

**Parallele, markierungsfreie Detektion biomolekularer
Wechselwirkungen an Mikroarrays**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2003

vorgelegt von
Alexander Jung

Tag der mündlichen Prüfung:	19. Dezember 2003
Dekan:	Prof. Dr. H. Probst
Erster Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Gauglitz
Zweiter Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Oberhammer

Danksagung

Ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. G. Gauglitz, der durch sein stetes Interesse an meiner Arbeit und die guten Arbeitsbedingungen wesentlich zu deren Gelingen beigetragen hat. Die von ihm zur Verfügung gestellten Möglichkeiten ebenso wie das mir entgegengebrachte Vertrauen bei der Übertragung von verantwortungsvollen Aufgaben weiß ich sehr zu schätzen.

Herrn Prof. Dr. H. Oberhammer danke ich für die Übernahme des Koreferats und sein Interesse an meiner Arbeit.

Besonderer und sehr herzlicher Dank gilt Frau Dr. Cornelia Hänel für Ihre stete Bereitschaft zur Diskussion und ihre wertvolle Unterstützung dieser Arbeit sowohl im persönlichen wie auch im inhaltlichen Bereich.

Dem Arbeitskreis Prof. Dr. Ernst Bayer†, namentlich Frau Petra Bongardt möchte ich für die Zusammenarbeit auf dem Gebiet der antisense-Oligonukleotide und die Überlassung derselben danken.

Den Projektpartnern im BMBF-Projekt Gensensorik, insbesondere Herrn Prof. Dr. D. Blohm und Herrn Dr. Rüdiger Benters danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit. Herrn Dipl.-Chem. Matthias Wegner möchte ich für sein Engagement im Projekt Gensensorik herzlich danken.

Frau Dr. Kerstin Kröger danke ich für unermüden Arbeitseinsatz in Sachen PNA-Wechselwirkungen sowie für Ihre gute Kooperation bei der gemeinsamen Forschung. Der Firma Applied Biosystems danke ich für die Überlassung von PNA-Oligonukleotiden.

Dem Graduiertenkolleg „Analytische Chemie“ danke ich für teilweise Förderung dieser Arbeit und zusätzliche interdisziplinäre Ausbildung und Kontakte.

Meinen vielen Mitstreitern im ständigen Einsatz für die Rechner-Infrastruktur des Instituts, Herrn Dr. Hans-Martin Haake, Herrn Dr. Martin Mehlmann und zahlreichen studentischen Hilfskräften danke ich für den nötigen Freiraum zur Fertigstellung dieser Arbeit.

Allen Kollegen des Institutes für Physikalische Chemie, des Arbeitskreises insbesondere aber der Biogruppe danke ich für das herzliche, von gegenseitiger Hilfsbereitschaft geprägte Arbeitsklima und die vielen, auch außerdienstlichen Aktivitäten. Letztendlich sind es die persönlichen Kontakte während der Zeit am Institut und der tägliche Spaß an der gemeinsamen Arbeit, die einem täglich eine neue Motivation und Inspiration sind.

Meinen Eltern möchte ich für stetes Interesse an der Fertigstellung dieser Arbeit danken.

Inhalt

INHALT	1
1 EINLEITUNG	1
1.1 Motivation der Arbeit	1
1.2 Zielsetzung und Gliederung der Arbeit.....	2
2 THEORETISCHER TEIL	5
2.1 Das menschliche Genom	5
2.2 Genomanalyse	6
2.2.1 DNA, Oligonukleotide	6
2.2.1.1 DNA-Struktur und Wechselwirkung.....	6
2.2.1.2 Antisense Oligonukleotide	8
2.2.1.3 PNA	10
2.2.2 Analytik auf Mikroarrays	12
2.2.3 Anwendungen von DNA Mikroarrays	14
2.2.4 Weitere Assayprinzipien basierend auf Mikroarrays	16
2.3 Detektionsmethoden	18
2.3.1 Optische Detektion	18
2.3.2 Biosensoren und markierungsfreie Detektionsmethoden	19
2.3.3 Reflektometrische Interferenzspektroskopie, RIfS	20
2.4 Affinitätsreaktionen an der Oberfläche	21
2.4.1 Parallele Detektion mit RIfS	23
2.4.2 Strategien zur Miniaturisierung.....	25
2.5 Oberflächen für Mikroarrays.....	26
2.5.1 Kovalente Immobilisierung von Oligonukleotiden auf Mikroarrays	27
2.5.2 Weitere Immobilisierungsmethoden.....	30
2.5.3 Immobilisierung von DNA-Oligonukleotiden auf RIfS-Mikroarrays.....	31
2.5.4 Ortsaufgelöste Immobilisierung	31

2.6	Kinetik, Thermodynamik.....	32
2.6.1	Statische Modelle.....	32
2.6.2	Kinetische Modelle für markierungsfreie Detektion	33
2.6.2.1	Modellbildung für die Auswertung homogener Kinetiken von Antigen-Antikörper Reaktionen.....	34
3	MATERIAL, GERÄTE UND METHODEN	38
3.1	Materialien.....	38
3.1.1	Chemikalien und Biochemikalien.....	38
3.1.2	Lösungen.....	38
3.2	Geräte.....	39
3.2.1	Microdrop-Anlage.....	39
3.2.2	Komponenten der RIFs Aufbauten	40
3.2.3	RIFs-Aufbau für homogene, kinetische Messungen.....	41
3.2.4	Paralleler RIFs-Aufbau („Demonstrator Null“).....	42
3.2.5	RIFs-Mikroarray-Aufbau	42
3.2.5.1	Optischer Aufbau	43
3.2.5.2	Kameraspezifikationen.....	46
3.3	Methoden	47
3.3.1	Assays, Protokolle.....	47
3.3.1.1	Vorbereitung von RIFs-Transducern	47
3.3.1.2	Immobilisierung von Liganden.....	48
3.3.2	Messabläufe, Software	49
3.3.2.1	Die Software "Screening"	49
3.3.2.2	Dunkelstrommessung.....	50
3.3.2.3	Integrationszeit.....	50
3.3.2.4	Messablauf	51
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	53
4.1	RIFs-Entwicklung für Mikroarrays	53
4.1.1	Technik des miniaturisierten RIFs-Auslesesystems.....	54
4.1.1.1	RIFs-Mikroarray Aufbau.....	54

