: 378.2 (72 %), 349.9 (22 %), 275.8 (26 %), 262.2 (100 %), 249.3 (50 %), 235.1 (53 %), 221.9 (16 %), 79.8 (8 %)

6.6.4 Synthese der spiro-Cyanine

6.6.4.1 Synthese der Hemicyanine

Synthese von 1-Anilino-3-phenyliminiumpropen(I) Perchlorat (**45**)

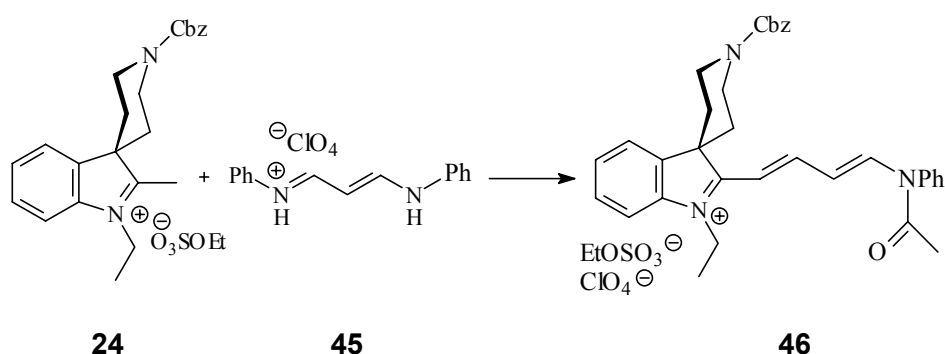


In 5 ml Ethanol werden 11 g (0.05 mol) 1,1,3,3-Tetramethoxypropan und 9.3 g (1.0 mol) Anilin gelöst. Unter Rühren werden 10 ml Perchlorsäure (60 %ig) zugegeben, wobei das Produkt augenblicklich ausfällt. Das gelbbraune Rohprodukt wird aus heißem Ethanol umkristallisiert. Man erhält das Produkt als gelbes Pulver.

Ausbeute: 12.5 g (38.6 mmol, 77.2 % d.T.)

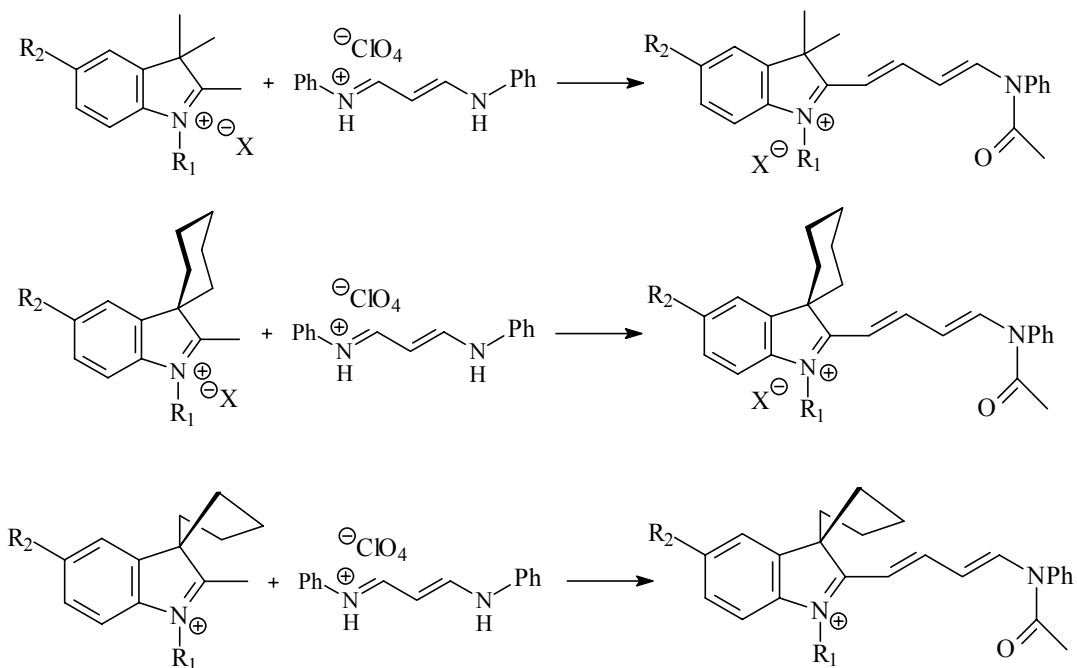
ES+-, m/z: 314 (30 %), 223 (100 %)

1-Ethyl-2-(4-Acetanilino-1,3-butadienyl)-3-spiro-4'-(1'-benzyloxycarbonyl)-piperidin-3H-indolium Ethylsulfat / Perchlorat (**46**)



1-Anilino-3-phenyliminiumpropen(I) Perchlorat (**45**) (0.421 g, 1.3 mmol) und Kaliumacetat (0.127 g, 1.3 mmol) werden in 2 ml Ethanol etwa fünf Minuten auf 40 °C erwärmt. Am Rotationsverdampfer wird bei vermindertem Druck das Ethanol vollständig abdestilliert, der Rückstand in 3 ml Diethylether aufgenommen und filtriert. Mit Ethylacetat wird die freie Base des 1-Anilino-3-phenyliminiumpropen(I) Perchlorats aus dem Filtrückstand herausgewaschen. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer im Vakuum abdestilliert und der Rückstand wird in 2 ml Eisessig und 2 ml Essigsäureanhydrid aufgenommen. Unter Schutzgasatmosphäre wird das Indol (**24**) (0.63 g, 1.3 mmol) in 2 ml Eisessig und 2 ml Essigsäureanhydrid gelöst. Die Mischung wird 40 min auf 80 °C erwärmt, wobei sie sich von braun zu dunkelgrün verfärbt. Nach abdestillieren der Lösungsmittel am Rotationsverdampfer erhält man das Rohprodukt des Hemicyanins (**46**) als ein schwarzgrünes Öl, das direkt für die weiteren Synthesen verwendet wird.

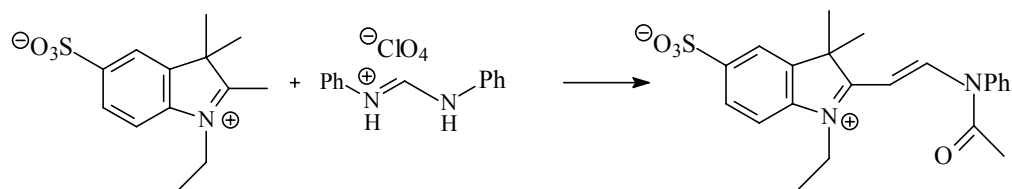
Folgende Hemicyanine wurden nach ebenfalls nach obiger Vorschrift synthetisiert:



R_1 = Methyl, Ethyl, Carboxypentyl, Butylacetyl, Butylsulfonyl R_2 = H, SO_3^-

X^- = Cl, Br, I, EtSO_4 , ClO_4

Synthese von 1-Ethyl-2-(2-Acetanilinoethen)-3-dimethyl-5-sulfo-3H-indolium Betain (**47**)

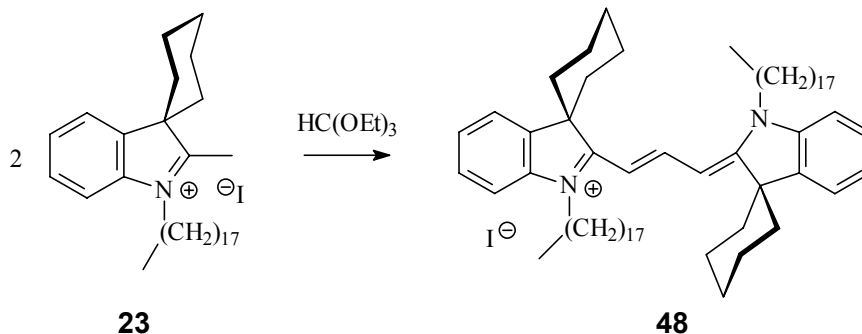


47

Das Hemicyanin (**47**) für die folgende Synthese von roten Farbstoffen wurde ebenfalls analog zu (**46**) synthetisiert.

6.6.4.2 Synthese symmetrischer *spiro*-Cyanine

Synthese von 1-Octadecyl-2-[3-(1,3-dihydro-1-octadecyl-3-spiro-cyclohexan-2H-indol-2-yliden)-propenyl]-3-spiro-cyclohexan-3H-indolium iodid (**48**)



Das quaternäre Indol (**23**) (4.06 g, 7 mmol) wird in 20 ml Pyridin gelöst und zum Sieden erhitzt. Mit einer Spritze werden im Verlauf von 1 h 2.32 ml (2.07 g, 14 mmol) Orthoameisensäurediethylester zugegeben. Die gelbliche Lösung färbt sich tief pink. Nach 3 h Erhitzen am Rückfluss wird die Lösung noch heiß in 10 ml NaI-Lösung (1.5 M) gegossen und während des Erhaltens kräftig gerührt. Der Farbstoff fällt als sehr feine Nadeln aus und wird abfiltriert. Das Rohprodukt wird aus Propanol umkristallisiert und nach Filtration mit wenig Diethylether gewaschen, bis der Pyridingeruch verschwindet. Man erhält 3.01 g (2.9 mmol, 82.7 % d. T.) Farbstoff.

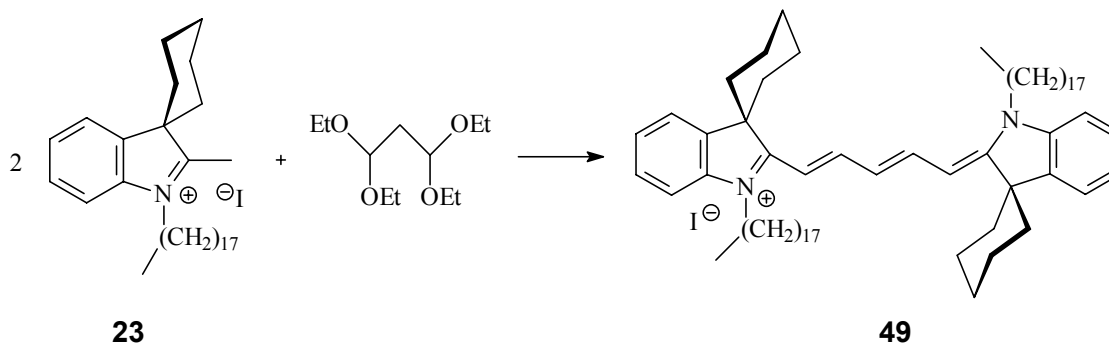
Ausbeute: 3.01 g (2.9 mmol, 82.7 % d.T.)

ES⁺-, m/z: 923 (100 %)

Absorption: λ_{abs} (MeOH) = 557 nm

Emission: λ_{em} (MeOH) = 574 nm

Synthese von 1-Octadecyl-2-[5-(1,3-dihydro-1-octadecyl-3-spirocyclohexan-2H-indol-2-yliden)-pentadien-1,3-yl]-3-spirocyclohexan-3Hindolium iodid (**49**)



7 mmol (4.06 g) des Indols werden in 20 ml Pyridin gelöst und auf 60 °C erwärmt. Wenn der Feststoff vollständig gelöst ist werden mit einer Spritze 3.4 ml (3.08 g, 14 mmol) 1,1,3,3-Tetraethoxypropan langsam zugegeben. Die Lösung färbt sich tiefblau. Es wird noch eine Stunde am Rückfluss erhitzt. Die heiße Lösung wird in 10 ml NaI-Lösung (1.5 M) gegossen,

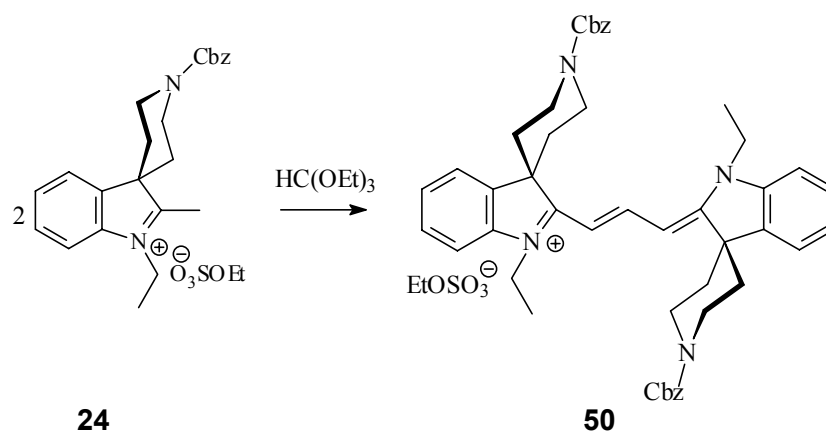
wobei das Produkt als schwarze, teerartige Masse ausfällt. Die Lösung wird abdekantiert und das Rohprodukt wird säulenchromatographisch gereinigt (Methanol/Ethylacetat 2:1, s.p. Kieselgel). Man erhält 4.16 g (3.9 mmol, 56.2 % d.T.) dunkelblaues Produkt.

Ausbeute: 4.16 g (3.9 mmol, 56.2 % d.T.)

Absorption: λ_{abs} (MeOH) = 655 nm

Emission: λ_{em} (MeOH) = 676 nm

Synthese von 1-Ethyl-2-{3-[1-ethyl-3-spiro-4'-(1'-benzyloxycarbonyl)-piperidin-2,3-dihydroindol-2-yliden]-propenyl}-3-spiro-4'-(1'-benzyloxycarbonyl)-piperidin-3H-indolium Ethylsulfat (**50**)



0.05 g (0.1 mmol) des Indols (**24**) werden in 1 ml Pyridin gelöst. Mit einer Mikroliterspritze werden 0.03 ml (0.03 g, 0.2 mmol) Orthochoameisensäuretriethylester zugegeben. Die Lösung wird für 8 h auf 120 °C erwärmt, wobei sie sich langsam pink färbt. Die Mischung wird nach Erkalten am Rotationsverdampfer eingeengt. Es folgt eine säulenchromatographische Aufreinigung des Rohproduktes (SP, Aceton/Dichlormethan 1:1). Man erhält des Farbstoffes (**50**) als dunkelrotes Pulver.

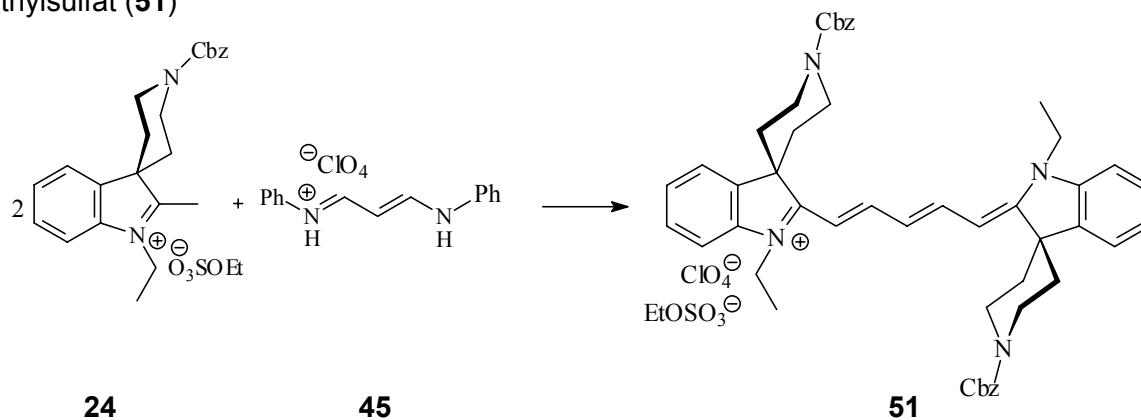
Ausbeute: 6.9 mg (8 μmol , 8 % d.T.)

ES+, m/z: 735.4 (25 %)

ES-, m/z: 124.8 (40 %)

Absorption: λ_{abs} (MeOH) = 562 nm

Synthese von 1-Ethyl-2-{5-[1-ethyl-3-spiro-4'-(1'-benzyloxycarbonyl)-piperidin-2,3-dihydro-indol-2-yliden]-pentadien-1,3-yl}-3-spiro-4'-(1'-benzyloxycarbonyl)-piperidin-3*H*-indolium Ethylsulfat (**51**)



0.1 g (0.2 mmol) des Indols (**24**) und 0.03 g (0.1 mmol) 1-Anilino-3-phenyliminiumpropen(I) Perchlorat (**45**) werden in 0.5 ml Pyridin und 0.5 ml Essigsäureanhydrid unter Schutzgasatmosphäre 45 min auf 100 °C erwärmt. Die grüne Lösung wird am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck zur Trockene eingeeengt. Der zurückbleibende schwarze Feststoff wird säulenchromatographisch gereinigt (SP, Aceton/Dichlormethan 1:1), wobei die erste blaue Fraktion gesammelt wird. Man erhält 0.1 g (0.15 mmol, 75 % d. Th.) des Cyaninfarbstoffes.

Ausbeute: 0.1 g (0.15 mmol, 75 % d.T.)

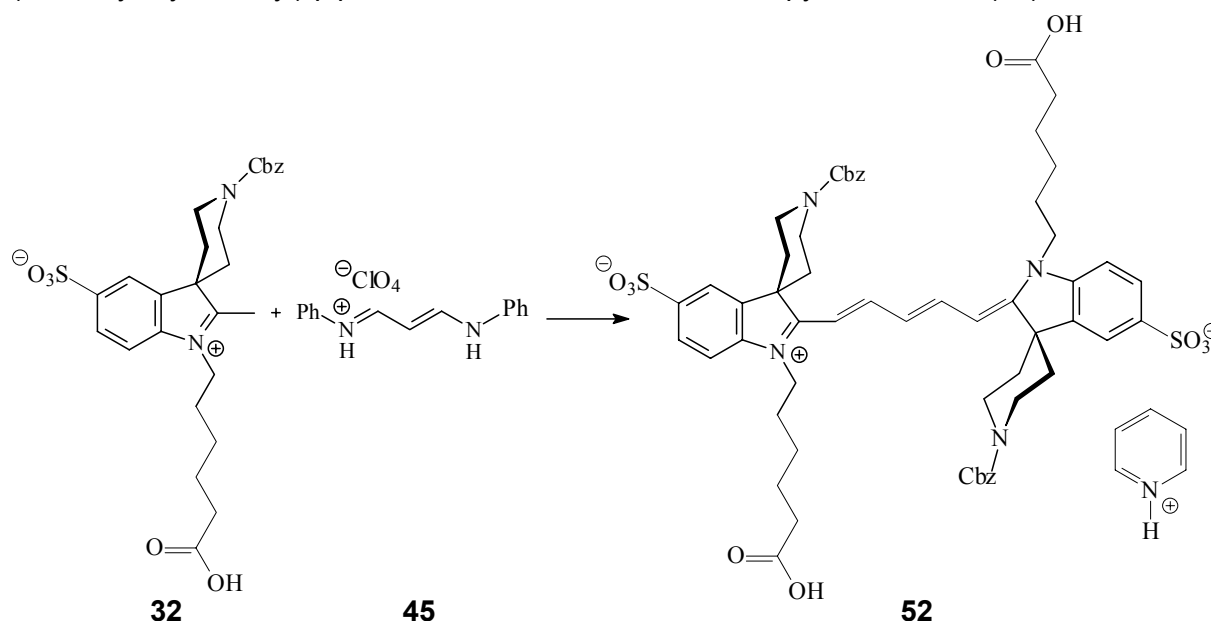
ES+, m/z: 761 (78 %), 373 (21 %), 322 (11 %), 289 (12 %), 262 (12 %), 256 (19 %), 198 (18 %), 172, (18 %), 91 (100 %)

ES-, m/z: 125 (17 %), 99 (100 %)

Absorption: λ_{abs} (EtOH) = 662 nm

Fluoreszenz: λ_{ex} (EtOH) = 682 nm

Synthese von 1-(5-Carboxypentyl)-2-{5-[1-(5-carboxypentyl)-3-spiro-4'-(1'-benzyloxycarbonyl)-piperidin-5-sulfo-2,3-dihydro-indol-2-yliden]-pentadien-1,3-yl}-3-spiro-4'-(1'-benzyloxycarbonyl)-piperidin-5-sulfo-3*H*-indolium betain pyridinium salz (**52**)



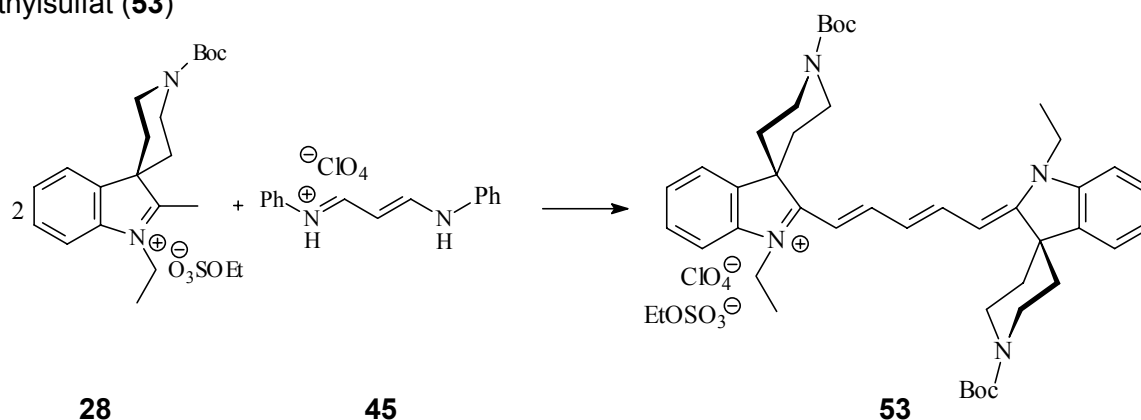
0.106 g (0.2 mmol) des quaternierten Indoles (**32**) und 0.130 g (0.4 mmol) 1,5-Diaza-1,5-diphenyl-1*H*-pentadienium Perchlorat (**45**) werden in 1 ml Pyridin und 1 ml Essigsäureanhydrid gelöst und 2 h auf 180 °C erwärmt. Die olivgrüne Reaktionsmischung wird am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck, zuletzt im Ölpumpenvakuum destilliert. Der Rückstand wird in sehr wenig wäßrigem Methanol (Methanol/Wasser = 1:2) aufgenommen und über RP18-Kieselgel gereinigt (RP, Methanol/Wasser = 1:2). Nach abdestillieren des Lösungsmittels und trocknen im Vakuum erhält man das Produkt (**52**) als dunkelblauen, rot fluoreszierenden Feststoff.