4.1.1.2	Chipdesign und Spot-Erkennung.....	58
4.1.1.3	Charakterisierungsmessungen am parallelen RfS-Aufbau.....	59
4.1.1.4	Maskenerstellung an Mikroarrays	61
4.1.1.5	Leistungsfähigkeit des Detektionssystems	62
4.1.2	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen.....	63
4.2	Oberflächen für die markierungsfreie Detektion auf Mikroarrays	63
4.2.1	Haltbarkeit und Stabilität von immobilisierten Sonden	63
4.2.2	Immobilisierungsstrategien	64
4.2.2.1	PNA als immobilisierte Sonde	67
4.2.2.2	Ortsaufgelöste Immobilisierungstechniken	77
4.2.2.3	Nanoplotter zur ortsaufgelösten Immobilisierung.....	80
4.2.3	Fluidik und temperaturabhängige Messungen.....	81
4.2.3.1	Nachweisgrenzen im Durchfluss	81
4.2.3.2	Thermodynamische Untersuchungen an Rückgrat-modifizierten Antisense-Oligonukleotiden	82
4.2.3.3	Homogene kinetische Messungen	84
4.2.3.4	Temperaturabhängige Messungen.....	86
4.2.4	Charakterisierung des RfS-Mikroarray-Aufbaus	87
4.2.4.1	Parallele Messungen mit Antikörpern	87
4.2.4.2	Schlussfolgerungen.....	94
4.2.5	Parallele Hybridisierungsmessungen.....	95
4.2.5.1	RfS-Demonstrator – Multiplex Hybridisierung	95
4.2.5.2	Hybridisierungsmessung am RfS-Mikroarray-Aufbau	100
4.2.5.3	Zusammenfassung und Schlussfolgerung	103
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	104
5.1	Zusammenfassung	104
5.2	Ausblick	106
6	LITERATUR.....	109
7	ANHANG	123

7.1	Abkürzungen	123
7.2	Akademische Lehrer	124
7.3	Lebenslauf.....	125

1 Einleitung

1.1 Motivation der Arbeit

In der heutigen Zeit, der sogenannten Post-Genom Ära, befinden sich schier unüberschaubare Sequenzdaten in Datenbanken verschiedener Firmen und Projektkonsortien, die in unterschiedlicher Form geordnet und klassifiziert sind. Krankheitsrelevante genetische Ausprägungen, Verbindungen zwischen phänotypischen Ausprägungen und den zugehörigen Genen, Zielmoleküle für die pharmazeutische Wirkstoffforschung, Mutationsdatenbanken, speziessübergreifende Datenbanken etc. Außerdem finden immer mehr Sequenzinformationen pathogener und anderer Keime Eingang in öffentliche Datenbanken (inzwischen etwa 50.000). Die entsprechende Umsetzung dieser Sequenzinformationen in forschungs- und entwicklungsrelevante Daten erforderte im vergangenen Jahrzehnt die Entwicklung von Techniken, die der riesigen Datenflut gewachsen war, sogenannten Hochdurchsatz-Methoden (oder engl. HT=High Throughput). Daraus entwickelten sich Nachweismethoden, welche es ermöglichten, sehr viele genetische Daten gleichzeitig zu erfassen und hierfür die vorhandenen Sequenzinformationen zu nutzen. Hierzu wurden viele Sequenzen zur Hybridisierung auf planaren Trägern für die Analytik verfügbar gemacht. Diese sogenannte Mikroarray-Technologie erfordert neben der genauen Sequenzauswahl auch eine Markierung der verwendeten Proben mit Fluoreszenz oder Chemolumineszenz-Markern und daher eine vorangestellte Probenvorbereitung. Diese erfolgt heute fast ausschließlich mittels Polymerase-Kettenreaktion, englisch PCR.

Der breite Einsatz von Gensequenz-Informationen zur Analytik von Nahrungsmitteln und Getränken oder die Kontrolle von Abwässern ist als potentielles Anwendungsgebiet aus diesen Forschungen heraus möglich geworden. Allerdings sind die Systeme, die auf die Analytik des menschlichen oder anderen Genomen abzielt nicht direkt geeignet, auch diese Aufgaben zu erfüllen. Nicht zuletzt die Kosten für analytische Anwendungen in der Industrie, die verglichen mit der Forschung im klinischen Bereich wesentlich geringer sein müssen, führt zur Notwendigkeit, neue Analysenverfahren zu entwickeln.

Das BMBF Verbundprojekt Gensensorik des BMBF hat es sich daher zur Aufgabe gemacht, die zur Verfügung stehenden Sequenzdaten (beispielsweise von Mikroorganismen) in analytisch verwertbare Form zu bringen und sie der Analytik dadurch zugänglich zu machen. Ein sogenannter "Gensensor" soll dabei die Aufgabe übernehmen, ebenso in der Lebensmittelindustrie für die Detektion pathogener Keime, als auch im Umweltanalytiklabor

oder in der Forensik (meist DNA-Analyse zur Identifizierung) eingesetzt werden zu können. Grundlage einer solchen Gensensor-Technologie sind sogenannte low-density Mikroarrays, die nicht mehr als ca. 1000 Sequenzen zur Analytik bereithalten. Für die Umsetzung sind in dem Projekt Arbeitsgruppen beschäftigt, die sich mit den molekularbiologischen Hintergrund, die Datenverarbeitung und Auswertung und den technischen Rahmenbedingungen auseinandersetzen. Ziel ist es, eine genomische Analyse von der Sequenzauswahl bis zum quantitativen analytischen Ergebnis zu demonstrieren.