Ausbeute: g (0.13 mmol, 65 % d.T.)

Absorption: λ_{abs} (EtOH) = 663 nm

Fluoreszenz: λ_{ex} (EtOH) = 683 nm

Synthese von 1-Ethyl-2-{5-[1-ethyl-3-spiro-4'-(1'-tert.-butyloxycarbonyl)-piperidin-2,3-dihydro-indol-2-yliden]-pentadien-1,3-yl}-3-spiro-4'-(1'-tert.-butyloxycarbonyl)-piperidin-3*H*-indolium ethylsulfat (**53**)



Das Boc-geschützte Indol (**28**) (41.2 mg, 0.09 mmol) und 14.6 mg (0.045 mmol) des Kupplungsreagenzes (**45**) werden in 0.5 ml Pyridin und 0.5 ml Essigsäureanhydrid gelöst. Die Mischung wird für 2 h auf 80 °C erwärmt, wobei sie sich oliv färbt. Die Mischung wird am Rotationsverdampfer eingengt und das zurückbleibende Öl wird säulenchromatographisch gereinigt (SP, Dichlormethan/Aceton 1:1). Man erhält eine tiefblaue Produktfraktion (**53**). Diese wird am Rotationsverdampfer eingengt, es bleibt ein dunkelblauer Feststoff zurück (6.6 mg, 8.1 μ mol, 9 % d. T.).

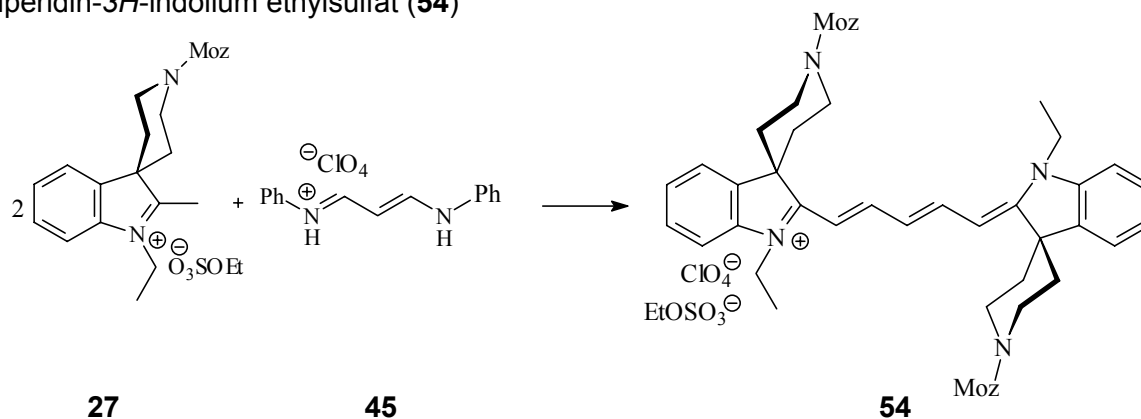
Ausbeute: 6.6 mg (8.1 μ mol, 9 % d.T.)

ES⁺, m/z: 693.7 (100 %)

Absorption: λ_{abs} (EtOH) = 662 nm

Fluoreszenz: λ_{ex} (EtOH) = 682 nm

Synthese von 1-Ethyl-2-{5-[1-ethyl-3-spiro-4'-(1'-(4-methoxybenzyl)-oxycarbonyl)-piperidin-2,3-dihydro-indol-2-yliden]-pentadien-1,3-yl}-3-spiro-4'-(1'-(4-methoxybenzyl)-oxycarbonyl)-piperidin-3*H*-indolium ethylsulfat (**54**)



18 mg (34.7 μ mol) des Moz-geschützten Indols (**27**) und 5.6 mg (17.4 μ mol) des Kupplungsreagenzes (**45**) werden in 0.5 ml Pyridin und 0.5 ml Essigsäureanhydrid gelöst.

Die Mischung wird 45 min auf 80 °C erwärmt und färbt sich dabei tiefblau. Nach abdestillieren des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (SP, Aceton/Dichlormethan/Methanol 1:1:10). Das Produkt wird als blauer Feststoff (6.9 mg, 7.3 μmol , 21 % d. T.) erhalten.

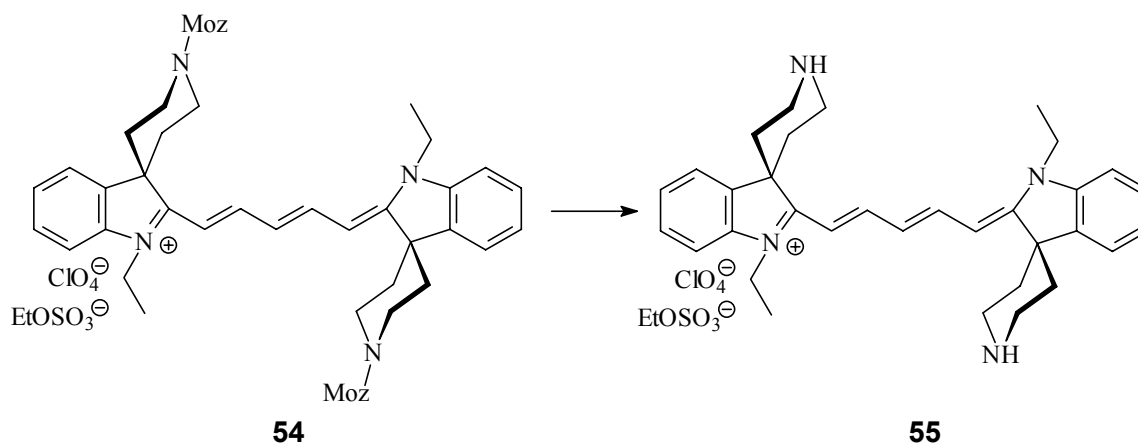
Ausbeute: 6.9 mg (7.3 μmol , 21 % d.T.)

ES+, m/z: 821.3 (66 %), 522 (27 %), 120.7 (100 %)

Absorption: λ_{abs} (EtOH) = 664 nm

Fluoreszenz: λ_{ex} (EtOH) = 683 nm

Synthese von 1-Ethyl-2-{5-[1-ethyl-3-spiro-4'-piperidin-2,3-dihydro-indol-2-yliden]-pentadien-1,3-yl}-3-spiro-4'-piperidin-3*H*-indolium ethylsulfat (**55**)

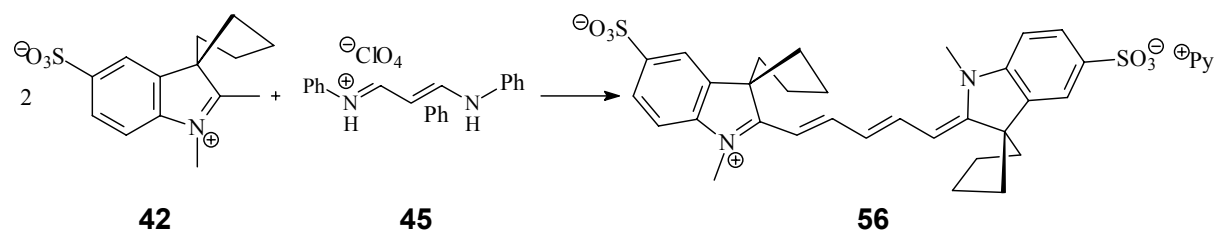


6.9 mg (7.3 μmol) des Moz-geschützten Farbstoffes (**54**) werden in 0.5 ml Dichlormethan gelöst. 0.05 ml Trifluoressigsäure werden mit einer Mikroliterspritze langsam zugegeben. Die Lösung wird 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Mit verdünnter Ammoniaklösung wird der pH auf 7 eingestellt und das Lösungsmittel dann am Rotationsverdampfer abdestilliert. Das Farbstoffrohprodukt (**55**) wird säulenchromatographisch gereinigt (SP, Aceton/Methanol/Dichlormethan 1:1:10). Man erhält das Produkt als blauen Feststoff.

Ausbeute: 3.6 mg (5.9 μmol , 81 % d.T.)

ES+, m/z: 493.1 (14 %), 267.0 (21 %), 265.0 (8 %), 238.7 (100 %), 223.7 (19 %), 196.6 (11 %), 185.6 (24 %), 183.7 (21 %), 171.6 (11 %)

Synthese von 1-Methyl-2-{5-[1-methyl-3-spiro-cyclopentan-5-sulfo-2,3-dihydro-indol-2-yliden]-pentadien-1,3-yl}-3-spiro-cyclopentan-5-sulfo-3*H*-indolium Pyridiniumsalz (**56**)



26.5 mg (94.9 μmol) des Pentylindols (**42**) werden in 1 ml Pyridin und 1 ml Essigsäureanhydrid gelöst. Das Kupplungsreagenz (**45**) (15.4 mg, 47.5 μmol) wird zugegeben und die Mischung wird 3 h auf 80 °C erwärmt. Die Reaktionsmischung färbt sich langsam oliv. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abdestilliert und das zurückbleibende Öl wird säulenchromatographisch gereinigt (RP, Methanol/Wasser 1:2). Man erhält das Produkt (**56**) als dunkelblauen Feststoff.

Ausbeute: 8.95 mg (13.3 μmol , 14 % d.T.)

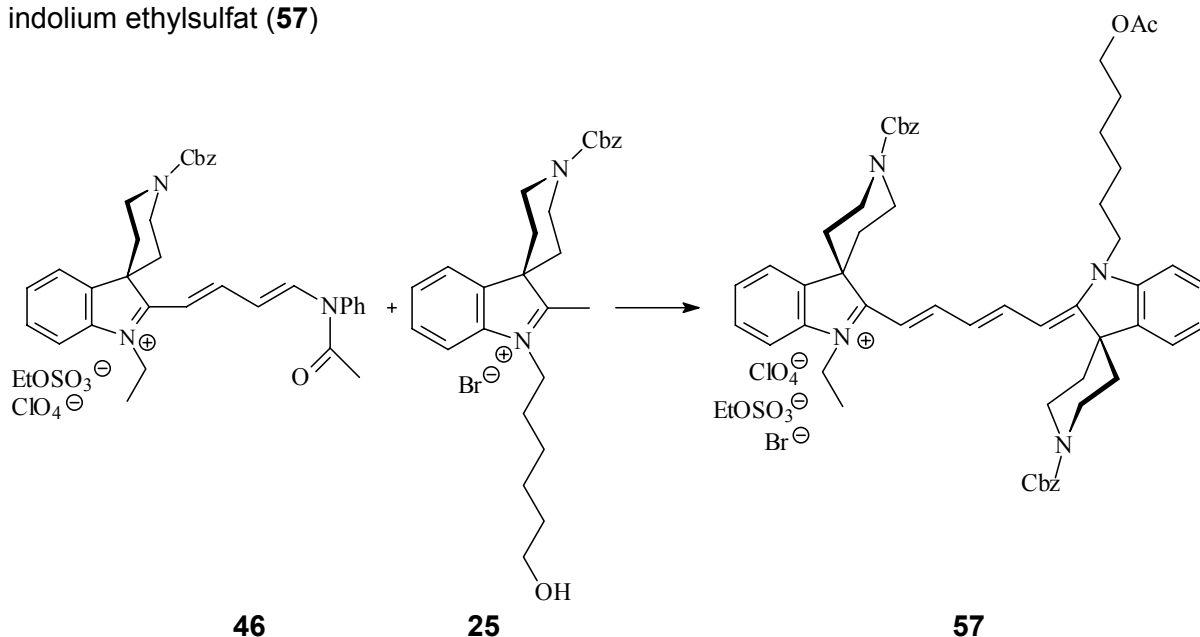
ES-, m/z : 593.2 (10 %)

Absorption: λ_{abs} (H₂O) = 651 nm

Fluoreszenz: λ_{ex} (H₂O) = 669 nm

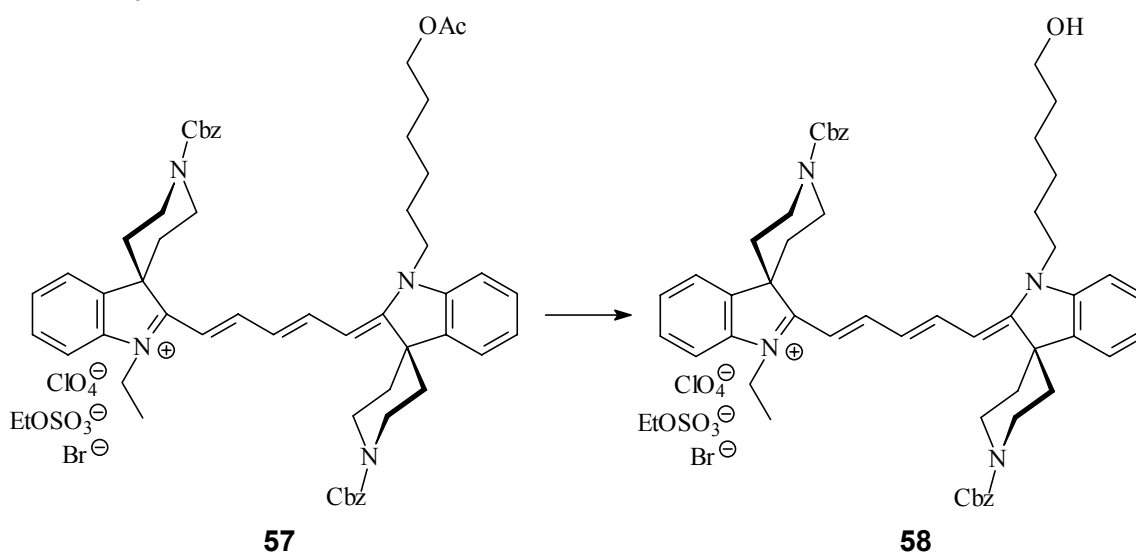
6.6.4.3 Synthese unsymmetrischer *spiro*-Cyanine

Synthese von 1-Ethyl-2-{3-[1-(6-acetoxyhexyl)-3-spiro-4'-(1'-benzyloxycarbonyl)-piperidin-2,3-dihydro-indol-2-yliden]-pentadien-1,3-yl}-3-spiro-4'-(1'-benzyloxycarbonyl)-piperidin-3*H*-indolium ethylsulfat (**57**)



Das Rohprodukt des Hemicyanins (**46**) (1.3 mmol) wird unter Schutzgasatmosphäre zu einer Lösung des Indols (**25**) (1.561 mmol, 0.68 g) in 10 ml Pyridin gegeben und 2 h auf 80 °C erwärmt. Die Lösung färbt sich sehr schnell tiefblau. Nach abdestillieren des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird das Rohprodukt des Cyaninfarbstoffes (**57**) als blau-schwarzer Feststoff erhalten, der ohne weitere Reinigung in der folgenden Verseifung eingesetzt wird.

Synthese von 1-Ethyl-2-{3-[1-(6-hydroxyhexyl)-3-spiro-4'-(1'-benzyloxycarbonyl)-piperidin-2,3-dihydro-indol-2-yliden]-pentadien-1,3-yl}-3-spiro-4'-(1'-benzyloxycarbonyl)-piperidin-3*H*-indolium ethylsulfat (**58**)

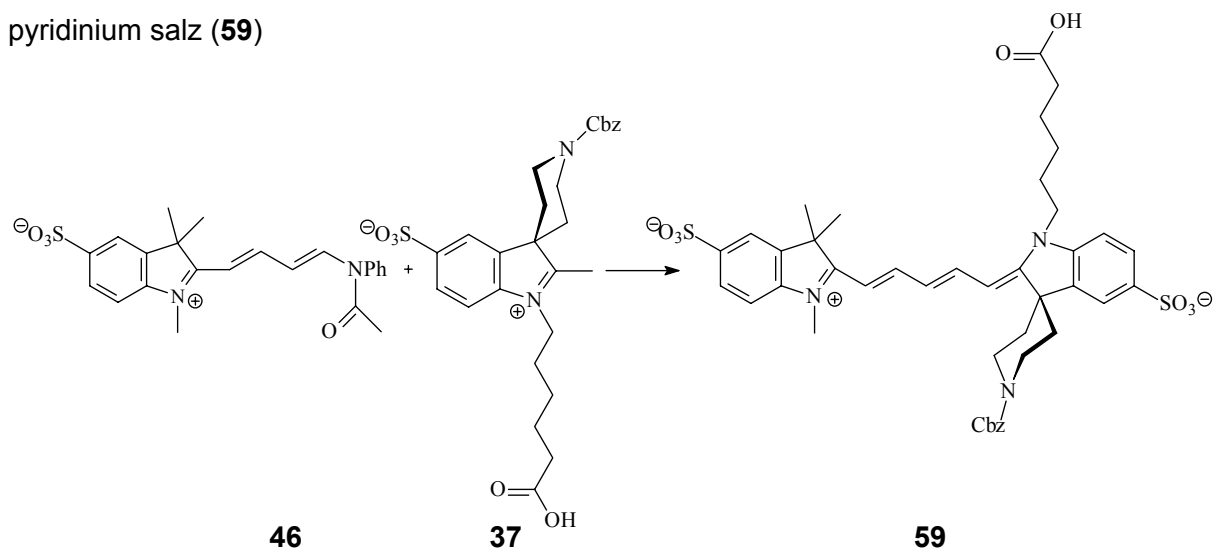


Das Rohprodukt des acylierten Cyaninfarbstoffes (**57**) wird in 200 ml Methanol gelöst und mit 10 g saurem Ionentauscher (Amberlyst 15, H⁺ - Form, Fluka) versetzt. Die Mischung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, wobei sie sich braun-grün färbt. Der nun blaue Ionentauscher wird abfiltriert und die methanolische Lösung wird verworfen. Der Ionentauscher wird in 200 ml eines Gemisches aus 80 % Wasser und 20 % Aceton gegeben und mit 10 g Natriumchlorid versetzt. Die Mischung wird erneut über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der nun wieder graue Ionentauscher wird abfiltriert und mit viel Aceton gewaschen. Die blaue Lösung wird am Rotationsverdampfer bei vermindertem Druck destilliert. Der zurückbleibende schwarz-blaue Feststoff wird säulenchromatographisch gereinigt (SP, Aceton/Methanol/Dichlormethan = 1:1:4). Man erhält den Farbstoff (**58**) als feines, blaues Pulver (ca. 0.16 mmol, Ausbeute: 12 % d. T.).

Ausbeute: 0.15 g (0.16 mmol, 12 % d.T.)

ES⁺, m/z: 875.4 (23 %), 90.7 (100 %)

Synthese von 1,3,3-Trimethyl-2-{5-[1-(5-Carboxypentyl)-3-spiro-4'-(1'-benzyloxycarbonyl)-piperidin-5-sulfo-2,3-dihydro-indol-2-yliden]-pentadien-1,3-yl}-5-sulfo-3*H*-indolium betain pyridinium salz (**59**)

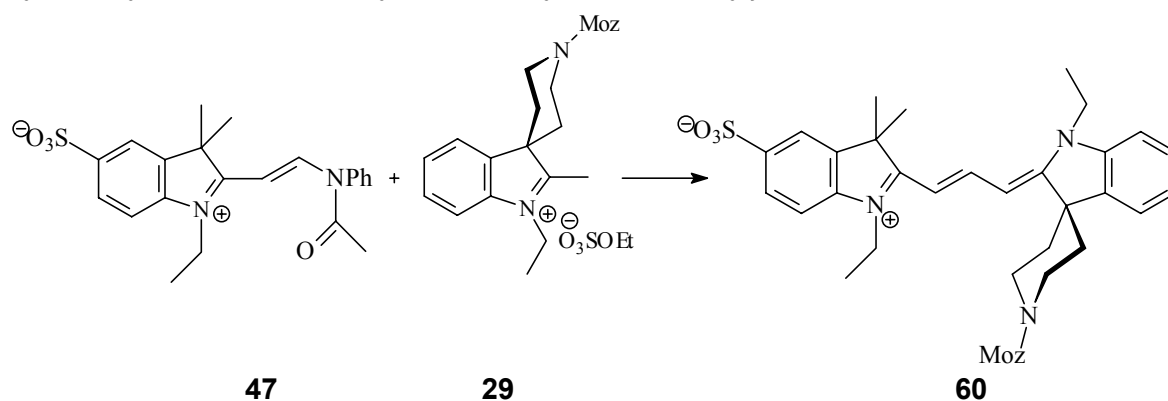


Das Indol (**37**) (32 mg, 61 μmol) und das Hemicyanin (**46**) (26 mg, 61 μmol) werden in 2 ml Pyridin gelöst und 1 h auf 80 °C erwärmt, wobei sich die Lösung tiefblau färbt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abdestilliert und das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (SP, Methanol/Dichlormethan 1:2). Das Produkt wird als blauer Feststoff erhalten.

Ausbeute: 12 mg (13.4 μmol , 25 % d.T.)

ES-, m/z: 816.5 (22 %)

Synthese von 1-Ethyl-3,3-dimethyl-2-{5-[1-ethyl-3-spiro-4'-(1'-(4-methoxybenzyl)oxycarbonyl)-piperidin-2,3-dihydro-indol-2-yliden]-propenyl} -5-sulfo-3*H*-indolium betain (**60**)



Das Hemicyanin (**47**) (20.6 mg, 50 μmol) und das Indol (**29**) (26.1 mg, 50 μmol) werden in 1 ml Pyridin gelöst und 2 h auf 80 °C erwärmt. Die Lösung färbt sich tief pink. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abdestilliert und das Farbstoffrohprodukt (**60**) säulenchromatographisch gereinigt (SP, Methanol/Aceton/Dichlormethan 1:1:5). Man erhält das Produkt als tiefroten Feststoff.

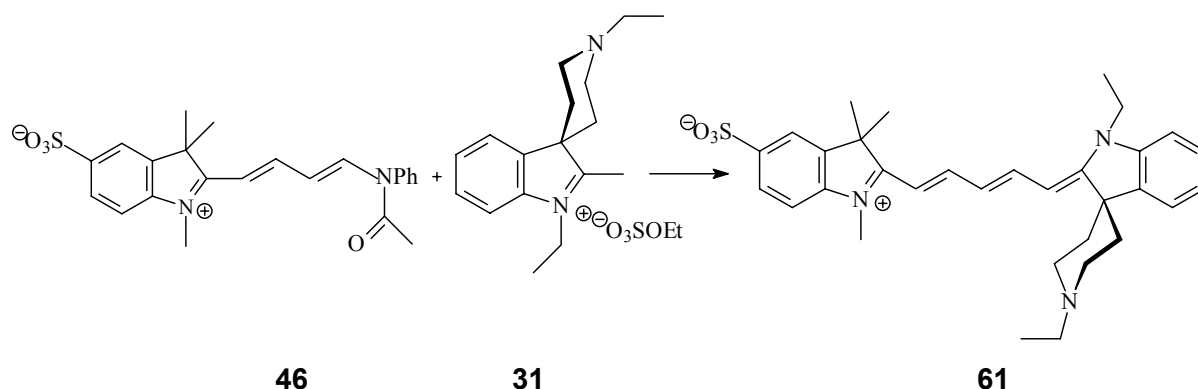
Ausbeute: 21.3 mg (31.8 μmol , 63.5 % d.T.)

ES⁺, m/z: 670 (39 %), 121 (100 %)

Absorption: λ_{abs} (EtOH) = 556 nm, λ_{abs} (PBS) = 549 nm

Fluoreszenz: λ_{ex} (EtOH) = 574 nm

Synthese von 1,3,3-Trimethyl-2-{5-[1-ethyl-3-spiro-4'-(1'ethyl)-piperidin-2.3-dihydro-indol-2-yliden]-pentadien-1,3-yl}-5-sulfo-3*H*-indolium betain (**61**)



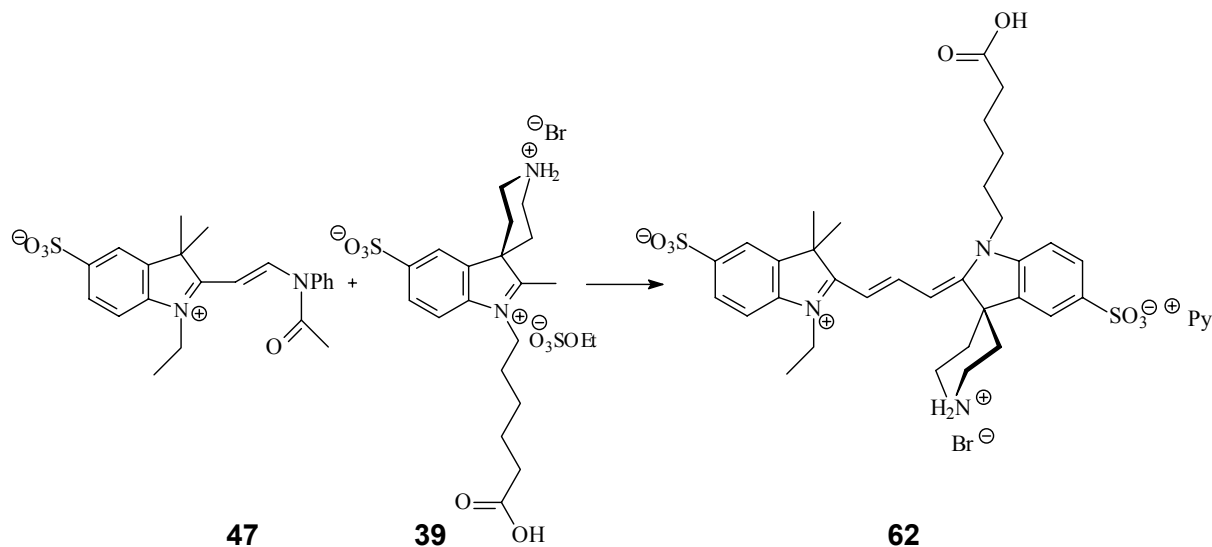
Das Indol (**31**) (30 mg, 117 μmol) und das Hemicyanin (**46**) (49 mg, 117 μmol) werden in 1.5 ml Pyridin gelöst und 2.5 h auf 80 °C erwärmt. Die Mischung färbt sich oliv. Nach abdestillieren des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird das zurückbleibende Öl säulenchromatographisch gereinigt (RP, Methanol/Wasser 1:2). Das Produkt wird als dunkelblauer Feststoff erhalten (14.7 mg, 26.9 μmol , 23 % d. T.).

Ausbeute: 14.7 mg (26.9 μmol , 23 % d.T.)

Absorption: λ_{abs} (PBS) = 643 nm

Fluoreszenz: λ_{ex} (PBS) = 661nm

Synthese von 1-Ethyl-3,3-dimethyl-2-{5-[1-(5-carboxypentyl-3-spiro-4'-piperidinium bromid-5-sulfo-2,3-dihydro-indol-2-yliden]-propenyl} -5-sulfo-3*H*-indolium betain pyridinium salz (**62**)



Das Indol (**47**) (24 mg, 50 μmol) und das Hemicyanin (**39**) (20 mg, 50 μmol) werden in 2.2 ml Pyridin gelöst und 1 h auf 80 °C erwärmt. Die pinkfarbene Lösung wird am Rotationsverdampfer eingengt. Das Öl wird in 0.1 M HCl aufgenommen und sofort auf eine RP18-Kieselgel-Säule gegeben. Mit viel Wasser wird die wässrige HCl-Lösung abgespült. Das Produkt wird mit Methanol eluiert. Das Eluat wird eingengt und säulenchromatographisch gereinigt (RP, Methanol/Wasser 1:4).

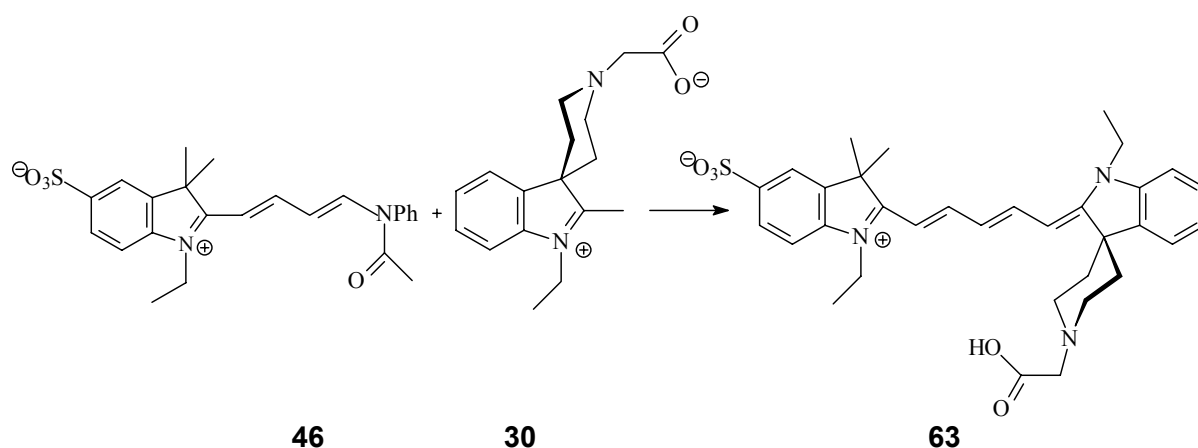
Ausbeute: 4.5 mg (6 μmol , 12 % d.T.)

ES-, m/z: 670.3 (65 %), 435.3 (100 %), 334.7 (71 %), 294.2 (71 %), 265.2 (49 %), 217.2 (41 %), 167.1 (22 %)

Absorption: λ_{abs} (PBS) = 552 nm

Fluoreszenz: λ_{ex} (PBS) = 572 nm

Synthese von 1-Ethyl-3,3-dimethyl-2-{5-[1-ethyl-3-spiro-4'-(1'-carboxymethyl)-piperidin-2,3-dihydro-indol-2-yliden]-pentadien-1,3-yl}-5-sulfo-3*H*-indolium betain pyridinium salz (**63**)



Das Indol (**30**) (23 mg, 80 μmol) und das Hemicyanin (**46**) (39 mg, 88 μmol) werden in 2 ml Pyridin gelöst und bei Raumtemperatur 1 h gerührt, wobei sich die Mischung sofort tief grün färbt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abdestilliert und das zurückbleibende Öl wird säulenchromatographisch gereinigt (RP, Methanol/Wasser Gradient). Man erhält 8.84 mg (15 μmol , 19 % d. T.) des Produktes als dunkelblauen Feststoff.

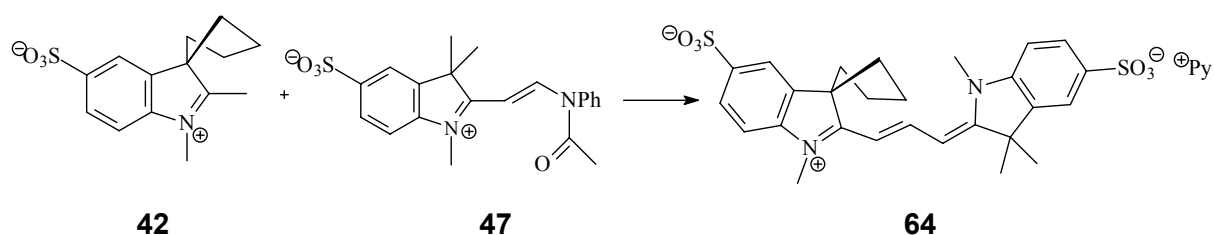
Ausbeute: 8.84 mg (15 μmol , 19 % d.T.)

ES+, m/z: 612.3 (44 %), 590.3 (37 %), 532.3 (100 %), 419.2 (29 %), 413.3 (31 %), 397.2 (29 %)

Absorption: λ_{abs} (PBS) = 647 nm

Fluoreszenz: λ_{em} (PBS) = 666 nm

Synthese von 1-Methyl-2-[3-(1,3,3-trimethyl-5-sulfo-2,3-dihydro-indol-2-yliden)-propenyl]-3-spiro-cyclopentan-5-sulfo-3*H*-indolium betain pyridinium salz (**64**)



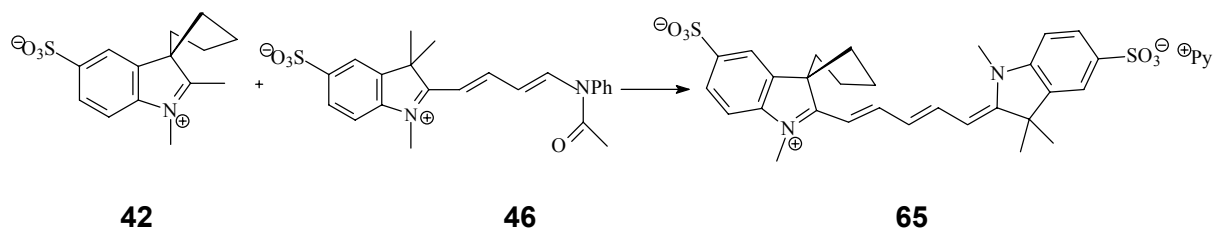
28.5 mg (102 μmol) des Indols (**42**) und 42.0 mg (102 μmol) des Hemicyanins (**47**) werden in 2 ml Pyridin gelöst und 2 h auf 80 °C erwärmt. Die Mischung färbt sich sofort tief pink. Nach abdestillieren des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (RP, Methanol/Wasser 1:2). Das Produkt wird als dunkelroter Feststoff erhalten (39.9 mg, 64.3 μmol , 63 % d. T.)

Ausbeute: 39.9 mg (64.3 μmol , 63 % d.T.)

ES-, m/z: 541.2 (100 %)

Absorption: λ_{abs} (H₂O) = 547 nm

Synthese von 1-Methyl-2-[5-(1,3,3-trimethyl-5-sulfo-2,3-dihydro-indol-2-yliden)-pentadien-1,3-yl]-3-spiro-cyclopentan-5-sulfo-3*H*-indolium betain pyridinium salz (**65**)



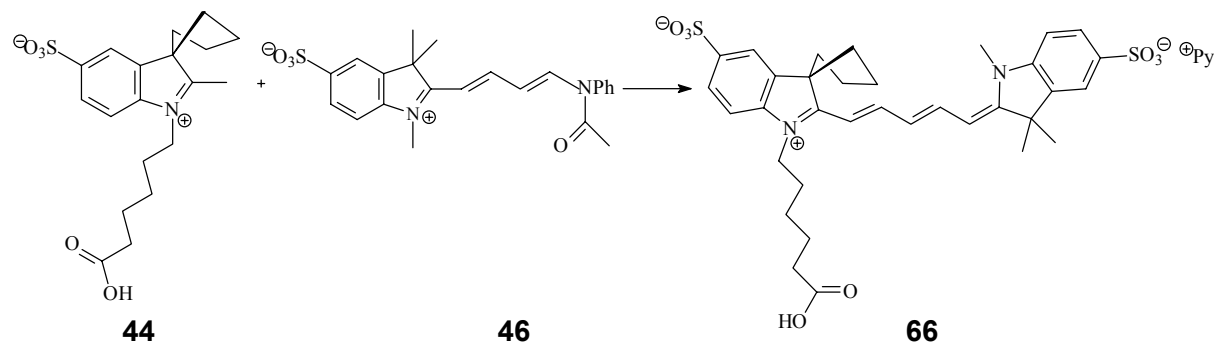
22 mg (78.8 μmol) des Indols (**42**) und 33.5 mg (78.8 μmol) des Hemicyanins (**46**) werden in 2 ml Pyridin gelöst und 2 h auf 80 °C erwärmt. Die Mischung färbt sich sofort tief blau. Nach abdestillieren des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird das Rohprodukt säulenchromatographisch gereinigt (RP, Methanol/Wasser 1:2). Das Produkt wird als dunkelblauer Feststoff erhalten (36.7 mg, 56.7 μmol , 72 % d. T.)

Ausbeute: 36.7 mg (56.7 μmol , 72 % d.T.)

ES-, m/z: 567.2 (100 %)

Absorption: λ_{abs} (H₂O) = 647 nm

Synthese von 1-(5-Carboxypentyl)-2-[5-(1,3,3-trimethyl-5-sulfo-2,3-dihydro-indol-2-yliden)-pentadien-1,3-yl]-3-spiro-cyclopentan-5-sulfo-3*H*-indolium betain pyridinium salz (**66**)



Das Indol (**44**) (0.285 g, 0.75 mmol) wird in 9 ml Pyridin gelöst und 0.297 g (0.7 mmol) des Hemicyanins (**46**) werden zugegeben. Die braune Lösung wird 3 h auf 80 °C erwärmt und färbt sich dabei dunkelviolett. Nach abdestillieren des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird das zurückbleibende Öl säulenchromatographisch gereinigt (RP, Methanol/Wasser 1:4). Das Produkt wird als blauer Feststoff erhalten (Ausbeute: 0.26 g, 0.35 mmol, 47 % d. T.).

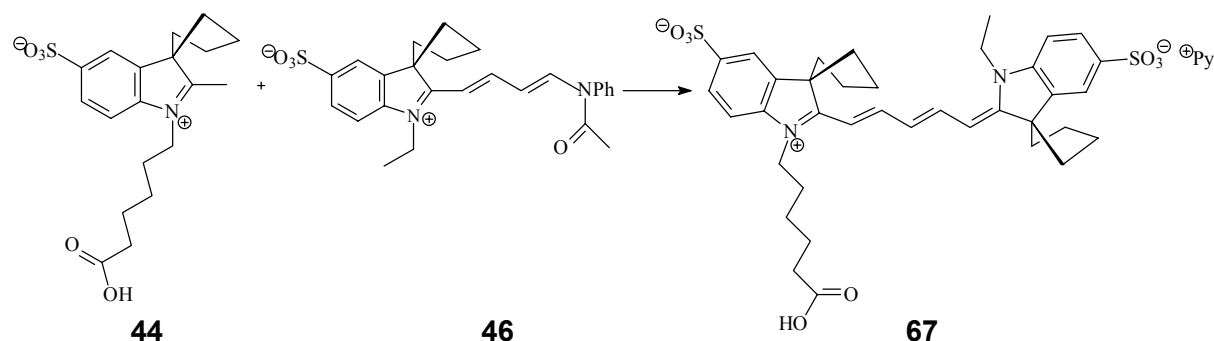
Ausbeute: 0.26 g (0.35 mmol, 47 % d.T.)