Das Teilprojekt, das Gegenstand dieser Arbeit ist, beschäftigt sich dabei mit der geeigneten Detektionsmethode für die Gensensor-Technologie. Eine Hauptanforderung an einen solchen Detektor ist dabei die markierungsfreie Detektion, da in der Regel mit Proben gearbeitet werden muss, die direkt ohne weitere Umsetzung zur Analytik gebracht werden müssen. Der Informationsgehalt einer solchen Gensensormessung wird durch viele Teilkomponenten des Systems bestimmt, maßgeblich sind jedoch die Quantifizierung und Charakterisierung der Wechselwirkungsdaten im Detektor. Die genannten Anforderungen an ein solches Detektionssystem in Kombination mit hoher Parallelität und Automatisierbarkeit führt zu der Überlegung, einen markierungsfreien, optischen Biosensor für diese Aufgabe einzusetzen.

1.2 Zielsetzung und Gliederung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Informationstiefe eines Biosensor-Experiments bezüglich der genauen Charakterisierung einer biomolekularen Wechselwirkung mit einer hohen Parallelität zu verbinden. Im Hinblick auf die Ziele des Verbundprojektes Sensorik stand die Entwicklung von Mikroarrays zur Wechselwirkungsanalytik mittels eines Biosensors im Mittelpunkt der Arbeit.

In zahlreichen vorangegangenen Arbeiten werden Mikroarray Experimente allein statisch, das heißt durch Endpunktbestimmung einer Reaktion (Fluoreszenzintensität, Chemolumineszenz) durchgeführt. Die Biosensor-Technologie fehlt es dagegen nicht am Informationsgehalt der Messung sondern vielmehr an Parallelität. Am Markt befindliche kommerzielle Geräte wie z.B. das Biacore 3000¹ sind bisher z.B. auf maximal 8 Kanäle beschränkt. Auch dort sind Bestrebungen im Gange, diese Einschränkung zu überwinden und durch bildgebende Verfahren eine höhere Parallelität der Messungen zu erreichen.

Zur Erreichung des Ziels in dieser Arbeit war dagegen die Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIFS) der Ausgangspunkt. Diese direkt optische

¹ <http://www.biacore.com>

Biosensortechnologie eignet sich für eine Parallelisierung durch seine spezifischen Eigenschaften besonders. Weiterhin konnte dies bereits in einem anderen BMBF-Verbund (Librarian II) auf einem Mikrotiterplatten-Aufbau gezeigt werden. In dieser Arbeit sollten nun einerseits verschiedene Teilaspekte der Minaturisierung und Parallelisierung von optischen Biosensorexperimenten anhand von RIfS untersucht und andererseits musste die Biosensortechnologie selbst einen Schritt in Richtung Detektion auf Mikroarrays vorangebracht werden. Im einzelnen fielen dabei die folgenden Teilaufgaben an, die im Rahmen dieser Arbeit behandelt wurden.

- Ein Laboraufbau eines Gerätes zur parallelen markierungsfreien Detektion sollte auf die Anforderungen eines Mikroarray Experiments umgerüstet werden. Dabei waren die Charakterisierung des optischen Aufbaus und das experimentelle Evaluieren der Limitierungen dieses Aufbaus erforderlich.
- Außerdem musste die Oberflächenchemie in Kombination mit einer Methode zur orts aufgelösten Immobilisierung für die Tauglichkeit für Mikroarrays weiterentwickelt und getestet werden. Hier standen vor allem die Charakterisierung und Optimierung der Oberflächenchemie hinsichtlich ihrer Langzeitstabilität und Bindungskapazität im Vordergrund. Auch die Auswahl geeigneter Sonden und der Vergleich mit DNA-Sonden wurde bearbeitet.
- Die bisherigen Kapazitäten der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie für die Analyse von Hybridisierungsvorgängen an Oberflächen sollten erweitert werden, um den höheren Anforderungen von zeitaufgelösten und temperaturabhängigen Hybridisierungsmessungen zu genügen. Beispielhaft wurden dazu in dieser Arbeit Verfahren überprüft um Affinität und Kinetik von Bindungsvorgängen auch in homogener Phase zu bestimmen. Eingesetzt wurden dafür als Modellsysteme Oligonukleotide, die eine Rolle in der Antisense-Forschung spielen und dazu bestimmten Modifikationen unterworfen wurden.
- In der Gensensorik ist es notwendig, Hybridisierungsmessungen durch Temperaturveränderungen zu verifizieren. Hierzu sollte im Rahmen dieser Arbeit durch Thermostatisierung der RIfS-Messzellen eine Lösung erarbeitet werden.
- Die Machbarkeit von Hybridisierungsexperimenten auf einem parallelen RIfS-Aufbau und Erkennung der erforderlichen Maßnahmen zur Miniaturisierung des Probenträgers wird schrittweise durch Vergleichsmessungen an bereits existierenden Aufbauten gezeigt. Der miniaturisierte Aufbau wird durch Vergleichsmessungen mit Antikörpern charakterisiert. Damit soll gleichzeitig auch eine Eignung der

Mikroarray-Messungen für weiterführende Anwendungen, wie Proteinarrays demonstriert werden.

- Schließlich sollen zeitaufgelöst, auf dem umgebauten und charakterisierten RfS-Aufbau, Hybridisierungsvorgänge auf einem DNA-Mikroarray detektiert werden, um die Tauglichkeit dieses Aufbaus für den Einsatz in einem Gensensor-Experiment nachzuweisen.