ES-, m/z: 667.5 (14 %), 492.5 (14 %), 333.3 (24 %), 268.3 (38 %), 97.1 (100 %), 80.1 (54 %)

Absorption: $\lambda_{\text{abs}}(\text{H}_2\text{O}) = 651\text{nm}$

Fluoreszenz: $\lambda_{\text{ex}}(\text{H}_2\text{O}) = 669\text{nm}$

Synthese von 1-(5-Carboxypentyl)-2-[5-(1-ethyl-3-spiro-cyclopentan-5-sulfo-2,3-dihydro-indol-2-yliden)-pentadien-1,3-yl]-3-spiro-cyclopentan-5-sulfo-3*H*-indolium betain pyridinium salz (**67**)



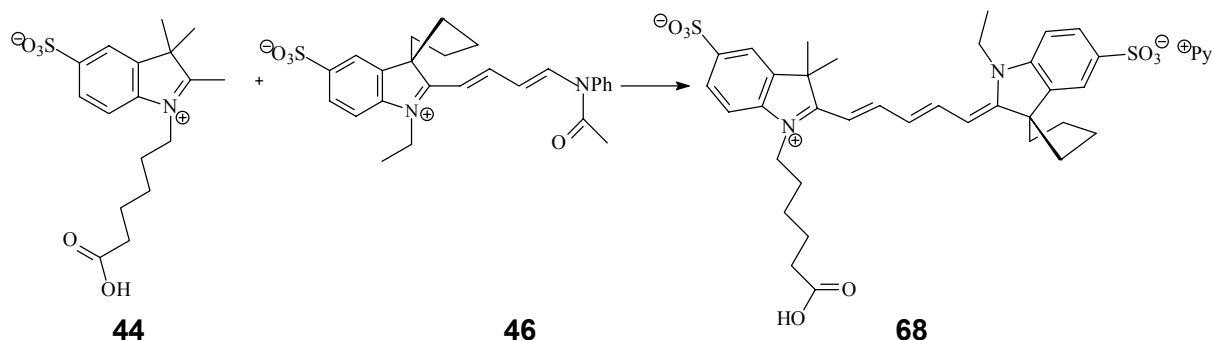
Das Indol (**44**) (0.417 g, 1.1 mmol) wird in 8 ml Pyridin vorgelegt. 0.465 g (1.0 mmol) Hemicyanin (**46**) werden zugegeben und die Reaktionsmischung wird 2 h auf 80 °C erwärmt. Die tiefviolette Lösung wird am Rotationsverdampfer eingengt und säulenchromatographisch gereinigt (RP, Methanol/Wasser 1:2). Man erhält 0.13 g (0.17 mmol, 17 % d. T.) des dunkelblauen Produktes.

Ausbeute: 0.13 g (0.17 mmol, 17 % d.T.)

Absorption: λ_{abs} (H₂O) = 653 nm

Fluoreszenz: λ_{ex} (H₂O) = 674 nm

Synthese von 1-(5-Carboxypentyl)-3,3-dimethyl-2-[5-(3-(4-acetoxybutyl)-2,3-dihydro-indol-2-yliden)-pentadien-1,3-yl]-5-sulfo-3*H*-indolium betain pyridinium salz (**68**)



Das Indol (**44**) (0.139 g, 0.3 mmol) wird in Pyridin gelöst und das Hemicyanin (**46**) (0.151 g, 0.33 mmol) wird zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 2 h auf 80 °C erwärmt, am Rotationsverdampfer eingeengt und säulenchromatographisch gereinigt (RP, Methanol/Wasser 1:2). Das Produkt wird als blauer Feststoff erhalten.

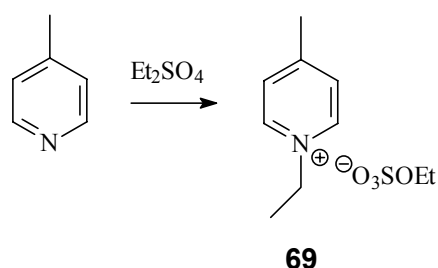
Ausbeute: 47.9 mg (63 μ mol, 21 % d.T.)

Absorption: λ_{abs} (H₂O) = 651 nm

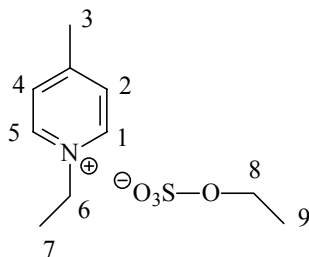
Fluoreszenz: λ_{ex} (H₂O) = 668 nm

6.6.5 Synthese von Farbstoffen mit nicht indolischen Kopfgruppen

Synthese von 1-Ethyl-4-methylpyridinium Ethylsulfat (**69**)



4.87 ml (4.66 g, 0.05 mol) γ -Picolin und 6.55 ml (7.71 g, 0.05 mol) Diethylsulfat werden unter Eiskühlung zusammen gegeben. Die Lösung färbt sich dabei sofort gelb und ein Öl scheidet sich ab. Die Mischung wird noch 30 min bei 0 °C und dann 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt (**69**) wird in hoher Reinheit als gelbliches Öl erhalten. Weitere Reinigungsschritte sind nicht nötig.



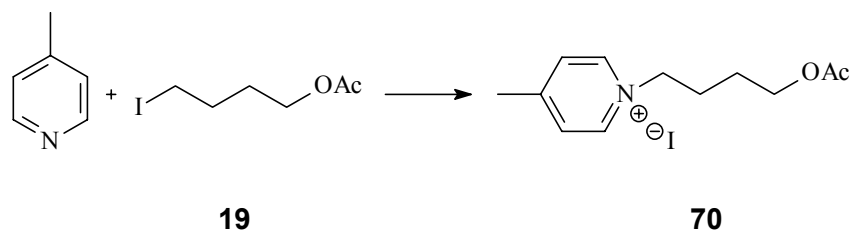
Ausbeute: 12.11 g (49 mmol, 97.9 % d.T.)

¹H-NMR (300 MHz), δ (ppm): 1.35 (3H, t, $^3J(7,6) = 7.0$ Hz, 7-H), 1.80 (3H, t, $^3J(9,8) = 7.0$ Hz, 9-H), 2.75 (3H, s, 3-H), 4.35 (2H, d, $^3J(6,7) = 7.0$ Hz, 6-H), 4.85 (2H, d, $^3J(8,9) = 7.0$ Hz, 8-H), 8.0 (2H, d, $^3J(2,1) = 8.0$ Hz, 2-H, 4-H), 9.25 (2H, d, $^3J(1,2) = 8.0$ Hz, 1-H, 5-H)

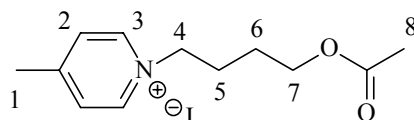
ES-, m/z: 125.0 (100 %)

ES+, m/z: 122.0 (100 %), 102.1 (38 %)

Synthese von 1-(4-Acetoxybutyl)-4-methylpyridinium Iodid (**70**)



980 μ l (0.93 g, 10 mmol) γ -Picolin und 2.42 g (10 mmol) 4-Iodbutylacetat (**19**) werden zusammen 5 h auf 110 °C erwärmt. Das ölige Produkt wird nach Erkalten in wenig Dichlormethan gelöst und mit 20 ml Diethylether gerührt, bis das Produkt kristallisiert. Der Feststoff (**70**) wird abfiltriert, mit Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet.

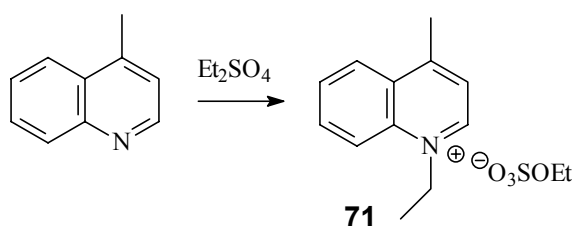


Ausbeute: 2.08 g (6.2 mmol, 62 % d.T.)

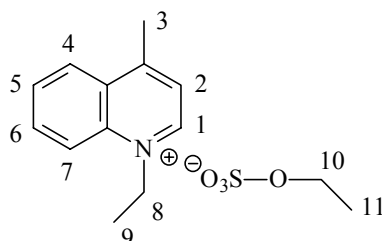
¹H-NMR (300 MHz), δ (ppm): 1.6 (2H, quin, $^3J(4,5) = 7$ Hz, $^3J(5,6) = 7$ Hz, 5-H), 1.85 (3H, s, 8-H), 1.95 (2H, quin, $^3J(6,5) = 7$ Hz, $^3J(6,7) = 7$ Hz, 6-H), 2.5 (3H, s, 1-H), 3.9 (2H, t, $^3J(4,5) = 7.2$ Hz, 4-H), 4.75 (2H, t, $^3J(7,6) = 7.2$ Hz, 7-H), 7.75 (2H, d, $^3J(2,3) = 6.3$ Hz, 2-H), 9.15 (2H, d, $^3J(3,2) = 6.3$ Hz, 3-H)

ES+, m/z: 208.1 (100 %)

Synthese von 1-Ethyl-4-methylchinolinium Ethylsulfat (**71**)



4.28 ml (4.64 g, 32.4 mmol) Lepidin und 4.24 ml (4.99 g, 32.4 mmol) Diethylsulfat werden zusammen gegeben und 1.5 h auf 110 °C erwärmt, wobei die ölige Mischung sich rotbraun färbt. Das Rohprodukt wird in sehr wenig Dichlormethan gelöst und mit Diethylether unter heftigem Rühren gefällt. Man erhält nach Abfiltrieren des Ethers das Produkt (**71**) als hellrosa Feststoff, der im Ölpumpenvakuum getrocknet wird.



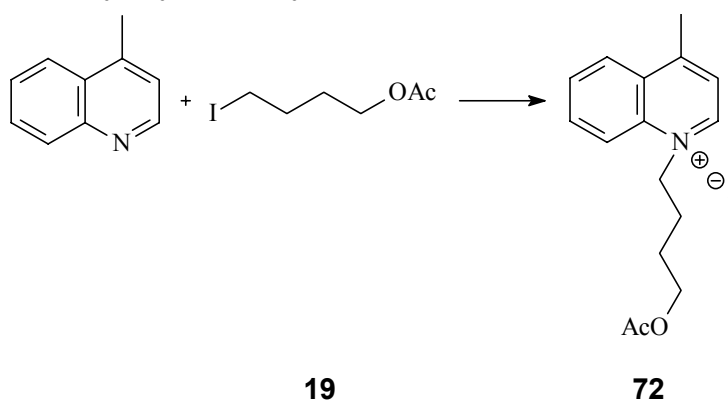
Ausbeute: 9.52 g (32 mmol, 98.9 % d.T.)

¹H-NMR (300 MHz), δ (ppm): 1.2 (3H, t, $^3J(9,8) = 7.1$ Hz, 9-H), 1.7 Hz (3H, t, $^3J(11,10) = 7.1$ Hz, 11-H), 2.95 (3H, s, 3-H), 4.05 (2H, q, $^3J(9,8) = 7.4$ Hz, 9-H), 5.15 (2H, q, $^3J(10,11) = 7.4$ Hz, 10-H), (7.9 82H, m, 2-H, 5-H), 8.2 (1H, dt, $^3J(6,5) = 7.9$ Hz, $^3J(6,7) = 7.9$ Hz, $^4J(6,4) = 1.0$ Hz, 6-H), 8.35 (1H, dd, $^3J(4,5) = 7.9$ Hz, $^4J(4,6) = 1.0$ Hz, 4-H), 8.45 (1H, d, $^3J(7,6) = 7.9$ Hz, 7-H), 9.65 (1H, d, $^3J(1,2) = 5.9$ Hz, 1-H)

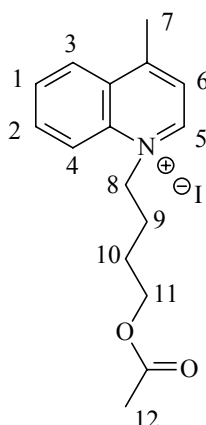
ES+, m/z: 172.1 (100 %), 102.0 (24 %)

ES-, m/z: 125.0 (100 %)

Synthese von 1-(4-Acetoxybutyl)-4-methyl-quinolinium Iodid (**72**)



2.42 g (10 mmol) 4-Iodbutylacetat (**19**) werden in 1.320 μ l (1.43 g, 10 mmol) Lepidin 5 h auf 110 °C erwärmt. Nach Erkalten wird das ölige Produkt in wenig Dichlormethan aufgenommen und bis zur Kristallisation mit 20 ml Diethylether gerührt. Der Feststoff (**72**) wird abfiltriert, mit Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet.

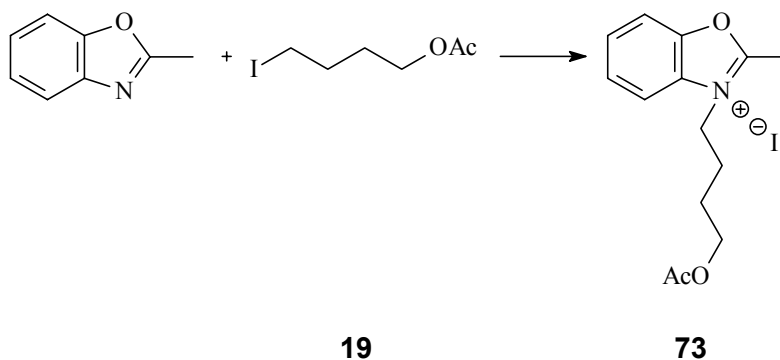


Ausbeute: 2.74 g (7.1 mmol, 71 % d.T.)

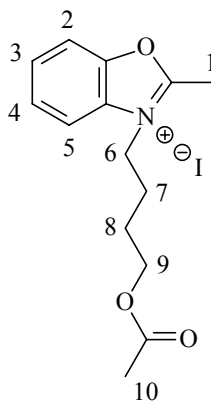
¹H-NMR (300 MHz), δ (ppm): 1.85 (2H, quin, $^3J(9,8) = 5.3$ Hz, $^3J(9,10) = 5.3$ Hz, 9-H), 1.95 (3H, s, 7-H), 2.15 (2H, quin, $^3J(10,9) = 5.3$ Hz, $^3J(10,11) = 5.3$ Hz, 10-H), 3.05 (3H, s, 12-H), 4.05 (2H, t, $^3J(8,9) = 5.9$ Hz, 8-H), 5.3 (2H, t, $^3J(11,10) = 7.6$ Hz, 11-H), 7.95 (2H, m, 5-H, 1-H), 8.2 (1H, t, $^3J(2,1) = 6.8$ Hz), $^3J(2,4) = 6.8$ Hz, 2-H), 8.35 (1H, d, $^3J(3,1) = 7.6$ Hz, 3-H), 8.5 (1H, d, $^3J(4,2) = 7.6$ Hz, 4-H), 10.05 (1H, d, $^3J(6,5) = 6.1$ Hz, 6-H)

ES+, m/z: 258.2 (100 %)

Synthese von 3-(4-Acetoxybutyl)-2-methyl-benzoxazolium Iodid (**73**)



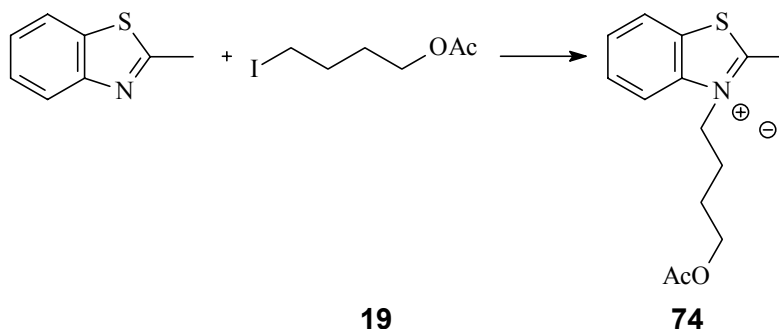
2-Methylbenzoxazol (1.33 g, 1.19 ml, 10 mmol) und 4-Iodbutylacetat (**19**) (2.42 g, 10 mmol) werden 4 h auf 120 °C und 2 h auf 130 °C erhitzt. Es bildet sich ein hochviskoses Öl, das durch Rühren mit Ethylacetat zur Kristallisation gebracht wird. Der Feststoff (**73**) wird abfiltriert, mit Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet.



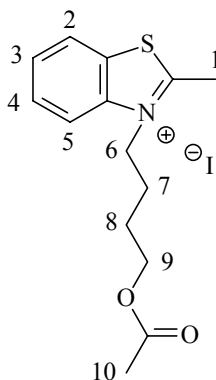
Ausbeute: 2.17 g (5.8 mmol, 58 % d.T.)

¹H-NMR (300 MHz), δ (ppm): 1.85 (2H, quin, $^3J(7,6) = 6.3$ Hz, $^3J(7,8) = 6.3$ Hz, 7-H), 2.05 (2H, quin, $^3J(8,7) = 7.3$ Hz, $^3J(8,9) = 7.3$ Hz, 8-H), 2.10 (3H, s, 1-H), 3.40 (3H, s, 10-H), 4.05 (2H, t, $^3J(6,7) = 5.7$ Hz, 6-H), 4.80 (2H, t, $^3J(9,8) = 6.9$ Hz, 9-H), 7.65 (2H, m, 3-H, 4-H), 7.75 (1H, dd, $^3J(5,4) = 5.3$ Hz, $^4J(5,3) = 1.2$ Hz, 5-H), 8.00 (1H, dd, $^3J(2,3) = 5.3$ Hz, $^4J(5,3) = 1.8$ Hz, 2-H)

ES+, m/z: 248.1 (100 %)

Synthese von 3-(4-Acetoxybutyl)-2-methyl-benzthiazolium Iodid (**74**)

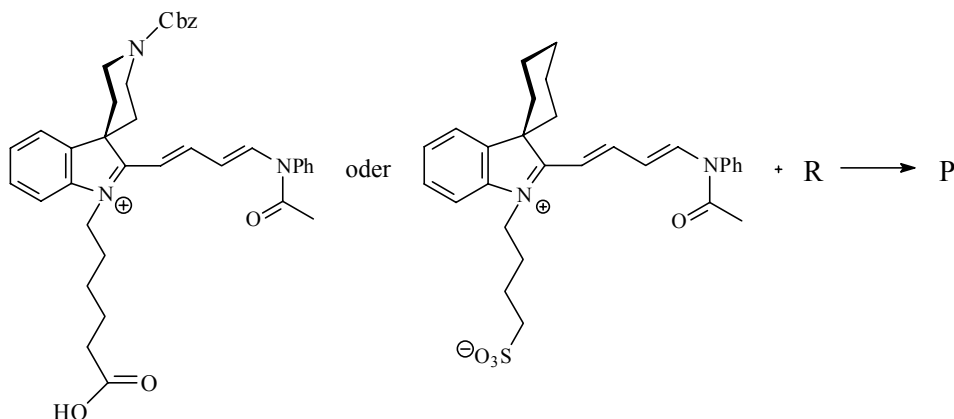
2-Methylbenzthiazol (1.49 g, 1.27 ml, 10 mmol) und 4-Iodbutylacetat (**19**) (2.42 g, 10 mmol) werden 4 h auf 120 °C erwärmt. Es bildet sich ein hochviskoses Öl, das durch Rühren mit Diethylether zur Kristallisation gebracht wird. Der Feststoff (**74**) wird abfiltriert und im Vakuum getrocknet.



Ausbeute: 3.01 g (7.7 mmol, 77 % d.T.)

¹H-NMR (300 MHz), δ (ppm): 1.85 (2H, quin, $^3J(7,6) = 5.4$ Hz, $^3J(7,8) = 5.4$ Hz, 7-H), 2.00 (2H, quin, $^3J(8,7) = 5.8$ Hz, $^3J(8,9) = 5.8$ Hz, 8-H), 2.10 (3H, s, 1-H), 3.45 (3H, s, 10-H), 4.05 (H, t, $^3J(6,7) = 6.6$ Hz, 6-H), 4.90 (2H, t, $^3J(9,8) = 7.8$ Hz, 9-H), 7.65 (1H, t, $^3J(4,3) = 7.4$ Hz, $^3J(4,5) = 7.4$ Hz, 4-H), 7.75 (1H, t, $^3J(3,4) = 7.4$ Hz, $^3J(3,2) = 7.4$ Hz, 3-H), 8.10 (1H, d, $^3J(5,4) = 7.8$ Hz, 5-H), 8.35 (1H, d, $^3J(2,3) = 7.4$ Hz, 2-H)

ES+, m/z: 264.1 (100 %)

Synthese der verschiedenen Farbstoffe (**75 – 82**)

0.2 mmol des jeweiligen Hemicyanins und 0.2 mmol der gewünschten Kopfgruppe (R) werden in 1 ml Ethanol vorgelegt und 29.3 μl Triethylamin werden mit Hilfe einer

Mikroliterspritze zugegeben. Die Reaktionsmischung wird eine Stunde am Rückfluß erhitzt. Nach Erkalten werden 5 ml Diethylether zugesetzt und die Mischung wird über Nacht bei 4 °C stehen gelassen. Die Produkte (P) scheiden sich sämtlich als hochviskose Öle ab, die durch abdekantieren von der flüssigen Phase befreit werden. Die Aufreinigung kleiner Proben der Produkte erfolgt durch präparative Dünnschichtchromatographie (Acetonitril/Wasser = 1:1, RP). Umseitig gezeigte Farbstoffe wurden auf diese Art synthetisiert.

Die Produkte wurden sämtlich mittels ESI untersucht.

(75): **ES+**, m/z: 641.1 (100 %), 619.0 (14 %), 413 (48 %), 326 (56 %), 301 (82 %), 272 (48 %)

(76): **ES+**, m/z: 635 (100 %)

(77): **ES+**, m/z: 685 (100 %)

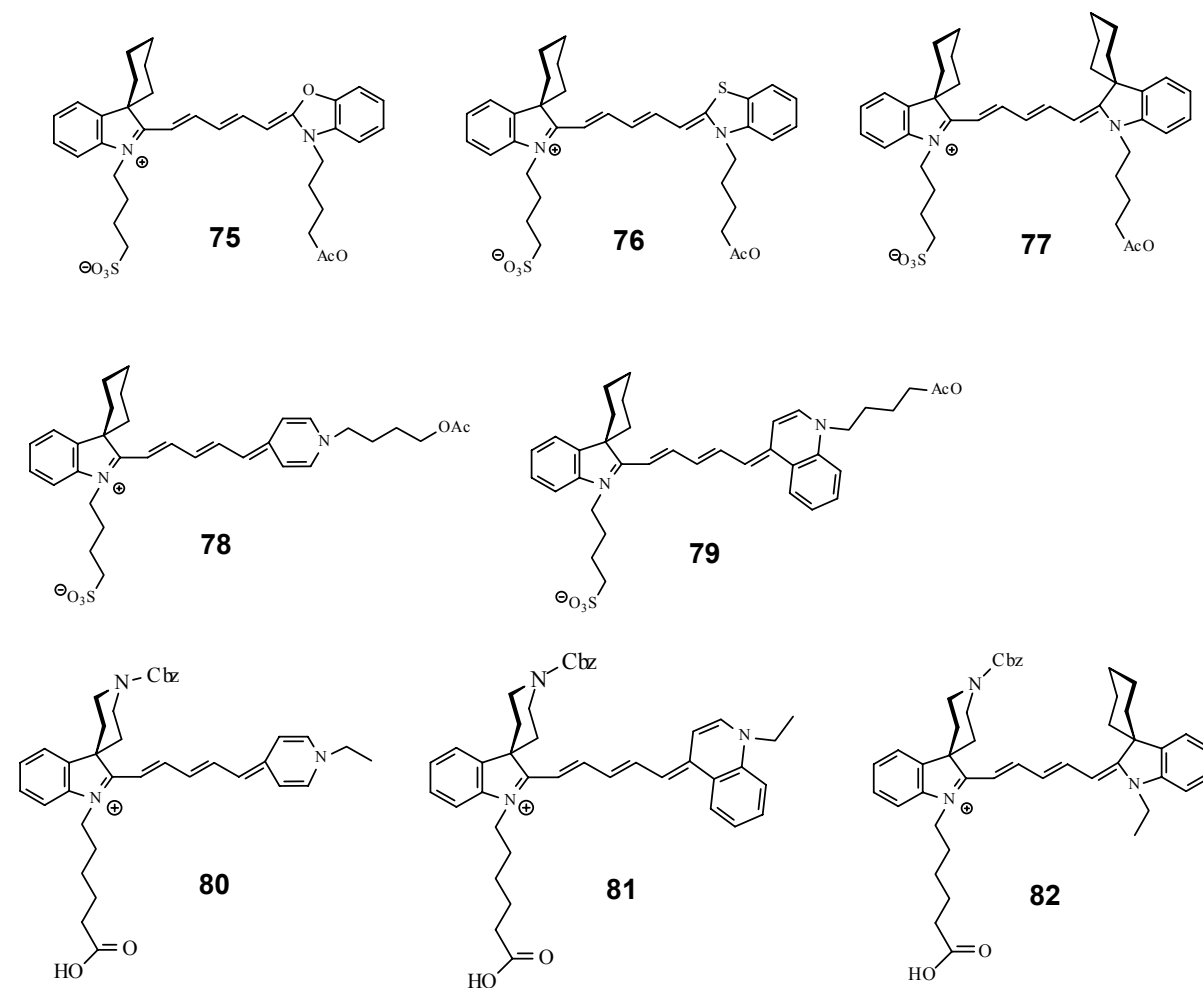
(78): **ES+**, m/z: 580.1 (44%), 208.1 (100 %), 102.0 (51 %)

(79): **ES+**, m/z: 629.1 (56 %), 549.3 (100 %), 493.3 (62 %), 320.2 (73 %), 264.6 (61 %), 236.0 (38 %)

(80): **ES+**, m/z: 606.5 (100 %)

(81): **ES+**, m/z: 656.6 (32 %), 310.2 (22 %), 284.2 (21 %), 222.2 (30 %), 210.1 (34 %), 184.1 (51 %), 171.2 (33 %), 91.2 (100 %)

(82): **ES+**, m/z: 712.6 (100 %), 378.3 (49 %), 204.0 (38 %)



1-(4-Sulfobutyl)-2-[5-(1-(4-acetoxybutyl)-2.3-dihydro-benz(1.3)oxazol-2-yliden)-pentadien-1.3-yl]-3-spirocyclohexan-3*H*-indolium betain (**75**)

1-(4-Sulfobutyl)-2-[5-(1-(4-acetoxybutyl)-2.3-dihydro-benzo(1.3)thiazol-2-yliden)-pentadien-1.3-yl]-3-spirocyclohexan-3*H*-indolium betain (**76**)

1-(4-Sulfobutyl)-2-[5-(1-(4-acetoxybutyl)-3-spiro-cyclohexan-dihydro-indol-2-yliden)-pentadien-1.3-yl]-3-spiro-cyclohexan-3*H*-indolium betain (**77**)

1-(4-Sulfobutyl)-2-[5-(1-(4-acetoxybutyl)-1.4-dihydropyridin-4-yliden)-pentadien-1.3-yl]-3-spirocyclohexan-3*H*-indolium betain (**78**)

1-(4-Sulfobutyl)-2-[5-(1-(4-acetoxybutyl)-1.4-dihydrochinolin-4-yliden)-pentadien-1.3-yl]-3-spirocyclohexan-3*H*-indolium betain (**79**)

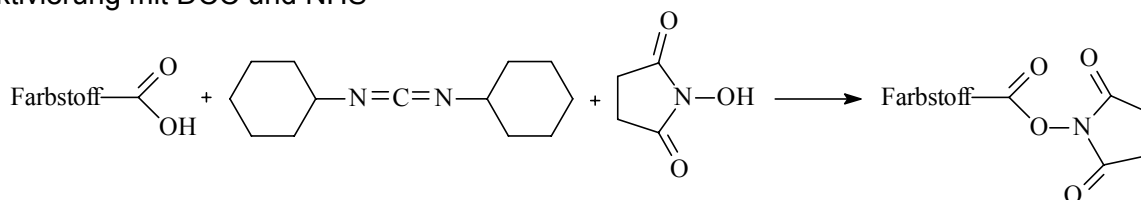
1(5-Carboxypentyl)-[5-(1-(4-acetoxybutyl)-1.4-dihydropyridin-4-yliden)-pentadien-1.3-yl]-3-spiro-4'-(1'-benzyloxycarbonyl)-piperidin-3*H*-indolium betain (**80**)

1(5-Carboxypentyl)-[5-(1-(4-acetoxybutyl)-1.4-dihydrochinolin-4-yliden)-pentadien-1.3-yl]-3-spiro-4'-(1'-benzyloxycarbonyl)-piperidin-3*H*-indolium betain (**81**)

1(5-Carboxypentyl)-[5-(1-(4-acetoxybutyl)-3-spirocyclohexan-2.3-dihydro-indol-4-yliden)-pentadien-1.3-yl]-3-spiro-4'-(1'-benzyloxycarbonyl)-piperidin-3*H*-indolium betain (**82**)

6.6.6 Aktivierung von Farbstoffen

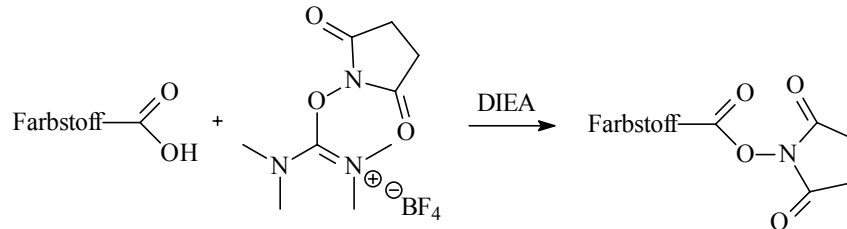
Aktivierung mit DCC und NHS



1 Äquivalent des jeweiligen Farbstoffes als Carbonsäurederivat wird mit 10 Äquivalenten N-Hydroxysuccinimid (NHS) und 10 Äquivalenten Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in trockenem Dimethylformamid 1-3 Tage unter Schutzgasatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Die Kontrolle des Reaktionsfortschrittes erfolgt mittels Dünnschichtchromatographie. Wenn das Edukt nicht mehr nachweisbar ist, wird die Reaktionsmischung in Eppendorfgefäße aliquotiert und der ausgefallene Feststoff wird abzentrifugiert (10 min, 9000 U/min). Die überstehende Lösung wird in frische Eppendorfgefäße überführt und der aktivierte Farbstoff wird mit einem Überschuss an Ethylacetat gefällt. Nach erneutem zentrifugieren wird die überstehende Lösung verworfen und das Farbstoffpellet wird wieder in sehr wenig DMF gelöst. Es folgt abermals das Fällen des Produktes mit Ethylacetat und zentrifugieren. Wenn nötig wird der Fällungsschritt noch mehrfach wiederholt. Der Farbstoff wird im Exsikkator über P₂O₅ im Ölpumpenvakuum getrocknet. Zur Aufbewahrung der

wasserempfindlichen, aktivierten Farbstoffe werden diese zusammen mit einem Trockenmittel (z.B. Silicagel) in eine PE-Folie eingeschweißt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ lichtgeschützt gelagert.

Aktivierung mit Succinimidyltetramethyluroniumtetrafluoroborat



Der Farbstoff (1 Äquivalent) und das Aktivierungsreagenz (5 Äquivalente) werden in DMF gelöst und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt wird, wie oben beschrieben, durch wiederholtes Fällen mit Ethylacetat erhalten. Einziges Problem dieser schnelleren Synthese ist, dass das als Nebenprodukt entstehende Salz DIEA⁺BF₄⁻ auf diese Weise mitgefällt wird und sich nicht vom Farbstoff trennen lässt. Für die Kopplung der Farbstoffe an Oligonukleotide ist dies jedoch nicht von Nachteil.

7 Anhang

7.1 Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide

Tabelle 18: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide
(R: A oder G, W: A oder T, D: A oder G oder T (ohne C))

Bezeichnung	Basensequenz (5' → 3')	GC (%)	T _m (°C)	Länge (nt)
Primer:				
cytb403	CCATGRGGACAAATATCATTCTGAGG	44	62	26
cytb779	TGGGGTGWAGTTDTCTGGGTCTCC	56	65	24
Cy5cytb779	Cy5-TGGGGTGWAGTTDTCTGGGTCTCC	56	65	24
Sonden¹⁾:				
	NH ₂ -C ₁₂ -			
Huhn684	T ₈ -CATTCTGGGCTTAACTCTCA	45	50	20
Pute684	T ₈ -CATCCTAGGTCTAACAAATCA	40	48	20
Rind684	T ₈ -CATCTTAGGGGCCCTCTTAC	55	54	20
Schaf684	T ₈ -CATCCTAGGTGCTATCCTAC	50	52	20
Schwein566	T ₈ -TTACCGCCCTCGCAGCCGTA	65	58	20
Ziege684	T ₈ -TATCTTAGGCGCCATGCTAC	50	52	20
Pferd684	T ₈ -CATCCTAGGACTCCTCCTCC	60	64	20
Mensch684	T ₈ -CGCCCTCGGCTTACTTCTCT	60	64	20
Ziege690	T ₈ -AGGCGCCATGCTACTAATTC	50	60	20
Reh690	T ₈ -AGGGGTTCTACTCTTAATTC	40	56	20
Reh629	T ₈ -GAATCCCATCAAACGTGGAC	50	60	20
Damhirsch690	T ₈ -AGGCATCCTATTCCTATTTT	40	56	20
Rothirsch690	T ₈ -AGGCATCTTACTTCTAGTAC	40	56	20
Rothirsch629	T ₈ -GAATCCCATCAGACGCAGAC	50	60	20
Hase709	T ₈ -CTCCTGCTCATACTCCTAGT	50	60	20
Kaninchen686	T ₈ -CCCTAGGTTTCCTTGAGCC	55	62	20
Hund690	T ₈ -AGGAGCCTTACTCCTACTCC	55	62	20
Büffel690	T ₈ -AGGCGCCCTACTACTAATCC	55	62	20
Targets:				
	Cy5-			
Rind-46-Cy5	AGAGCTAGAATTAGTAAGAGGGCCCTAAGATG TCCTTAATGGTAT	41	72	46
Huhn-46-Cy5	AATGGGGTGWAGTATGAGAGTTAAGCCAGAATG TCTTTGAAGGAGT	44	73	46

¹⁾ Bei den Berechnungen berücksichtigt wurden nur die tatsächlich hybridisierenden Nukleotide.

7.2 Sequenzvergleich des CytB-Gens verschiedener Spezies

Die Sequenzdaten des cytb-Gens der mtDNA für die in dieser Arbeit betrachteten Spezies wurden mit der Datenbank *Genbank* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) erhalten. In Tab. xx sind für alle Spezies die Daten der Sequenzen zusammengefasst, denen die hier im weiteren Verlauf verwendeten cytb-Abschnitte entnommen worden sind.

Tabelle 19: Sequenzdaten der verschiedenen Spezies.

Tierart	Spezies	Accession-No.
Huhn	<i>Gallus gallus</i>	NC_001323
Mensch	<i>Homo sapiens</i>	NC_001807
Pferd	<i>Equus caballus</i>	NC_001640
Pute	<i>Meleagris gallopavo</i>	L08381
Rind	<i>Bos taurus</i>	NC_001567
Schaf	<i>Ovis aries</i>	NC_001941
Schwein	<i>Sus scrofa</i>	NC_000845
Ziege	<i>Capra hircus</i>	NC_005044
Rothirsch	<i>Cervus elaphus</i>	AF423196
	<i>hippelaphus</i>	
Damhirsch	<i>Dama dama</i>	AJ000022
Reh	<i>Capreolus capreolus</i>	Y14951
Sikahirsch		
Hase	<i>Lepus europaeus</i>	NC_004208
Kaninchen	<i>Oryctolagus</i>	NC_001913
	<i>cuniculus</i>	
Büffel	<i>Bubalis bubalis</i>	AY079132
Hund	<i>Canis familiaris</i>	NC_002008

Der Sequenzvergleich (*alignment*) des cytb-Gens der mtDNA im Bereich des PCR-Produktes für die mesiten Spezies ist im Folgenden gezeigt.

Pferd 150
Schwein 150
Rothirsch 150
Damhirsch 150
Kaminchen 150
Rind 150
Mensch 150
B ffe1 150
Hase 150
Hund 150
Schaf 150
Ziege 150
ruler 150

Pferd 300
Schwein 300
Rothirsch 300
Damhirsch 300
Kaminchen 300
Rind 300
Mensch 300
B ffe1 300
Hase 300
Hund 300
Schaf 300
Ziege 300
ruler 300

Pferd 450
Schwein 450
Rothirsch 450
Damhirsch 450
Kaminchen 450
Rind 450
Mensch 450
B ffe1 450
Hase 450
Hund 450
Schaf 450
Ziege 450
ruler 450

Pferd 600
Schwein 600
Rothirsch 600
Damhirsch 600
Kaminchen 600
Rind 600
Mensch 600
B ffe1 600
Hase 600
Hund 600
Schaf 600
Ziege 600
ruler 600

Pferd 750
Schwein 750
Rothirsch 750
Damhirsch 750
Kaminchen 750
Rind 750
Mensch 750
B ffe1 750
Hase 750
Hund 750
Schaf 750
Ziege 750
ruler 750

Pferd 900
Schwein 900
Rothirsch 900
Damhirsch 900
Kaminchen 900
Rind 900
Mensch 900
B ffe1 900
Hase 900
Hund 900
Schaf 900
Ziege 900
ruler 900

Pferd 1050
Schwein 1050
Rothirsch 1050
Damhirsch 1050
Kaminchen 1050
Rind 1050
Mensch 1050
B ffe1 1050
Hase 1050
Hund 1050
Schaf 1050
Ziege 1050
ruler 1050

Pferd 1200
Schwein 1200
Rothirsch 1200
Damhirsch 1200
Kaminchen 1200
Rind 1200
Mensch 1200
B ffe1 1200
Hase 1200
Hund 1200
Schaf 1200
Ziege 1200
ruler 1200

Pferd 1350
Schwein 1350
Rothirsch 1350
Damhirsch 1350
Kaminchen 1350
Rind 1350
Mensch 1350
B ffe1 1350
Hase 1350
Hund 1350
Schaf 1350
Ziege 1350
ruler 1350

Pferd 1500
Schwein 1500
Rothirsch 1500
Damhirsch 1500
Kaminchen 1500
Rind 1500
Mensch 1500
B ffe1 1500
Hase 1500
Hund 1500
Schaf 1500
Ziege 1500
ruler 1500

Pferd 1650
Schwein 1650
Rothirsch 1650
Damhirsch 1650
Kaminchen 1650
Rind 1650
Mensch 1650
B ffe1 1650
Hase 1650
Hund 1650
Schaf 1650
Ziege 1650
ruler 1650

Pferd 1800
Schwein 1800
Rothirsch 1800
Damhirsch 1800
Kaminchen 1800
Rind 1800
Mensch 1800
B ffe1 1800
Hase 1800
Hund 1800
Schaf 1800
Ziege 1800
ruler 1800

Pferd 1950
Schwein 1950
Rothirsch 1950
Damhirsch 1950
Kaminchen 1950
Rind 1950
Mensch 1950
B ffe1 1950
Hase 1950
Hund 1950
Schaf 1950
Ziege 1950
ruler 1950

Pferd 2100
Schwein 2100
Rothirsch 2100
Damhirsch 2100
Kaminchen 2100
Rind 2100
Mensch 2100
B ffe1 2100
Hase 2100
Hund 2100
Schaf 2100
Ziege 2100
ruler 2100

Pferd 2250
Schwein 2250
Rothirsch 2250
Damhirsch 2250
Kaminchen 2250
Rind 2250
Mensch 2250
B ffe1 2250
Hase 2250
Hund 2250
Schaf 2250
Ziege 2250
ruler 2250

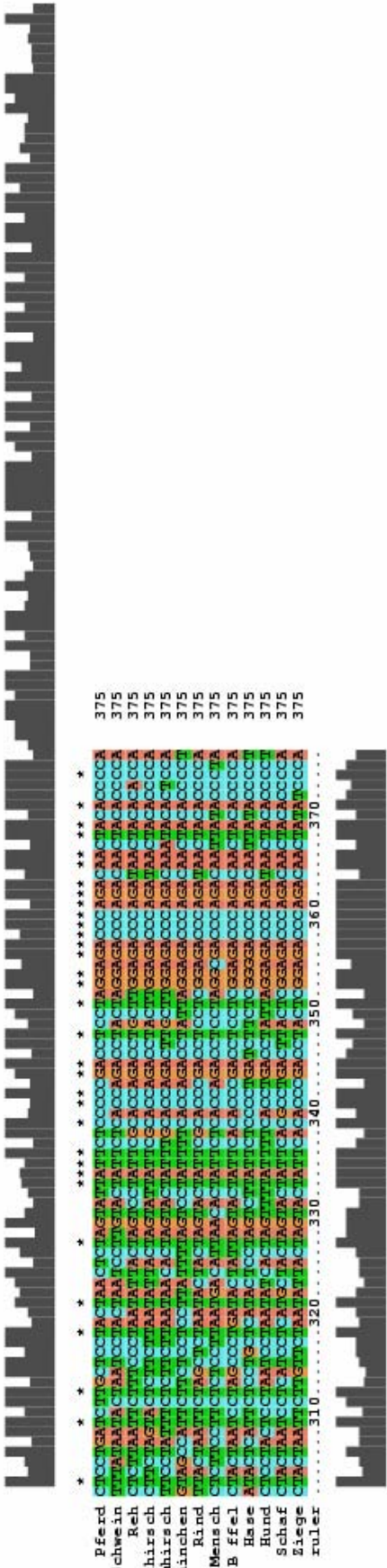
Pferd 2400
Schwein 2400
Rothirsch 2400
Damhirsch 2400
Kaminchen 2400
Rind 2400
Mensch 2400
B ffe1 2400
Hase 2400
Hund 2400
Schaf 2400
Ziege 2400
ruler 2400