2 Theoretischer Teil

2.1 *Das menschliche Genom*

Die Entschlüsselung des menschlichen Genoms, vor wenigen Jahren noch in weiter Ferne vermutet, ist durch einen industriellen Ansatz der Sequenzierung schneller abgeschlossen geworden, als vorhergesagt wurde. Zwei vorläufige Annotationen wurden im Februar 2001 zeitgleich von Nature und Science publiziert [The Genome International Sequencing Consortium, 2001], [Venter et. al., 2001]. Nun steht die Forschung also vor der riesigen Datenmenge der drei Milliarden Basenpaare umfassenden Sequenz des menschlichen Genoms und damit trotzdem erst am Anfang der Nutzung dieses Wissens. Die Entschlüsselung weiterer Genome von Mäusen, Affen und anderen Säugetieren zeigt zunächst einmal auf, dass große Teile des menschlichen Genoms mit dem dieser Tiere übereinstimmt. Eine zweite ebenso fundamentale wie offensichtliche Erkenntnis besteht darin, dass nicht alle menschlichen Genome gleich sind, es also interindividuelle Unterschiede gibt.

Die jetzt nachfolgende Nutzbarmachung der Genomdaten für die pharmazeutische und medizinische Forschung wird der Medizin, in diesem Falle der molekularen Medizin, den größten Fortschritt bescheren, den es je gab. Allein die Sequenz des menschlichen Genoms, bestehend aus ca. 3 Milliarden Basenpaaren, lässt sich jedoch nicht direkt verwerten. Es bedarf vielmehr einer funktionellen Zuordnung der annotierten Gene, einer Erkennung individueller Unterschiede und einer Erforschung krankheitsrelevanter Teilbereiche des Genoms. Beispielsweise existieren ca. bei jeder 1000. Base Unterschiede zwischen Individuen, sogenannte Punktmutationen oder SNPs (single nucleotide polymorphisms), insgesamt also ca. 3 Millionen. Von nur sehr wenigen bekannten Mutationen ist jedoch eine phänotypischer Bezug bekannt, also beispielsweise eine Krankheit. Ein Beispiel ist die Mucoviszidose (cystische Fibrose), die nachweislich auf die Veränderung nur einer einzigen Base in einer Genregion des Genoms beruht. Jedoch lassen sich aus sogenannten konserviert vererbten Teilbereichen des Genoms, den sogenannten Haplotypen, trotzdem Rückschlüsse auf einen Krankheitsbezug ziehen. In der Konsequenz dieser Erkenntnisse wird es in nächster Zukunft verstärkt Studien geben, die versuchen werden, genomweit möglichst alle Mutationen zu untersuchen, um mögliche Assoziationen zu Krankheiten oder bestimmten phänotypischen Ausprägungen zu erkennen, um dann nicht zuletzt ein neues Zielmolekül für eine mögliche Therapie zu finden.

2.2 Genomanalyse

Mit der Sequenzierung des menschlichen Genoms, sowie der Genome einiger anderer Organismen wie Maus, Ratte, aber auch Modellorganismen wie *Drosophila Melanogaster* und *Saccaromyces Cervisiae*, werden der Forschung Werkzeuge an die Hand gegeben, die eine globale Analyse der Funktion von Genen erlauben [The Genome International Sequencing Consortium, 2001], [Venter et. al., 2001]. Nun muss unter Nutzung modernster Methoden eine Funktionsanalyse dieser Daten durchgeführt werden. Dies erfolgt meist durch eine multiparallele Analyse der Genexpression, indem die Konzentrationswerte der mRNA in bestimmten Geweben oder Zellen bestimmt und mit denjenigen anderer, beispielsweise gesunder Zellen verglichen werden [Evans 2000], [Genome Prospecting, Science 1999], [Schneider et al. 1996].

Diese Analysenmethode, vielfach subsummiert unter dem Begriff „Genomics“, betrachtet die Gesamtheit aller Gene eines Gewebes bzw. einer Zelle zu folgenden Zwecken:

- Erkennung oder Auffinden spezifischer Genexpressionsmuster zur Unterscheidung von erkranktem und gesundem Gewebe, respektive der Auffindung krankheitsassoziiierter Gene.
- Aufklärung der Beteiligung bestimmter Gene an bestimmten Krankheitsverläufen oder anderen Phänotypen
- Unterscheidung von kranken und gesunden Geweben/ Zellen.
- Zuordnung der interindividuellen Unterschiede der Menschen zu einem Mutationsmuster (Genotyp-Phänotyp Assoziation).
- Erkennung des jeweiligen Organismus anhand seines Genoms (Hefen, Pilze, HI-Virus, pathogene Keime wie Legionellen, o.ä., in jüngerer Zeit auch von Pflanzen)

Als Ergebnis einer Genexpressionsanalyse erhält man i.d.R. Aussagen über differenziell exprimierte Gene, d.h. über unterschiedliche Konzentrationen an mRNA in den verglichenen Proben. Diese Gene dienen dann als Grundlage für weitere Erforschung der zellulären Vorgänge, oder werden zum Teil auch als Marker-Gene für die untersuchte Krankheit eingesetzt.

2.2.1 DNA, Oligonukleotide

2.2.1.1 DNA-Struktur und Wechselwirkung

Die genomische DNA, die in den frühen zwanziger Jahren des 20. Jahrhunderts als Träger der Erbinformation von Lebewesen, also als Baustoff der sog. Gene erkannt wurde, besteht aus

einer langen Polymerkette, gebildet aus vier verschiedenen, chemisch ähnlichen Untereinheiten, den sogenannten DNA-Basen. Watson und Crick schlossen 1953 aufgrund von vorher publizierten Röntgenstrukturdaten und der damals schon bekannten Tatsache, dass die DNA doppelsträngig vorliegt, auf die heute allgemein anerkannte Struktur der DNA, einer gegenläufigen Doppelhelix. Diese kommt in verschiedenen Ausprägungen, der A, B und Z-Form vor, wobei die B-Form die bei weitem vorherrschende Struktur darstellt.