Pferd 2550
Schwein 2550
Rothirsch 2550
Damhirsch 2550
Kaminchen 2550
Rind 2550
Mensch 2550
B ffe1 2550
Hase 2550
Hund 2550
Schaf 2550
Ziege 2550
ruler 2550

Pferd 2700
Schwein 2700
Rothirsch 2700
Damhirsch 2700
Kaminchen 2700
Rind 2700
Mensch 2700
B ffe1 2700
Hase 2700
Hund 2700
Schaf 2700
Ziege 2700
ruler 2700

Pferd 2850
Schwein 2850
Rothirsch 2850
Damhirsch 2850
Kaminchen 2850
Rind 2850
Mensch 2850
B ffe1 2850
Hase 2850
Hund 2850
Schaf 2850
Ziege 2850
ruler 2850

Pferd 3000
Schwein 3000
Rothirsch 3000
Damhirsch 3000
Kaminchen 3000
Rind 3000
Mensch 3000
B ffe1 3000
Hase 3000
Hund 3000
Schaf 3000
Ziege 3000
ruler 3000



Pferd 310
Schwein 310
Rothirsch 310
Damhirsch 310
Kaminchen 310
Rind 310
Mensch 310
B ffe1 310
Hase 310
Hund 310
Schaf 310
Ziege 310
ruler 310

Pferd 320
Schwein 320
Rothirsch 320
Damhirsch 320
Kaminchen 320
Rind 320
Mensch 320
B ffe1 320
Hase 320
Hund 320
Schaf 320
Ziege 320
ruler 320

Pferd 330
Schwein 330
Rothirsch 330
Damhirsch 330
Kaminchen 330
Rind 330
Mensch 330
B ffe1 330
Hase 330
Hund 330
Schaf 330
Ziege 330
ruler 330

Pferd 340
Schwein 340
Rothirsch 340
Damhirsch 340
Kaminchen 340
Rind 340
Mensch 340
B ffe1 340
Hase 340
Hund 340
Schaf 340
Ziege 340
ruler 340

Pferd 350
Schwein 350
Rothirsch 350
Damhirsch 350
Kaminchen 350
Rind 350
Mensch 350
B ffe1 350
Hase 350
Hund 350
Schaf 350
Ziege 350
ruler 350

Pferd 360
Schwein 360
Rothirsch 360
Damhirsch 360
Kaminchen 360
Rind 360
Mensch 360
B ffe1 360
Hase 360
Hund 360
Schaf 360
Ziege 360
ruler 360

Pferd 370
Schwein 370
Rothirsch 370
Damhirsch 370
Kaminchen 370
Rind 370
Mensch 370
B ffe1 370
Hase 370
Hund 370
Schaf 370
Ziege 370
ruler 370

Pferd 380
Schwein 380
Rothirsch 380
Damhirsch 380
Kaminchen 380
Rind 380
Mensch 380
B ffe1 380
Hase 380
Hund 380
Schaf 380
Ziege 380
ruler 380

Pferd 390
Schwein 390
Rothirsch 390
Damhirsch 390
Kaminchen 390
Rind 390
Mensch 390
B ffe1 390
Hase 390
Hund 390
Schaf 390
Ziege 390
ruler 390

Pferd 400
Schwein 400
Rothirsch 400
Damhirsch 400
Kaminchen 400
Rind 400
Mensch 400
B ffe1 400
Hase 400
Hund 400
Schaf 400
Ziege 400
ruler 400

Pferd 410
Schwein 410
Rothirsch 410
Damhirsch 410
Kaminchen 410
Rind 410
Mensch 410
B ffe1 410
Hase 410
Hund 410
Schaf 410
Ziege 410
ruler 410

Pferd 420
Schwein 420
Rothirsch 420
Damhirsch 420
Kaminchen 420
Rind 420
Mensch 420
B ffe1 420
Hase 420
Hund 420
Schaf 420
Ziege 420
ruler 420

Pferd 430
Schwein 430
Rothirsch 430
Damhirsch 430
Kaminchen 430
Rind 430
Mensch 430
B ffe1 430
Hase 430
Hund 430
Schaf 430
Ziege 430
ruler 430

Pferd 440
Schwein 440
Rothirsch 440
Damhirsch 440
Kaminchen 440
Rind 440
Mensch 440
B ffe1 440
Hase 440
Hund 440
Schaf 440
Ziege 440
ruler 440

Pferd 450
Schwein 450
Rothirsch 450
Damhirsch 450
Kaminchen 450
Rind 450
Mensch 450
B ffe1 450
Hase 450
Hund 450
Schaf 450
Ziege 450
ruler 450

Pferd 460
Schwein 460
Rothirsch 460
Damhirsch 460
Kaminchen 460
Rind 460
Mensch 460
B ffe1 460
Hase 460
Hund 460
Schaf 460
Ziege 460
ruler 460

Pferd 470
Schwein 470
Rothirsch 470
Damhirsch 470
Kaminchen 470
Rind 470
Mensch 470
B ffe1 470
Hase 470
Hund 470
Schaf 470
Ziege 470
ruler 470

Pferd 480
Schwein 480
Rothirsch 480
Damhirsch 480
Kaminchen 480
Rind 480
Mensch 480
B ffe1 480
Hase 480
Hund 480
Schaf 480
Ziege 480
ruler 480

Pferd 490
Schwein 490
Rothirsch 490
Damhirsch 490
Kaminchen 490
Rind 490
Mensch 490
B ffe1 490
Hase 490
Hund 490
Schaf 490
Ziege 490
ruler 490

Pferd 500
Schwein 500
Rothirsch 500
Damhirsch 500
Kaminchen 500
Rind 500
Mensch 500
B ffe1 500
Hase 500
Hund 500
Schaf 500
Ziege 500
ruler 500

8 Literatur

1. Oldham, P. B., McCarroll, M. E., McGown, L. B., Warner, I. M., *Molecular Fluorescence, Phosphorescence, and Chemiluminescence Spectrometry*, *Anal. Chem.* 2000, 72, 197R - 209R.
2. Miyawaki, A., Sawano, A., Kogure, T., *Lighting Up Cells: Labelling Proteins with Fluorophores*, *Nat. Cell Biol., Suppl.* S7-14.
3. Lippincott-Schwarz, J., Altan-Bonnet, N., Patterson, G. H., *Photobleaching and Photoactivation: Following Protein Dynamics in Living Cells*, *Nat. Cell Biol.*, 2003, *Suppl.*: S7-14.
4. Kricka, L. J., *Stains, Labels and Detection Strategies for Nucleic Acid Assays*, *Ann. Clin. Biochem.*, 2002, 39, 114-129.
5. Erhardt, D., *GFP Technology for Live Cell Imaging*, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2003, 6, 622-628.
6. Wilhelm, J., Pingoud, A., *Real-Time Polymerase Chain Reaction*, *Chembiochem*, 2003, 7, 1120-1228.
7. Mocellini, S., Rossi, C. R., Marincola, F. M., *Quantitative Real-Time PCR in Cancer Research*, *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2003, 51, 301-13.
8. King, W., Proffitt, J., Morrison, L., Piper, J., Lane, D., Seelig, S., *The Role of Fluorescence in situ Hybridisation Technologies in Molecular Diagnostics and Disease Management*, *Mol. Diagn.*, 2000, 5, 309-319.
9. Wolf, D. E., *Fundamentals of Fluorescence and Fluorescence Microscopy*, *Methods Cell Biol.*, 2003, 72, 157-184.
10. Freeman, W. M., Robertson, D. J., Vrana, K. E., *Fundamentals of DNA Hybridisation Arrays for Gene Expression Analysis*, *Biotechniques*, 2000, 29, 1042-1046, 1048-1055.
11. Schult, K., Katerkamp, A., Trau, D., Grawe, F., Cammann, K., Meusel, M., *Disposable Optical Sensor Chip for Medical Diagnostics: New Ways in Bioanalysis*, *Anal. Chem.*, 1999, 71, 5430-5435.
12. Peter, C., Meusel, M., Grawe, F., Katerkamp, A., Cammann, K., Borchers, T., *Optical DNA-Sensor Chip for Real-Time Detection of Hybridization Events*, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 2001, 371, 120-127.
13. Valeur, B., *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, 2002.
14. Dewey, T. G., *Biophysical and Biochemical Aspects of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York, 1991.
15. Wolfbeis, O. S., *Fluorescence Spectroscopy: New Methods and Applications*, Springer-Verlag, Berlin, 1993.
16. Warner, I. M., McGown, L. B., *Advances in Multidimensional Luminescence*, JAI Press, Greenwich, CT, 1991.
17. Baeyens, W. R. G., De Keukeleire, D., Korkidis, K., *Luminescence Technics in Chemical and Biochemical Analysis*.
18. Lakowicz, J. R., *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York, 1991.
19. Eastwood, D., Cline Love, L. J., *Progress in Analytical Luminescence*, STP 1009, ASTM, Philadelphia, 1988.
20. Cline Love, L. J., Eastwood, D., *Advances in Luminescence Spectroscopy*, STP 863, ASTM, Philadelphia, 1985.
21. Eastwood, D., *New Directions in Molecular Luminescence*, STP 822, ASTM, Philadelphia, 1983.
22. Schulmann, S. G., *Molecular Luminescence Spectroscopy: Methods and Applications Part 1*, Wiley-Interscience, New York, 1985.
23. Wehry, E. L., *Modern Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York, 1975.

24. Lakowicz, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy, Second Edition*, Plenum Press, New York, 1999.
25. Rendell, D., *Fluorescence and Phosphorescence Spectroscopy*, John Wiley & Sons, 1987.
26. Schulman, S. G., *Fluorescence and Phosphorescence Spectroscopy: Physicochemical Principles and Practice*, Pergamon, London, 1977.
27. Guilbault, G. G., Decker, M., *Practical Fluorescence, Second Edition*, New York 1990.
28. Von Grafenstein, B., *Vorlagen zur Spektroskopie*, Zentrum für Physikalische Chemie, TU-München, <http://zentrum.phys.chemie.tu-muenchen.de/ogrodnik/fluor4.pdf>.
29. Gradel, G., Guenther, R., Sterrer, S., *Biomethods (Basel)*, 1999, 10, 331-351.
30. Haupts, U., Maiti, S., Schwille, P., Webb, W. W., *Dynamics on Fluorescence Fluctuations in Green Fluorescent Protein Observed by Fluorescence Correlation Spectroscopy*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 13573-13578.
31. Chattopadhyay, A.; Mukkerje, S.; Langmuir, 1999, 15, 2142-2148.
32. Windsor, S.A., Tinker, M.H., Osborne, M.R., Seidel, A., *Studies of the Binding of Diolepoxide Metabolites of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons to DNA Using Electrofluorescence Polarization Spectroscopy*, *Inst. Phys. Conf. Ser.*, 1996, 150, 321-326.
33. Winkler, T., Ketting, U., Koltermann, A., Eigen, M., *Confocal Fluorescence Coincidence Analysis: An Approach to Ultra High-Throughput Screening*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 1375-1378.
34. Paddock, S., W., *Confocal Laser Scanning Microscopy*, *BioTechniques*, 1999, 27, 992-1004.
35. Stelzer, E. H. K., Merdes, A., De Mey, A., *Konfokale Fluoreszenzmikroskopie in der Zellbiologie*, *Biologie in unserer Zeit*, 1991, 21, Nr.1.
36. Weiss, S., *Fluorescence Spectroscopy on Single Molecules*, *Science*, 1999, 282, 1676-1683.
37. Wagnieres, G., Star, W., Wilson, B., *In Vivo Fluorescence Spectroscopy for Oncological Applications*, *Photochem. Photobiol.*, 1998, 68, 603 - 632.
38. Middendorf, L., Amen, J., Bruce, R., et al., *Near-Infrared Fluorescence Instrumentation for DNA Analysis*, *NATO ASI Ser., Ser. 3*, 1998, 52, 21 - 53.
39. Sittampalam, G., Kahl, S., Janzen, W., *High-Throughput Screening: Advances in Assay Technologies*, *W. Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1997, 1, 384 - 391.
40. Silverman, L., Campbell, R., Broach, J., *New Assay Technologies for High-Throughput Screening*, *R. Curr. Opin. in Chem. Biol.*, 1998, 2, 397 - 403.
41. Caetano-Anolles, G., Gresshoff, P. M., *DNA-Markers*, New York, Wiley-VCH, 1998.
42. Mansfield, E. S., Worley, J. M., McKenzie, S. E., Surrey, S., Rappaport, E., Fortina, P., *Nucleic Acid Detection using Non-Radioactive Labelling Methods*, *Mol. Cell Probes*, 1995, 9, 145-156.
43. *Molecular Probes, Handbook, 8th Edition, Web Edition.*
44. Wörth, C. C. T., Schmitz, O. J., Kliem, H.-C., Wießler, M., *Synthesys of Fluorescently Labelled Alkylated DNA Adduct Standards and Separation by Capillary Electrophoresis*, *Electrophoresis*, 2000, 21, 2086-2091.
45. Der-Balian, G. P., Kameda, N., Rowley, G. L., *Fluorescein Labelling of Fab' while Preserving Single Thiol*, *Anal. Biochem.*, 1988, 173, 59-63.
46. Sjoback, R., Nygren, J., Kubista, M., *Absorption and Fluorescence Properties for Fluorescein*, *Spectrochim. Acta*, 1995, A 51, 7.
47. Song, L., Hennink, E. J., Young, I. T., Tanke, H. J., *Photobleaching Kinetics of Fluorescein in Quantitative Fluorescence Microscopy*, *Biophys. J.*, 1995, 68, 2588-2600.
48. *Firma Dyomics, Web page: www.dyomics.com.*
49. Suzuki, T., Fujikura, K., Higashiyama, T., Takata, K., *DNA Staining for Fluorescence and Laser Confocal Microscopy*, *J. of Hist. Cyt.*, 1997, 45, 49-53.

50. Morgan, A. R., Lee, J. S., Pulleyblank, D. E., Marray, N. L., Evans, D. H., *Ethidium Fluorescence Assays: Part 1. Physicochemical Studies*, *Nucleic Acids Res.*, 1979, 7, 547-569
Ethidium Fluorescence Assay: Part 2. Enzymatic Studies and DNA-Protein Interactions, *Nucleic Acids Res.*, 1979, 7, 571-594.
51. Georghiou, S., *Interaction of Acridine Drugs with DNA and Nucleotides*, *Photochem. Photobiol.*, 1977, 26, 59-68.
52. Li, X., Tragomas, F., Melamed, M.R., Darzynskiewicz, Z., *Single-Step Procedure for Labeling DNA Strand Breaks with Fluorescein- or Bodipy-Conjugated Deoxynucleotides*, *Cytometry*, 1995, 20, 172-180.
53. Griffiths, J., *Colour and Constitution of Organic Molecules*, Chapter 8, Academic Press, London, 1976.
54. Tyutyulkov, N., Fabian, J., Mehlhorn, A., Dietz, F., Tadjer, A., *Polymethine Dyes: Structure and Properties*, Sofia, St. Kliment Ohridski University Press, 1991.
55. Hamer, F. M., *The Cyanine Dyes and Related Compounds*, New York, Wiley, 1964.
56. Heilig, G., *Dissertation, Synthese und Eigenschaften planar fixierter langkettiger Cyanin-Laser-Farbstoffe*, Göttingen, 1986.
57. Rossi, U. D., Hermel, H., *Beta-Sheet Recognition by Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy*, *Appl. Spec.*, 1999, 53, 505-509.
58. Schütz, G.J., Pastuschenko, V. Ph., Gruber, H.J., Knaus, H.-G., Prager, B., Schindler, H., *3D Imaging of Individual Ion Channels in Live Cells at 40 nm Resolution*, *Single Mol.*, 2000, 1, 25-31.
59. Gruber, H.J., Hahn, C.D., Kada, G., Riemer, C.K., Harms, G.S., Ahrer, W., Dax, T.G.; Knaus, H.-G., *Anomalous Fluorescence Enhancement of Cy3 and Cy3.5 versus Anomalous Fluorescence Loss of Cy5 and Cy7 upon Covalent Linking to IgG and Noncovalent Binding to Avidin*, *Bioconjugate Chem.*, 2000, 11, 696-704.
60. Randolph, J. B., Waggoner, A.S., *Stability, Specificity and Fluorescence Brightness of Multiply-Labelled Fluorescent DNA-Probes*, *Nucl. Acids. Res.*, 1997, 25, 1923-1929.
61. Gadjev, N. I., Deligeorgiev, T. G., Kim, S. H., *Preparation of Monomethine Cyanine Dyes as Noncovalent Labels for Nucleotide Acids*, *Dyes and Pigments*, 1999, 40, 181-186.
62. Waggoner, A. S., Ernst, L. A., Mujumdar, R.B., *Method for Labeling and Detecting Materials Employing Arylsulfonated Cyanine Dyes*, *US Patent*, 5,486,616, Nov. 1993.
63. Mujumdar, R. B., Ernst, L.A., Mujumdar, S. R., Waggoner, A. S., *Cyanine Dye Labeling Reagents Containing Isothiocyanate Groups*, *Cytometry*, 1989, 10, 11-19.
64. Mujumdar, S. R., Mujumdar, R. B., Grant, C. M., Waggoner, S. A., *Cyanine-Labeling Reagents: Sulfobenzindocyanine Succinimidyl Esters*, *Bioconj. Chem.*, 1996, 7, 356-362.
65. Mujumdar, R. B., Ernst, L. A., Mujumdar, S. R., Lewis, C. J., Waggoner, A. S., *Cyanine Dye Labelling Reagents: Sulfoindocyanine Succinimidyl esters*, *Bioconj. Chem.*, 1993, 4, 105-111.
66. Southwick, P. L., Ernst, L. A., Tauriello, E.W., Parker, S. R., Mujumdar, R. B., Mujumdar, S. R., Clever, H. E., Waggoner, A. S., *Cyanine Dye Labeling Reagents - Carboxymethylindocyanine Succinimidyl Esters*, *Cytometry*, 1990, 11, 418-430.
67. Haalck, L., Gedig, E., Hölpert, H.J., Podsadlowski, V., *PCT patent application*, WO 02/26890 A1.
68. Roderiguez, J. G., Urrutia, A., Diego, J. E., Martinez-Alcazar, M. P., Fonesca, I., *Synthesis of 2'-Alkylspiro[2-X-cyclohexan-1,3'-3'H-indole] (X=H, X=CH₃) by an Unexpected Reaction between an Organomagnesium Halide and 2'-Methylspiro[2-X-cyclohexan-1,3'-3'H-indole]. X-Ray-Structure of a Fluorescent Dimeric Compound*, *J. Org. Chem.*, 1998, 63, 4332-4337.
69. Singer, V. L., Lawler, T. E., Yue, S., *Comparison of Cyber Green I Nucleic Acid Gel Stain Mutagenicity and Ethidium Bromide Mutagenicity in the Salmonella / Mammalian Microsome Reverse Mutation Assay (Ames Test)*, *Mut. Res.*, 1999, 439, 37-47.

70. Fukui, K., Morimoto, M., Segawa, H., Tanaka, K., Shimidzu, T., *Synthesis and Properties of an Oligonucleotide Modified with an Acridine Derivative at the Artificial Abasic Site*, *Bioconj. Chem.*, 1996, 7, 349-355.
71. Theisen, P., McCollum, C., Andrus, A., *Fluorescent Dye Phosphoramidite Labelling of Oligonucleotides*, *Nucl. Acids Symp. Ser.*, 1992, 27, 99-100.
72. Schubert, F., Cech, D., Reinhardt, R., Wiesner, P., *Fluorescent Labelling of Sequencing Primers for Automated Oligonucleotide Synthesis*, *J. DNA Sequ. and Mapp.*, 1992, 2, 273-279.
73. Hakala, H., Virta, P., Salo, H., Lönneberg, H., *Simultaneous Detection of Several Oligonucleotides by Time-Resolved Fluorometry: The Use of a Mixture of Categorized Microparticles in a Sandwich Type Mixed-Phase Hybridization Assay*, *Nucl. Acids Res.*, 1998, 26, 5581-5588.
74. Cox, W. G., Singer, V. L., *Fluorescent DNA Hybridization Probe Preparation Using Amin Modification and Reactive Dye Coupling*, *Biotechniques*, 2004, 36, 114-122.
75. t' Hoen, P. A., de Kort, F., van Ommen, G. J., den Dunnen, J. T., *Fluorescent Labelling of cRNA for Microarray Applications*, *Nucl. Acids Res.*, 2003, 31, e20.
76. Wiegant, J., Verwoerd, N., Mascheretti, S., Bolk, M., Tanke, H. J., Raap, A. K., *An Evaluation of a New Series of Fluorescent dUTPs for Fluorescence in situ Hybridisation*, *J. Histochem. Cytochem.*, 1996, 44, 525-529.
77. Yu, H., Chao, J., Mujumdar, R., Mujumdar, S., Waggoner, A. S., *Cyanine Dye dUTP Analogues for Enzymatic Incorporation of DNA Probes*, *Nucl. Acids Res.*, 1994, 11, 3226-3232.
78. Zhu, Z., Chao, J., Yu, H., Waggoner, A. S., *Directly Labelled DNA-Probes Using Fluorescent Nucleotides with Different Length Linkers*, *Nucl. Acids Res.*, 1994, 25, 3418-3422.
79. Duplaa, C., Couffinathal, T., Labat, L., Moreau, C., Lamaziere J. M., Bonnet, J., *Quantitative Analysis of Polymerase Chain Reaction Products Using Biotinylated dUTP Incorporation*, *Anal. Biochem.*, 1993, 212, 229 - 236.
80. Heller, M.J., *DNA Microarray Technology: Devices, Systems and Applications*, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2002, 4, 129-153.
81. Holloway, A.J., van Laar, R.K., Tothill, R.W., Bowtell, D.D.L., *Options Available - from Start to Finish - for Obtaining Data from DNA Microarrays II*, *Nat. Genet.*, 2002, 32, 481-489.
82. Hegde, P., Qi, R., Abernathy, K., Gay, C., Dharap, S., Gaspard, R., Hughes, J.E., Snesrud, E., Lee, N., Quackenbush, J., *A Concise Guide to cDNA Microarray Analysis*, *BioTechniques*, 2000, 29, 548-562.
83. Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., Brown, P.O., *Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray*, *Science*, 1995, 270, 467-470.
84. Liu, E.T., *Classification of Cancers by Expression Profiling*, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2003, 13, 97-103.
85. Ramaswamy, S., Tamayo, P., Rifkin, R., Mukherjee, S., Yeang, C.H., Angelo, M., Ladd, C., Reich, M., Latulippe, E., Mesirov, J.P., Poggio, T., Gerald, W., Loda, M., Lander, E.S., Golub, T.R., *Multiclass Cancer Diagnosis Using Tumor Gene Expression Signatures*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2001, 98, 15149-15154.
86. Rushmore, T.H., Kong, A.N., *Pharmacogenomics, Regulation and Signaling Pathways of Phase I and II Drug Metabolizing Enzymes*, *Curr. Drug Metab.*, 2002, 3, 481-490.
87. Chin, K.V., Kong, A.N., *Application of DNA Microarrays in Pharmacogenomics and Toxicogenomics*, *Pharm. Res.*, 2002, 19, 1773-1778.
88. Bugelski, P.J., *Gene Expression Profiling for Pharmaceutical Toxicology Screening*, *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, 2002, 5, 79-89.
89. Geiss, G.K., Bumgarner, R.E., An, M.C., Agy, M.B., van't Wout, A.B., Hammersmark, E., Carter, V.S., Upchurch, D., Mullins, J.I., Katze, M.G., *Large-Scale Monitoring of*

- Host Cell Gene Expression During HIV-1 Infection Using cDNA Microarrays*, *Virology*, 2000, 266, 8-16.
90. Coller, H.A., Grandori, C., Tamayo, P., Colbert, T., Lander, E.S., Eisenman, R.N., Golub, T.R., *Expression Analysis with Oligonucleotide Microarrays Reveals that MYC Regulates Genes Involved in Growth, Cell Cycle, Signalling and Adhesion*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2000, 97, 3260-3265.
 91. Hacia, J.G., Brody, L.C., Chee, M.S., Fodor, S.P.A., Collins, F.S., *Detection of Heterozygous Mutations in BRCA1 Using High Density Oligonucleotide Arrays and Two-Colour Fluorescence Analysis*, *Nat. Genet.*, 1996, 14, 441-447.
 92. Guo, Z., Guilfoyle, R.A., Thiel, A.J., Wang, R., Smith, L.M., *Direct Fluorescence Analysis of Genetic Polymorphisms by Hybridization with Oligonucleotide Arrays on Glass Supports*, *Nucl. Acids Res.*, 1994, 22, 5456-5465.
 93. Cutler, D.J., Zwick, M.E., Carrasquillo, M.M., Yohn, C.T., Tobin, K.P., Kashuk, C., Mathews, D.J., Shah, N.A., Eichler, E.E., Warrington, J.A., Chakravarti, A., *High-Throughput Variation Detection and Genotyping Using Microarrays*, *Genome Res.*, 2001, 11, 1913-1925.
 94. Scheller, F., Schubert, F., *Biosensoren*. Birkhäuser Verlag, Berlin, 1989.
 95. Cammann, K., Chemnitz, G.C., Kleiböhmer, W., *Instrumentelle Analytische Chemie*. Cammann, K. (Hrsg.), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2001.
 96. Ozkan, D., Erdem, A., Kara, P., Kerman, K., Meric, B., Hassmann, J., Ozsoz, M., *Allele-Specific Genotype Detection of Factor V Leiden Mutation from Polymerase Chain Reaction Amplicons Based on Label-Free Electrochemical Genosensor*, *Anal. Chem.*, 2002, 74, 5931-5936.
 97. Caruana, D.J., Heller, A., *Enzyme-Amplified Amperometric Detection of Hybridization and of a Single Base Pair Mutation in an 18-Base Oligonucleotide on a 7- μ m-Diameter Microelectrode*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121, 769-774.
 98. Ju, H.X., Ye, Y.K., Zhao, J.H., Zhu, Y.L., *Hybridization Biosensor Using Di(2,2'-bipyridine)osmium (III) as Electrochemical Indicator for Detection of Polymerase Chain Reaction Product of Hepatitis B Virus DNA*, *Anal. Biochem.*, 2003, 313, 255-261.
 99. Wang, J., Rivas, G., Fernandes, J.R., Paz, J.L.L., Jiang, M., Waymire, R., *Indicator-Free Electrochemical DNA Hybridization Biosensor*, *Anal. Chim. Acta*, 1998, 375, 197-203.
 100. Tombelli, S., Mascini, M., Braccini, L., Anichini, M., Turner, A.P.F., *Coupling of a DNA Piezoelectric Biosensor and Polymerase Chain Reaction to Detect Apolipoprotein E Polymorphisms*, *Biosens. Bioelectron.*, 2000, 15, 363-370.
 101. Wang, J., Nielsen, P.E., Jiang, M., Cai, X., Fernandes, J.R., Grant, D.H., Ozsoz, M., Beglieter, A., Mowat, M., *Mismatch-Sensitive Hybridization Detection by Peptide Nucleic Acids Immobilized on a Quartz Crystal Microbalance*, *Anal. Chem.*, 1997, 69, 5200-5202.
 102. Bier, F.F., Fürste, J.P., *Nucleic Acid Based Sensors*, in: *Frontiers in Biosensorics I, Fundamental Aspects*. Scheller, F.W., Schubert, F., Fedrowitz, J. (Hrsg.), Birkhäuser Verlag, Basel, 1997.
 103. Vercoutere, W., Akesson, M., *Biosensors for DNA Sequence Detection*, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2002, 6, 816-822.
 104. Feriotta, G., Borgatti, M., Mischianti, C., Bianchi, N., Gambari, R., *Biosensor Technology and Surface Plasmon Resonance for Real-Time Detection of Genetically Modified Roundup Ready Soybean Gene Sequences*, *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50, 955-962.
 105. Feriotta, G., Corradini, R., Sforza, S., Bianchi, N., Mischianti, C., Marchelli, R., Gambari, R., *Peptide Nucleic Acids and Biosensor Technology for Real-Time Detection of the Cystic Fibrosis W1282X Mutation by Surface Plasmon Resonance*, *Lab. Invest.*, 2001, 81, 1415-1427.

106. Kai, E., Sawata, S., Ikebukuro, K., Iida, T., Honda, T., Karube, I., *Detection of PCR Products in Solution Using Surface Plasmon Resonance*, *Anal. Chem.*, 1999, 71, 796-800.
107. Nilsson, P., Larsson, A., Lundberg, J., Uhlén, M., Nygren, P.A., *Mutational Scanning of PCR Products by Subtractive Oligonucleotide Hybridization Analysis*, *BioTechniques*, 1999, 26, 308-316.
108. Bianchi, N., Rutigliano, C., Tomassetti, M., Feriotto, G., Zorzato, F., Gambari, R., *Biosensor Technology and Surface Plasmon Resonance for Real-Time Detection of HIV-1 Genomic Sequences Amplified by Polymerase Chain Reaction*, *Clin. Diagn. Virol.*, 1997, 8, 199-208.
109. O'Meara, D., Nilsson, P., Nygren, P.A., Uhlén, M., Lundberg, J., *Capture of Single-Stranded DNA Assisted by Oligonucleotide Molecules*, *Anal. Biochem.*, 1998, 255, 195-203.
110. Persson, B., Stenhag, K., Nilsson, P., Larsson, A., Uhlén, M., Nygren, P.A., *Analysis of Oligonucleotide Probe Affinities Using Surface Plasmon Resonance: A Means for Mutational Scanning*, *Anal. Biochem.*, 1997, 246, 34-44.
111. Gotoh, M., Hasebe, M., Ohira, T., Hasegawa, Y., Shinohara, Y., Sota, H., Nakao, J., Tosu, M., *Rapid Method for Detection of Point Mutations Using Mismatch Binding Protein (MutS) and an Optical Biosensor*, *Genet. Anal.*, 1997, 14, 47-50.
112. Gotoh, M., Hasegawa, Y., Shinohara, Y., Shimizu, M., Tosu, M., *A New Approach to Determine the Effect of Mismatches on Kinetic Parameters in DNA Hybridization Using an Optical Biosensor*, *DNA Research*, 1995, 2, 285-293.
113. Watts, H., Yeung, D., Parkes, H., *Real-Time Detection and Quantification of DNA Hybridization by an Optical Biosensor*, *Anal. Chem.*, 1995, 4283-4289.
114. Buckle, P.E., Davies, R.J., Kinning, T., Yeung, D., Edwards, P.R., Pollard-Knight, D., Lowe, C.R., *The Resonant Mirror: A Novel Optical Biosensor for Direct Sensing of Biomolecular Interactions, Part II: Applications*, *Biosens. Bioelectron.*, 1993, 8, 355-363.
115. Cush, R., Cronin, J.M., Stewart, W.J., Maule, C.H., Molloy, J., Goddard, N.J., *The Resonant Mirror: A Novel Optical Biosensor for Direct Sensing of Biomolecular Interactions, Part I: Principle of Operation and Associated Instrumentation*, *Biosens. Bioelectron.*, 1993, 8, 347-353.
116. Voros, J., Ramsden, J.J., Csucs, G., Szendro, I., De Paul, S.M., Textor, M., Spencer, N.D., *Optical Grating Coupler Biosensors*, *Biomaterials*, 2002, 3699-3710.
117. Bier, F.F., Kleinjung, F., Scheller, F.W., *Real-Time Measurement of Nucleic Acid Hybridization Using Evanescent-Wave Sensors: Steps Towards the Genosensor*, *Sensor. Actuat.*, 1997, B38-39, 78-82.
118. Bier, F.F., Scheller, F.W., *Label-Free Observation of DNA-Hybridization and Endonuclease Activity on a Wave Guide Surface Using a Grating Coupler*, *Biosens. Bioelectron.*, 1996, 11, 669-674.
119. Kleinjung, F., Bier, F.F., Warsinke, A., Scheller, F.W., *Fiber-Optic Genosensor for Specific Determination of Femtomolar DNA Oligomers*, *Anal. Chim. Acta*, 1997, 350, 51-58.
120. Piunno, P.A.E., Krull, U.J., *Fiber-Optic DNA Sensor for Fluorimetric Nucleic Acid Determination*, *Anal. Chem.*, 1995, 67, 2635-2643.
121. Li, J., Tan, W., Wang, K., Xiao, D., Yang, X., He, X., Tang, Z., *Ultrasensitive Optical DNA Biosensor Based on Surface Immobilization of Molecular Beacon by a Bridge Structure*, *Anal. Sci.*, 2001, 17, 1149-1153.
122. Liu, X., Tan, W., *A Fiber-Optic Evanescent Wave DNA Biosensor Based on Novel Molecular Beacons*, *Anal. Chem.*, 1999, 71, 5054-5059.
123. Tolley, S.E., Wang, H.K., Smith, R.S., Christensen, D.A., Herron, J.N., *Single-Chain Polymorphism Analysis in Long QT Syndrome Using Planar Waveguide Fluorescent Biosensors*, *Anal. Biochem.*, 2003, 315, 223-237.

124. Kambhampati, D., Nielsen, P.E., Knoll, W., *Investigating the Kinetics of DNA-DNA and PNA-DNA Interactions Using Surface Plasmon Resonance-Enhanced Fluorescence Spectroscopy*, *Biosens. Bioelectron.*, 2001, 16, 1109-1118.
125. Liebermann, T., Knoll, W., Sluka, P., Herrmann, R., *Complement Hybridization from Solution to Surface-Attached Probe-Oligonucleotides Observed by Surface-Plasmon-Field-Enhanced Fluorescence Spectroscopy*, *Colloid. Surface.*, 2000, A 169, 337-350.
126. Schuderer, J., Akkoyun, A., Brandenburg, A., Bilitewski, U., Wagner, E., *Development of a Multichannel Fluorescence Affinity Sensor System*, *Anal. Chem.*, 2000, 72, 3942-3948.
127. Budach, W., Abel, A.P., Bruno, A.E., Neuschäfer, D., *Planar Waveguides as High-Performance Sensing Platforms for Fluorescence-Based Multiplexed Oligonucleotide Hybridization Assays*, *Anal. Chem.*, 1999, 71, 3347-3355.
128. Duveneck, G.L., Pawlak, M., Neuschäfer, D., Bär, E., Budach, W., Piele, U., Ehrat, M., *Novel Bioaffinity Sensors for Trace Analysis Based on Luminescence Excitation by Planar Waveguides*, *Sensor. Actuat.*, 1997, B38-39, 88-95.
129. Watterson, J.H., Piunno, P.A.E., Wust, C.C., Rha, S., Krull, U.J., *Influences of Non-Selective Interactions of Nucleic Acids on Response Rates of Nucleic Acid Fiber Optic Biosensors*, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 2001, 369, 601-608.
130. Lü, H., Zhao, Y., Ma, J., Li, W., Lu, Z., *Characterization of DNA Hybridization on the Optical Fiber Surface*, *Colloid. Surface.*, 2000, A 175, 147-152.
131. Abel, A.P., Weller, M.G., Duveneck, G.L., Ehrat, M., Widmer, H.M., *Fiber-Optic Evanescent Wave Biosensor for the Detection of Oligonucleotides*, *Anal. Chem.*, 1996, 68, 2905-2912.
132. Begemann, S., *Entwicklung eines optischen DNA-Sensors zum simultanen Nachweis des invA-Gens von Salmonella spp. und des ctxA-Gens aus Vibrio cholerae*. Diplomarbeit, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 2002.
133. Meusel, M., Trau, D., Katerkamp, A., Meier, F., Polzius, R., Cammann, K., *New Ways in Bioanalysis - One-Way Optical Sensor Chip for Environmental Analysis*, *Sensor. Actuat.*, 1998, B51, 249-255.
134. Schult, K., *Entwicklung von fluoreszenzoptischen Evaneszent-Feld-Biosensoren zur Immun- und Nukleinsäure-Analytik in Realzeit*, Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 2000.
135. Peter, C., *Evaneszent-Feld-DNA-Biosensor zur schnellen, zeitaufgelösten Detektion multipler Hybridisierungsereignisse - Einsatz zur Tierartendifferenzierung in Lebensmitteln und für die Identifizierung von Mikroorganismen*, Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 2004.
136. Peterson, A.W., Wolf, L.K., Georgiadis, R.M., *Hybridization of Mismatched or Partially Matched DNA at Surfaces*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124, 14601-14607.
137. Erickson, D., Li, D., Krull, U.J., *Modeling of DNA Hybridization Kinetics for Spatially Resolved Biochips*, *Anal. Biochem.*, 2003, 317, 186-200.
138. O'Shannessy, D.J., Brigham-Burke, M., Soneson, K.K., Hensley, P., Brooks, I., *Determination of Rate and Equilibrium Binding Constants for Macromolecular Interactions Using Surface Plasmon Resonance: Use of Nonlinear Least Squares Analysis Methods*, *Anal. Biochem.*, 1993, 212, 457-468.
139. Pilevar, S., Davis, C.C., Portugal, F., *Tapered Optical Fiber Sensor Using Near-Infrared Fluorophores to Assay Hybridization*, *Anal. Chem.*, 1998, 70, 2031-2037.
140. Beier, M., Hoheisel, J.D., *Versatile Derivatisation of Solid Support Media for Covalent Bonding on DNA-Microchips*, *Nucl. Acids Res.*, 1999, 27, 1970-1977.
141. Hofmann, K., *Nachweis der Tierart bei Fleisch und Fleischerzeugnissen*, 2. Mitteilung. *Fleischwirtschaft*, 1997, 77, 151-154.
142. Hofmann, K., *Nachweis der Tierart bei Fleisch und Fleischerzeugnissen*, 1. Mitteilung. *Fleischwirtschaft*, 1997, 77, 38-40.

143. Momcilovic, D., Rasooly, A., *Detection and Analysis of Animal Materials in Food and Feed*, *J. Food. Protect.*, 2000, 63, 1602-1609.
144. McCormick, R.J., Collins, D.A., Field, R.A., Moore, T.D., *Identification of Meat from Game and Domestic Species*, *J. Food Sci.*, 1992, 57, 516-520.
145. King, N.L., Kurth, L.J., *Analysis of Raw Beef Samples for Adulterant Meat Species by Enzyme-Staining of Isoelectric Focusing Gels*, *J. Food Sci.*, 1982, 47, 1608-1612.
146. Jemmi, T., Schlosser, H., *Tierartbestimmung aus mariniertem und erhitztem Fleisch mittels isoelektrischer Fokussierung*, *Fleischwirtschaft*, 1993, 73, 600-602.
147. Jemmi, T., Schlosser, H., *Tierartbestimmung bei erhitztem Fleisch von Haus- und Wildwiederkäuern mittels isoelektrischer Fokussierung*, *Fleischwirtschaft*, 1991, 71, 1191-1195.
148. Rehbein, H., *Electrophoretic Techniques for Species Identification of Fishery Products*, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 1990, 191, 1-10.
149. Ouchterlony, O., *Antigen-Antibody Reactions in Gels*, *Acta Pathol. Microbiol.*, 1949, 26, 507-515.
150. Unglaub, W., Müller, R., Jemmi, T., Stuker, G., *BSE-Prophylaxis. Heat Inactivation Proof of Meat-and-Bone Meal Prepared from By-Products of Food Processing Using the ELISA Principle*, *Fleischwirtschaft Int.*, 1999, 99, 34-37.
151. Hofmann, K., *Proof of Proper Heating at Meat-and-Bone Meal*, *Fleischwirtschaft*, 1996, 76, 1037-1039.
152. Meyer, R., Candrian, U., *PCR-Based DNA Analysis for the Identification and Characterization of Food Components*, *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, 1996, 29, 1-9.
153. Rüggeberg, H., Gaede, W., Tschirdewahn, B., Booke, A., Müller, M., *Tierartendifferenzierung bei gekochten Fleischproben - Ein methodischer Vergleich der PCR-Analyse, der DNA-Sonden-Technik und der isoelektrischen Fokussierung*, *Fleischwirtschaft*, 1997, 77, 732-734.
154. Ebbelhøj, K.F., Thomsen, P.D., *Differentiation of Closely Related Species by DNA Hybridization*, *Meat Sci.*, 1991, 30, 359-366.
155. Buntjer, J.B., Lamine, A., Haagsma, N., Lenstra, J.A., *Species Identification by Oligonucleotide Hybridization: The Influence of Processing of Meat Products*, *J. Sci. Food Agric.*, 1999, 79, 53-57.
156. Hunt, D.J., Parkes, H.C., Lumley, I.D., *Identification of the Species of Origin of Raw and Cooked Meat Products using Oligonucleotide Probes*, *Food Chem.*, 1997, 60, 437-442.
157. Chikuni, K., Ozutsumi, K., Koishikawa, T., Kato, S., *Species Identification of Cooked Meats by DNA Hybridization Assay*, *Meat Sci.*, 1990, 27, 119-128.
158. Calvo, J.H., Osta, R., Zaragoza, P., *Quantitative PCR Detection of Pork in Raw and Heated Ground Beef and Pâté*, *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50, 5265-5267.
159. Montiel-Sosa, J.F., Ruiz-Pesini, E., Montoya, J., Roncalés, P., López-Pérez, M.J., Pérez-Martos, A., *Direct and Highly Species-Specific Detection of Pork Meat and Fat in Meat Products by PCR Amplification of Mitochondrial DNA*, *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48, 2829-2832.
160. Bellagamba, F., Valfrè, F., Panseri, S., Moretti, V.M., *Polymerase Chain Reaction-Based Analysis to Detect Terrestrial Animal Protein in Fish Meal*, *J. Food Protect.*, 2003, 66, 682-685.
161. Rea, S., Chikuni, K., Branciarri, R., Sangamayya, R., Ranucci, D., Avellini, P., *Use of Duplex Polymerase Chain Reaction (Duplex-PCR) Technique to Identify Bovine and Water Buffalo Milk Used in Making Mozzarella Cheese*, *J. Dairy Res.*, 2001, 68, 689-698.
162. Matsunaga, T., Chikuni, K., Tanabe, R., Muroya, S., Shibata, K., Yamada, J., Shinmura, Y., *A Quick and Simple Method for the Identification of Meat Species and Meat Products by PCR Assay*, *Meat Sci.*, 1999, 51, 143-148.
163. Lahiff, S., Glennon, M., O'Brien, L., Lyng, J., Smith, T., Maher, M., Shilton, N., *Species-Specific PCR for the Identification of Bovine, Porcine and Chicken Species in Meat and Bone Meal (MBM)*, *Mol. Cel. Probe.*, 2001, 15, 27-35.