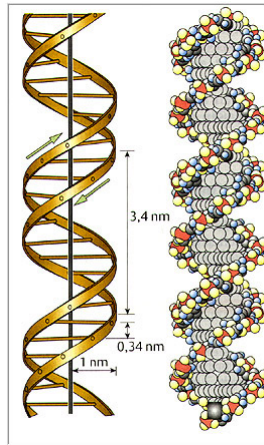


Abbildung 1 B-Form der DNA. Die gegenläufige, doppelhelikale Struktur wurde 1953 durch Watson und Crick auf der Basis von Vorarbeiten ausgearbeitet.

Chemisch gesehen besteht die DNA aus einer polymeren Kette von aneinandergereihten Zuckerphosphatresten (Desoxyribose-Phosphat) an die jeweils entweder Purinbasen (Adenin, Guanin) oder Pyrimidinbasen (Cytosin, Thymin) gebunden sind. Die Wechselwirkung zwischen den gegenläufig verlaufenden Stränge beruht auf Wasserstoffbrückenbindungen zwischen diesen Basen. Dabei sind zwischen Adenin und Thymin zwei und zwischen Cytosin und Guanin drei solcher Wasserstoffbrückenbindungen möglich. Letztere Wechselwirkung trägt deshalb einen etwa 50% größeren Anteil zur Stabilität der Doppelhelix (also der sogenannten DNA-DNA Wechselwirkung) bei als die erstere [Alberts 1995, Mol. Biol. d. Zelle]. Der Vorgang der Trennung von DNA-Doppelsträngen wird im allgemeinen als Schmelzen bezeichnet, was von der Analytik der Stärke der DNA-DNA-Wechselwirkung herrührt. Verschieden lange DNA-Fragmente haben unterschiedliche "Schmelztemperaturen" aufgrund ihrer unterschiedlichen Affinität. Das Schmelzen lässt sich im UV-Spektrometer beobachten; man erkennt am „Schmelzpunkt“ einen schlagartigen Anstieg der Extinktion. Den umgekehrten Vorgang, das „Zusammengehen“ zweier komplementärer DNA-Fragmente zu einer Doppelhelix nennt man Hybridisierung. Die Stärke und Geschwindigkeit der Hybridisierung ist von der Sequenz, der Länge der Teilstücke der DNA sowie von äußeren

Faktoren wie Temperatur und Salzkonzentration abhängig. Dies alles muss bei Hybridisierungsexperimenten mit DNA oder DNA-Oligonukleotiden zu analytischen Zwecken beachtet werden.

Folgende Abbildung zeigt schematisch die Wechselwirkung zwischen den DNA-Basen.

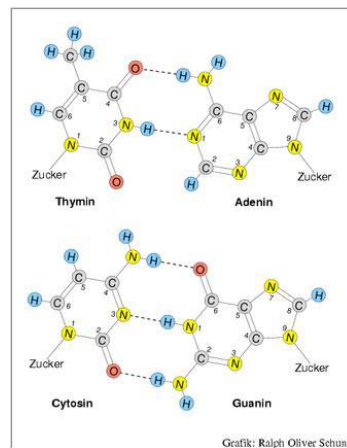


Abbildung 2 Basenpaarung in der DNA-Doppelhelix.²

In jüngerer Zeit konnten DNA-Fadenmoleküle sogar mit AFM auf Glimmeroberflächen direkt betrachtet werden. Siehe zum Beispiel [Yong-Ye 2000]. Auch heute noch beschäftigt die Strukturvielfalt von DNA die Wissenschaftler und neueste Erkenntnisse zu Überstrukturen wie Triplexbildung oder auch Erkenntnisse zur Selbstorganisation bestimmter DNA-Sequenzen zu komplexen Strukturen werden noch gewonnen [La Bean 2000].

2.2.1.2 Antisense Oligonukleotide

Für den Einsatz von DNA-Oligonukleotiden in der Krebstherapie werden verschiedene Ansätze verfolgt, die auf der Wirkung der Oligonukleotide auf die Genexpression auf der Ebene der mRNA beruhen. Die Hybridisierung des Oligonukleotids an den sog. sense-Sequenz der mRNA gibt dem Ansatz den Namen „Antisense-Technik“. Chemische Forschungsansätze, welche diese Strategie unterstützen und die lokale Verfügbarkeit des Oligonukleotids in der Zelle erhöhen sollen dienen der Verbesserung/Optimierung der Affinität zu Zielsequenz, der Verbesserung der Zellgängigkeit und der Erhöhung der metabolischen Stabilität der Oligonukleotide [Mateeva 1998], [Mizuta 1999].

² Beide Abbildungen von <http://www.drd.de/helmich/bio/gen/reihe2/> mit Herkunftsnachweis genehmigt.

Für die Entstehung eines Proteins wird die DNA "abgelesen", d.h. transkribiert. Dabei wird sie in mRNA umgeschrieben. Im darauffolgenden Schritt entsteht am Ribosom das entsprechende Protein.

Zu bestimmten therapeutischen Zwecken soll auf der Ebene der Transkription und Translation der DNA gezielt, d.h. sequenzspezifisch eingegriffen werden. Hierzu gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten. Bei der sogenannten Antigen-Strategie wird die Transkription also das Ablesen eines Gens durch die Bildung einer Tripelhelix verhindert [Thuong und Helene 1993]. Die Triplexbildung erfolgt dabei mit einem Oligonukleotid an der Doppelstrang-DNA [Krebsmedizin, Spektrum d. Wissenschaft, 1996]. Bei der Antisense-Strategie gilt es dagegen, die mRNA nach der Transkription durch Hybridisierung mit einem Oligonukleotid zu blockieren und so deren Übersetzung in ein Protein am Ribosom zu verhindern. Die Konzentration dieses bestimmten Proteins in der Zelle soll dadurch gesenkt werden. Der zusätzliche Effekt ist die Erkennung von freier, hybridisierter mRNA in der Zelle durch das Enzym RNase-H, die den Doppelstrang dann hydrolytisch spaltet. Erstmals wurde die Therapie mit sogenannten Antisense-Oligonukleotiden von Stephenson und Zamenic bereits vor über 20 Jahren getestet [Zamenic 1978]

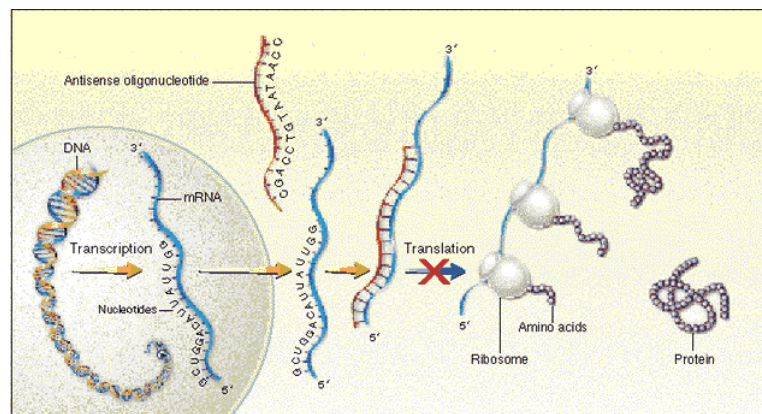


Abbildung 3 Das Antisense Prinzip (aus facts about life, lifescience.de)

Die Auswahl von Oligonukleotiden, die für eine Antisense Therapie in Frage kommen unterliegt bestimmten Auswahlkriterien, die einerseits die molekulare Wechselwirkung in der Zelle andererseits die Bioverfügbarkeit des potentiellen Wirkstoffs betreffen.

Ersteres bestimmt hauptsächlich die Sequenzauswahl, d.h. die möglichst gezielte Ausschaltung des entsprechenden Gens. Hierbei wird mindestens ein 17mer-Oligonukleotid notwendig sein, um die Wahrscheinlichkeit einer Kreuzreaktivität und damit einer unerwünschten Nebenwirkung so gering wie möglich zu halten. Statistisch gesehen kommt eine Sequenz aus 17 Basen nur einmal im gesamten menschlichen Genom vor. Die

Hybridisierung zur mRNA muss dabei optimal sein und kann möglicherweise durch chemische Modifikation der eingesetzten Oligonukleotide noch verstärkt werden. Diese chemischen Modifikationen sind daher Gegenstand intensiver Forschung und dokumentiert beispielsweise durch [Uhlmann 1995].

Die Bioverfügbarkeit des Antisense-Wirkstoffes wird durch zwei Faktoren bestimmt. Erstens die Zellgängigkeit und zweitens die Abbaurate des Wirkstoffes in der Zelle. Beides kann durch chemische Modifikation der eingesetzten Sequenzen beeinflusst werden. Während die Zellgängigkeit z.B. durch hydrophobe 3'- oder 5'-Modifikationen verbessert werden kann, wird der Nukleaseangriff z.B. durch eine Rückgrat-Modifikation zum Thioat oder Dithioat entscheidend verhindert. Auch der Einsatz künstlicher DNA-Analoga, wie z.B. PNA (siehe Kapitel 2.2.1.3) ist hierbei erfolgversprechend.

Da Modifikationen gleich welcher Art sich auf die Hybridisierung des Antisense-Oligonukleotids auswirken können, ist es notwendig, diese Einflüsse in-vitro zu testen.

2.2.1.3 PNA

Eine Peptid-Nukleinsäure, sog. PNA (peptide nucleic acid) ist ein DNA-analoges Molekül, in dem eine N-(2-aminoethyl)glycin-Struktur die normale Zucker-Phosphat-Struktur des Rückgrats der DNA ersetzt. Dadurch erhält sie einzigartige chemische und physikalisch-chemische Eigenschaften, insbesondere eine hohe chemische und biologische Stabilität bei gleichzeitigem Erhalt der spezifischen Affinität zu komplementären Nukleinsäuren. Diese chimären Moleküle wurden zu Beginn der 90er Jahre von Prof. Peter Nielsen erstmals synthetisiert und in der Folge von der Firma Boston Probes kommerziell hergestellt und vertrieben [Nielsen et. al, 1991 und Egholm et. al. 1993]. Die Synthese der PNA lässt sich analog der Peptidsynthese an der festen Phase mit herkömmlicher Fmoc- oder Boc-Schutzgruppenchemie ausführen und ist auch für Standard-Peptidsynthesizer geeignet. Abbildung 4 zeigt die Struktur von PNA im Vergleich mit DNA.

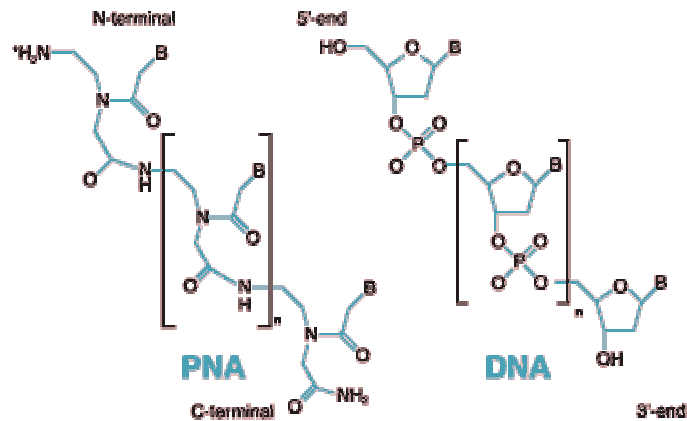


Abbildung 4 Struktur von Peptid-Nukleinsäuren im Vergleich zu DNA. B steht für die Basen Thymin, Adenin, Guanin und Cytosin.