164. Quinteiro, J., Vidal, R., Izquierdo, M., Sotelo, C.G., Chapela, M.J., Pérez-Martín, R.I., Rehbein, H., Hold, G.L., Ruddell, V.J., Pryde, S.E., Rosa, C., Santos, A.T., Rey-Méndez, M., Identification of Hake Species (*Merluccius* Genus) Using Sequencing and PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA Control Region Sequences, *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49, 5108-5114.
165. Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Pääbo, S., Villablanca, F.X., Wilson, A.C., Dynamics of Mitochondrial DNA Evolution in Animals: Amplification and Sequencing with Conserved Primers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86, 6196-6200.
166. Vawter, L., Brown, W.M., Nuclear and Mitochondrial DNA Comparisons Reveal Extreme Rate Variation in the Molecular Clock, *Science*, 1986, 234, 194-196.
167. Chikuni, K., Tabata, T., Saito, M., Monma, M., Sequencing of Mitochondrial Cytochrome B Genes for the Identification of Meat Species, *Anim. Sci. Technol.*, 1994, 65, 571-579.
168. Irwin, D.M., Kocher, T.D., Wilson, A.C., Evolution of the Cytochrome B Gene of Mammals, *J. Mol. Evol.*, 1991, 32, 128-144.
169. Meyer, R., Höfelein, C., Lüthy, J., Candrian, U., Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis: A Simple Method for Species Identification in Food, *J. AOAC Int.*, 1995, 78, 1542-1551.
170. Burgener, M., Hübner, P., Mitochondrial DNA Enrichment for Species Identification and Evolutionary Analysis, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 1998, A 207, 261-263.
171. Bellagamba, F., Moretti, V.M., Comincini, S., Valfrè, F., Identification of Species in Animal Feedstuffs by Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Mitochondrial DNA, *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49, 3775-3781.
172. Beneke, B., Hagen, M., Eignung der PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) - Tierartennachweis in erhitzten Fleischerzeugnissen. *Fleischwirtschaft*, 1998, 78, 1016-1019.
173. Hold, G.L., Russell, V.J., Pryde, S.E., Rehbein, H., Quinteiro, J., Vidal, R., Rey-Méndez, M., Sotelo, C.G., Pérez-Martín, R.I., Santos, A.T., Rosa, C., Development of a DNA-Based Method Aimed at Identifying the Fish Species Present in Food Products, *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49, 1175-1179.
174. Wolf, C., Burgener, M., Hübner, P., Lüthy, J., PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA: Differentiation of Fish Species, *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, 2000, 33, 144-150.
175. Jeffreys, A.L., Brookfield, J. F. Y., Semeonoff, F.R., Positive Identification of an Immigration Test-Case Using Human DNA Fingerprints, *Nature*, 1985a, 317, 818-819.
176. Singh, L., DNA Profiling and its Applications, *Current science*, 1991, 60, 580-585.
177. Webber, J.L., May, P.E., Abundant Class of Human DNA Polymorphisms which can be Typed Using the Polymerase Chain Reaction, *American Journal of human genetics*, 1989, 44, 388-396.
178. Y. Nakamura, M. Leppert, P. O'Connell et al., Variable Number of Tandem Repeats (VNTR) Markers for Human Gene Mapping, *Science*, 1987, 235, 1616-1622.
179. Hohoff, C., Brinkmann, B., Beweisstück Mensch, Molekulargenetische Möglichkeiten und Eingriffsbefugnisse, LfD NRW, *Der gläserne Mensch*, 2003.
180. Pfeiffer, H., Brinkmann, B., Hühne, J., Rolf, B., Morris, A.A., Steighener, R., Holland, M.M., Forster, P., Expanding the Forensic German Mitochondrial DNA Control Region Database: Genetic Diversity as a Function of Sample Size and Microgeography, *Int. J. Legal. Med.*, 1999, 112, 291-298.
181. Parson, W., Pegoraro, K., Niederstätter, H., Föger, M., Steinlechner, M., Species Identification by Means of the Cytochrome B Gene, *Int. J. Legal. Med.*, 2000, 114, 23-28.
182. M. S. Taylor, A. Challed Spong, E. A. Johnson, Co-Amplification of the Amelogenin and HLA DQ Alpha Genes: Optimization and Validation, *J Forensic Sci.*, 1997, 42, 130-136.

183. Baechtel, F.S., Presley, K.W., Smerick, J.B., *D1S80 Typing of DNA from Simulated Forensic Specimens*, *J. Forensic Sci.*, 1995, 40, 536-545.
184. Cosso, S., Reynolds, R., *Validation of the AmpliFLP D1S80 PCR Amplification Kit for Forensic Casework Analysis According to TWGDAM Guidelines*, *J. Forensic Sci.*, 1995, 40, 424-434.
185. Sparkes, R., Kimpton, C., Watson, S., Oldroyd, N., Clayton, T., Barnett, L., Arnold, J., Thompson, C., Hale, R., Chapman, J., Urquhardt, A., Gill, P., *The Validation of a 7-Locus Multiplex STR Test for Use in Forensic Casework*, *Int J Legal Med*, 1996, 109, 186-194.
186. Espinoza, E.O., Mann, M.J., LeMay, J.P., Oakes, K.A., *A Method for Differentiating Modern from Ancient Proboscidean Ivory in Worked Objects*, *Current Research in the Pleistocene*, 1990, 7, 81-83.
187. Hagey, I.R., Crombie, D.L., Espinoza, E.O., Carey, M.C., Igimi, H., Hofmann, A.F., *Ursodeoxycholic Acids in the Ursidae: Biliary Bile Acids of Bears, Pandas and Related Carnivores*, *Journal of Lipid Research*, 1993, 34, 1911-1918.
188. Espinoza, E.O., Kirms, M.A., Filipek, M.S., *Identification and Quantitation of Source from Haemoglobin of Blood and Blood Mixtures by High Performance Chromatography*, *Journal of Forensic Science*, 1996, 5, 804-811.
189. Zehner, R., Zimmermann, S., Mebs, D., *RFLP and Sequence Analysis of the Cytochrome B Gene of Selected Animals and Man: Methodology and Forensic Application*, *Int. J. Legal. Med.*, 1998, 111, 323-327.
190. Verma, S.K., Singh, L., *Novel Universal Primers Establish Identity of an Enormous Number of Animal Species for Forensic Applications*, *Molecular Ecology Notes*, 2003, 3, 28-31.
191. Wallner, G., Ammann, R., Beiseker, W., *Optimizing Fluorescent in situ Hybridisation with rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes for Flow Cytometric Identification of Microorganisms*, *Cytometry*, 1993, 14, 136-143.
192. Levinson, G. S., Simpson, W. T., Curtis, W., *Electronic Spectra of Pyridocyanine Dyes with Assignments of Transitions*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, 79, 4313-4320.
193. West, W., Pearce, S., Grum, F., *Stereoisomerism in Cyanine Dyes - meso-Substituted Thiocarbocyanines*, *J. Phys. Chem.*, 1967, 71, 1316-1326.
194. Greene, T. W., Wuts, P. G. M., *Protective Groups in Organic Synthesis, Second Edition*, Wiley and Sons, New York, 1991.
195. Glass, J.D., in: *The Peptides*, Eds, Academic press, Orlando, Florida, 1987, Vol 9, 167-184.
196. Bodanszky, M., Klausener, Y. S., Ondetti, M. A., *Peptide Synthesis, Second Edition*, Wiley and Sons, New York, 1976.
197. Schiedel, M.-S., Briehn, C. A., Bäuerle, P., *Angew. Chem.*, 2001, 113, 4813-4816.
198. Bäuerle, P., Schiedel, M.-S., *Deutsche Patentanmeldung 10012962.5, 16.3.2000.*
199. *Literaturzusammenstellung bei H. A. Staab: Einführung in die theoretische organische Chemie*, Verlag Chemie, Weinheim, 1959.
200. Dai, Z., Peng, B., *Synthesis and Characterisation of Indocarbocyanines, Dyes and Pigments*, 1998, 36, 169-175.
201. Scheibe, G., Friedrich, H. J., Hohlneicher, G., *Oszillatorenstärken zur Bestimmung der sterischen Konfiguration von Polymethinfarbstoffen*, *Angew. Chem.*, 1961, 73, 383-388.
202. Reda, M., Abd, E.A., *The Synthesis of Some Bridgehead Heterocyclic Monomethine Cyanine Dyes*, *Dyes and Pigments*, 1998, 39, 267-280.
203. Noukakis, D., Van der Auweraer, M., Toppet, S., De Schryver, F., *Photophysics of a Thiocarbocyanine Dye in Organic Solvents*, *J. Phys. Chem.*, 1995, 99, 11860-11866.
204. West, W., Geddes, A. L., *The Effects of Solvents and Solid Substrates on the Visible Absorption Spectrum of Cyanine Dyes*, *J. Phys. Chem.*, 1964, 68, 837-847.
205. Rye, H. S., Glazer, A. N., *Interaction of Dimeric Intercalating Dyes with Single-Stranded DNA*, *Nucl. Acids res.*, 1995, 23, 1215-1222.

206. Rye, H. S., Yue, S., Wemmer, D. E., Quesada, M. A., Haugland, R. P., Mathies, R. A., Glazer, A. N., *Stable Fluorescent Complexes of Double-Stranded DNA with Bis-Intercalating Asymmetric Cyanine Dyes: Properties and Applications*, *Nucl. acids Res.*, 1992, 20, 2803-2812.
207. Netzel, T. L., Nafisi, K., Zhao, M., Lenhard, J. R., Johnson, I., *Base-Content Dependence of Emission Enhancements, Quantum Yields and Lifetimes for Cyanine Dyes Bound to Double-Strand DNA: Photophysical Properties of Monomeric and Bichromophoric DNA Stains*, *J. Phys. Chem.*, 1995, 99, 17936-17947.
208. Cheung, C.Y., Leung, W.Y., Yue, S., *Molecular Probes Inc. (USA), Modified Carbocyanine Dyes and their Conjugates*, Patentnr. WO0226891, 2002.
209. Haugland, R. P. et al., *Quantitative Comparison of Long-Wavelength Alexa Fluor Dyes to Cy Dyes: Fluorescence of the Dyes and their Bioconjugates*, *J. Histochem. Cytochem.*, 2003, 51, 1699-1712.
210. Cox, W. G., Beaudet, M. P., Agnew, J. Y., Ruth, J. L., *Alexa Fluor 555 and Alexa Fluor 647 Dyes Provide Higher Confidence than Cy3 and Cy5 Dyes in Determining Significant Differences in Gene Expression on Microarrays*, *Molecular Probes*, Presented at the Federation of American Studies for Experimental Biology, 2003, San Diego.
211. Nelson, B.P., Grimsrud, T.E., Liles, M.R., Goodman, R.M., Corn, R.M., *Surface Plasmon Resonance Imaging Measurements of DNA and RNA Hybridization Adsorption onto DNA Microarrays*, *Anal. Chem.*, 2001, 73, 1-7.
212. Bodrossy, L., Stralis-Pavese, N., Murrell, J.C., Radajewski, S., Weilharter, A., Sessitsch, A., *Development and Validation of a Diagnostic Microbial Microarray for Methanotrophs*, *Environ. Microbiol.*, 2003, 5, 566-582.
213. Cho, J.C., Tiedje, J.M., *Quantitative Detection of Microbial Genes by Using DNA Microarrays*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 68, 1425-1430.
214. Kai, E., Ikebukuro, K., Hoshina, S., Watanabe, H., Karube, I., *Detection of PCR Products of Escherichia Coli O157:H7 in Human Stool Samples Using Surface Plasmon Resonance (SPR)*, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2000, 29, 283-288.
215. Minunni, M., Tombelli, S., Mariotti, E., Mascini, M., *Biosensors as New Analytical Tool for Detection of Genetically Modified Organisms (GMOs)*, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 2001, 369, 589-593.
216. Loy, A., Lehner, A., Lee, N., Adamczyk, J., Meier, H., Ernst, J., Schleifer, K.H., Wagner, M., *Oligonucleotide Microarray for 16S rRNA Gene-Based Detection of all Recognized Lineages of Sulfate-Reducing Prokaryotes in the Environment*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 68, 5064-5081.
217. Wolf, C., Rentsch, J., Hübner, P., *PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA: A Reliable Method for Species Identification*, *J. Agric. Food. Chem.*, 1999, 47, 1350-1355.
218. Newton, C.R., Graham, A., *PCR - Reihe: Labor im Fokus. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1997.*
219. Pingoud, A., Urbanke, C., *Arbeitsmethoden der Biochemie, Walter de Gruyter, Berlin, 1997.*
220. Wolf, C., Rentsch, J., Hubner, P., *PCR-RFLP Analysis of Mitochondrial DNA: A Reliable Method for Species Identification, Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1999, 47, 1350-1355.*
221. Laube, I., Butschke, A., Zagon, J., Spiegelberg, A., Schauzu, M., Bögl, K.W., Kroh, L.W., Broll, H., *Nachweisverfahren für Rindfleisch in Lebensmitteln unter Anwendung der TaqMan™-Technologie, Bundesgesundheitsbl. - Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz, 2001, 44, 326-330.*
222. Kuhn, M., Mergemeier, S., *Congen Biotechnologies GmbH, German Patent Nr. DE10105056, 2002.*
223. Brunnert, H., *Quantitative Nachweismethoden für Proteine und DNA aus gentechnisch veränderten Organismen in Lebensmitteln, Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 2002.*

Die experimentellen Arbeiten wurden in der Zeit von Mai 2001 bis März 2004 am Lehrstuhl für Analytische Chemie des Instituts für Anorganische und Analytische Chemie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Karl Cammann angefertigt.

Bei Herrn Prof. Dr. Karl Camman bedanke ich mich für die interessante Aufgabenstellung und die Möglichkeit, mein Dissertationsthema frei zu gestalten.

Ein ganz herzlicher Dank gilt vor allem meinem Gruppenleiter Herrn Dr. Torsten Börchers. Seine ausserordentlich gute Betreuung der molekularbiologischen Arbeiten und die stete Diskussionsbereitschaft haben mir sehr geholfen. Bei den Mitarbeitern der Firma Denovo Biolabels, ganz besonders bei Herrn Dipl. Ing. Hans-Jürgen Hölpert, möchte ich mich für die Betreuung der organisch-synthetischen Arbeiten bedanken.

Weiterhin möchte ich mich herzlich beim gesamten Arbeitskreis Cammann und allen Mitarbeitern des ICB für das selbst in schwierigen Zeiten noch gute Arbeitsklima bedanken. Besonders bedanke ich mich bei Frau Silke Flotho, die mich in die kleinen und grossen Tipps und Tricks der Chipexperimente eingeweiht hat und bei Herrn Eric Frauendorfer, der stets bei allen Computerproblemen zur Stelle war. Ausserdem bedanke ich mich bei Frau Carolin Peter, Herrn Paul Kemper, Herrn Hermann von dem Bruch, Frau Shiela Srivastav und Herrn Hans-Jürgen Hölpert für die stets freundschaftliche Zusammenarbeit im Labor. Bei Herrn Uwe Gläsel, Herrn Stefan Degen und Frau Sabine Kipp möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bei der Organisation der Arbeitskreisfahrten bedanken.

Herrn Eric Frauendorfer danke ich für die Optimierung der Software *Exprimage*, die Entwicklung der Software *DNA-Chip* und die Entwicklung des Programmes zur Sondenentwicklung. Bei Herrn Prof. Dr. S. Grimme bedanke ich mich für die modellchemischen Berechnungen. Herrn Frank Wienhausen, Herrn Marco Schmitz und Herrn Jochen Uckelmann bin ich sehr dankbar für die Wartung und Optimierung des Biosensorsystems. Frau Dr. Brünen-Nieweler und ihren Mitarbeitern danke ich für die Bereitstellung der Referenz- und Realproben aus Lebensmittel. Gleichermassen bedanke ich mich bei Dr. Carsten Hohoff für die Realproben aus der Forensik. Dem Institut für funktionelle Genomik danke ich für die Möglichkeit den Array-Scanner zu benutzen. Bei den Abteilungen für Massen- und NMR-Spektroskopie des Fachbereichs Organische Chemie bedanke ich mich für die Aufnahme der Spektren.

Bei der Stiftung Stipendien-Fonds des Verbandes der Chemischen Industrie e.V. bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für die ideelle und materielle Unterstützung während des gesamten Studiums. Bei Herrn Dr. Jens Greving bedanke ich mich für seine Geduld und sein ständiges Verständnis. Danke dass du mich immer wieder ermutigt hast!

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Viola Petra Podsadlowski
Geburtsdatum/-ort: 05.02.1975 in Marl
Familienstand: ledig
Eltern: Manfred Podsadlowski
Erika Spriewald, geb. Kozig

Schul- und Berufsausbildung:

08/81 – 07/85 Harkort-Grundschule, Marl
08/85 – 07/91 Loekampgymnasium, Marl
09/1991 – 06/1994 Ausbildung zur Physikalaborantin, Hüls AG, Marl
08/94 – 06/95 Hans-Böckler Kollegschule, Marl
30.06.1995 Fachgebundene Hochschulreife (Fachabitur Chemie), Marl
13.06.1997 Allgemeine Hochschulreife (Abitur), Düsseldorf, Teilnahme an der Nichtschüler Abiturprüfung nach autodidaktischer Vorbereitung

Studium:

09/1995 – 01/2001 Studium Chemie und Grundstudium Chemieingenieurwesen an der Universität GH Essen
04.11.1997 Vordiplom im Studiengang Chemieingenieurwesen
05.03.1998 Vordiplom im Studiengang Chemie
04/1999 – 08/1999 Forschungsprojekt an der University of Reading, UK
24.01.2001 Diplom im Studiengang Chemie
seit 01.05.2001 Promotionsstudium an der WWU Münster;
Dissertation im Fach Analytische Chemie unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. K. Cammann (Institut für Anorganische und Analytische Chemie) am Institut für Chemo- und Biosensorik, Münster
10/01 – 10/03 Förderung durch ein Kekulé-Stipendium des FCI

Tätigkeiten:

06/1994 – 08/1994 Aufenthalt in einer Gastfamilie mit Kinderbetreuung in Rumson, N.J., USA
07/1995 – 08/1995 Praktikum beim Ingenieurbüro Sbresny, Marl und Nünchritz
05/1997 – 11/1998 Lehrerin im Nachhilfe- und Unterrichtsdienst Freytag, Ratingen
09/1997 – 02/1999 Studentische Hilfskraft an der Universität GH Essen
05/2001 – 09/2003 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Chemo- und Biosensorik GmbH, Münster
seit 05/2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Denovo Biolabels GmbH, Münster
seit 10/2003 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Anorganische und Analytische Chemie der WWU Münster