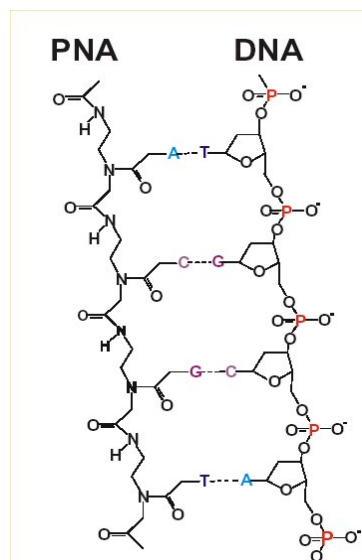


Abbildung 5 Hybridisierung von PNA- und DNA-Einzelsträngen zu einem Doppelstrang.

Die Eigenschaft zur Hybridisierung mit natürlichen Nukleinsäuresequenzen ist trotz völlig verändertem Rückgrat gegeben, wie dies in Abbildung 5 schematisch gezeigt ist. Die gegenüber DNA erhöhte Affinität bei der gleichen Anzahl von komplementären Basenpaaren ist auf die Eigenschaft des höheren T_M Wertes zurückzuführen. (Bei DNA-DNA Hybridisierung wird häufig nicht von einer Gleichgewichtsreaktion gesprochen, da durch die Länge der Ketten natürlicher Erbsubstanz die Gesamtreaktion nicht auf zwei einzelne Moleküle, sondern nur auf ein einziges Makromolekül zurückgeführt werden kann. Dafür wird der Begriff des Schmelzpunktes, T_M , eingeführt. Das ist die Temperatur, bei der sich die Doppelstränge in Einzelstränge trennen, wenn die DNA erwärmt wird. Demgegenüber ist die Betrachtungsweise der Hybridisierung als einer bimolekularen Reaktion bei kurzen

Oligonukleotiden durchaus angemessen und deshalb auch die Einführung einer Affinität als sinnvoll anzusehen.)

Die Eigenschaften des ungeladenen Rückgrats der PNA, lassen diese auch für Bindungsstudien mit Proteinen interessant erscheinen, da unspezifische Wechselwirkungen, die nur auf elektrostatische Kräfte zurückgehen und nicht auf eine "biomolekulare Erkennung" solche Analysen insbesondere bei bestimmten, d.h. basischen, pH Werten erschweren.

PNA besitzt neben der bereits erwähnten erhöhten Affinität zur Zielsequenz bei gleicher Sequenzlänge eine hohe Stabilität gegenüber Nukleasen, da sie von diesen Enzymen häufig erkannt wird [Schwarz et. al. 1999]. Die gegenüber natürlichen Oligonukleotiden verringerte Löslichkeit in Wasser schlägt dabei allerdings bei der Strategieentwicklung für die Immobilisierung zunächst als Nachteil zu Buche [Loakes 2001], [Lohse 1999].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden PNA-Oligonukleotide als Fängermoleküle auf Oberflächen immobilisiert und eingesetzt, um die jeweilige Stabilität und Spezifität dieser Oberflächen zu optimieren. Die Verwendung der PNA als Sonde auf DNA (PNA) Mikroarrays wurde erstmals von Hoheisel et. al. beschrieben und nutzt den Vorteil der PNA eine höhere Affinität (oder einen niedrigeren T_m) zu normalen DNA-Oligonukleotiden zu besitzen und damit die Diskriminierung von Mutationen technisch zu vereinfachen. In Kombination mit in-situ Synthese der PNA Oligonukleotide auf dem Array steht damit eine leistungsfähige Alternative zu herkömmlich erzeugten DNA-Arrays zur Verfügung. Nicht zuletzt sind patentrechtliche Aspekte als Triebfeder dieser Entwicklungen dabei von nicht geringer Bedeutung.

Der Einsatz von PNA-Sonden zur Antisense-Therapie ist dagegen weiterhin umstritten. Löst die PNA das Problem der Bioverfügbarkeit unter dem Aspekt der besseren Zellgängigkeit und der besseren Stabilität gegen enzymatischen Abbau, so wird dieser positive Effekt durch die sehr viel schlechtere Löslichkeit des Moleküls vermutlich überkompensiert. Ebenso wie mit herkömmlicher Antisense-Technologie sind daher auch mit PNA-Sonden noch keine durchschlagenden Therapieerfolge erzielt worden.

2.2.2 Analytik auf Mikroarrays

Vielfach unter dem Stichwort DNA-Chiptechnologie besprochen wird eine sich seit den 90er Jahren rasant verbreitende Idee, oberflächengebundene analytische Tests auf planaren Trägern in hoher Zahl gleichzeitig durchzuführen. Letztlich handelt es sich, trotz des naheliegenden Analogieschlusses zur Computerwelt aber bei den biochemischen Analysensystemen (noch)

nicht um in diesem Maße hochintegrierte Bauteile, wie es z.B. Transistoren in einem Intel-Chip sind. Daher ist der Ausdruck Mikroarray, der eine gitterartige Anordnung von Sonden auf einer Oberfläche beschreibt, in diesem Fall vorzuziehen.

Unter DNA-Mikroarraytechnologie versteht man die Anordnung von Sonden auf einer Oberfläche zum Nachweis der Genaktivität durch Hybridisierung mit Probenmaterial aus Geweben. Aus der Anzahl von regulierten Genen beim Menschen von ca. 30.000 - 35.000 ergibt sich die Notwendigkeit für alle diese Gene (mindestens) eine Sonde bereitzustellen. Die Dichte solcher Arrays liegt im Bereich von einigen wenigen bis etwa hundert Mikrometern Abstand zwischen den Sonden, je nach Herstellungsverfahren (vergleiche die Dichte von Transistoren auf einem Intel Pentium Chip von etwa 0,15 μm oder kleiner).

Die Möglichkeit, mit einem solchen Array die Gesamtheit aller Gene erfassen zu können, beschleunigt die Arbeit heutiger Molekularbiologen um ein Vielfaches. Die seit Mitte der neunziger Jahre laufenden Anstrengungen sind rückblickend in [Ramsay 1997] aufgeführt, Aspekte der Kommerzialisierung der DNA-Mikroarray-Technologie sind in [Marshall 1998] übersichtlich zusammengefasst.

Trotzdem sind technische Limitierungen auch noch bei heutigen Mikroarray-Experimenten nicht von der Hand zu weisen. Z.B. lassen sich die meisten regulativen und daher nur gering exprimierten Gene nur dadurch nachweisen, dass die Proben-RNA vorher einer Amplifikation durch PCR unterworfen wird. Die so gewonnenen Proben sind allerdings einer quantitative Auswertung aufgrund der Charakteristik der PCR Amplifikation nur noch bedingt zugänglich [Blohm 2000].

Auch detektionsseitig, wie später besprochen (2.3.2), sowie in der Datenauswertung, finden sich in der heutigen Mikroarray-Technologie viele Limitierungen und Verbesserungsmöglichkeiten. Eine völlig neue Disziplin der Biologie, die Bioinformatik, muss sich nun mit den vorher nicht vorhandenen Problemen der großen Probenzahlen und Messdaten widmen [Mills 2001].

Der Probenaufgabe auf Mikroarrays wurde ebenfalls längere Zeit wenig Beachtung geschenkt, dabei ist die Hybridisierungseffizienz bei einem solchen Experiment davon sehr stark abhängig. Ansätze zur Kombination mit Mikrofluidik sind daher naheliegend, wie z.B. in [Sanders and Manz 2000] ausgeführt wird.

Genomik-Experimente auf Mikroarrays haben sich aufgrund ihrer spezifischen Vorteile schnell zu einem Quasi-Standard in der molekularbiologischen und klinischen Forschung entwickelt. Im Einzelnen können diese durch folgende Vorteile charakterisiert werden: Mikroarrays ermöglichen einen hohen Durchsatz bei relativ geringen Kosten pro Experiment,

die Experimente sind zumindest teilweise und vergleichend quantifizierbar (Genexpressionslevel von ca. 1:5), sie resultieren in einer sehr großen Informationsbreite durch eine hohe Dichte der Probenpositionen auf den Arrays (z.B: alle Gene einer Spezies repräsentiert auf einem Mikroarray) und durch Wiederholungs- und Vergleichsexperimente auf einem Array erhält man auch eine große Informationstiefe. Weiterhin sind im Vergleich mit zellbasierten Assays oder Gelelektrophorese mehr und qualitativ bessere Aussagen möglich, wobei nicht zuletzt die kleinen Probenmengen, welche für ein Array-Experiment benötigt werden, eine Lösung des verbreiteten Problems der begrenzten Probenmenge in der klinischen Forschung bieten.

2.2.3 Anwendungen von DNA Mikroarrays

Die Vielfalt der Testverfahren auf Mikroarrays ist im Genombereich einteilbar in die Kategorien Sequenzierung, Genexpressionsanalyse und Mutationsanalyse. Allen Testverfahren ist gemeinsam, dass durch die große Zahl verfügbarer genomischer Information eine hohe Parallelität der Analysen von entscheidender Bedeutung ist. Als Beispiel sei hier eine Mutationsstudie angeführt, bei der 1000 Individuen möglichst genomweit auf ca. 200.000 Mutationen vergleichend untersucht werden sollen. Alleine diese Studie würde nach heutigen Standards (ca. 50.000 SNPs pro Tag möglich) bereits mehrere Jahre dauern.

Im folgenden sind die wichtigsten Charakteristika der angeführten Untersuchungsmethoden beschrieben:

Bei der *Genidentifizierung/-sequenzierung* geht es um die Entdeckung unbekannter Gene und ihrer potentiellen Funktion und die Sequenzierung neuer Genome verschiedener Spezies. Auch für die Identifikation von Geweben bzw. Spezies anhand ihrer genomischen Sequenzinformation wird Sequenzierung teilweise eingesetzt [Stomakhin 2000], [Lindroos 2001].

Die *Genexpressionsanalyse* ermöglicht die Feststellung des Genexpressionsstatus einer Zelle oder eines Gewebes auf mRNA Ebene. Die sogenannte differentielle Genexpressionsanalyse vergleicht dabei krankes und gesundes Gewebe auf mRNA Ebene. Daraus lassen sich krankheitsrelevante Gene erhalten, die zu einem besseren Verständnis der Krankheit führen oder eine Therapie ermöglichen können. Als Sonden für die Genexpressionsanalyse wurden häufig cDNAs verwendet, solange noch nicht alle Sequenzen des menschlichen Genoms bekannt waren. Außerdem wurden diese als spezifischer im Vergleich zu kurzen, auf der Oberfläche synthetisierten, Oligonukleotidsonden angesehen [Schena 1997]. Heute werden

auch längere, synthetische Oligonukleotide bis zu 70 Basen als Fängermoleküle eingesetzt [Lockard and Winzeler, 2000]. Eine der ersten rückblickenden Betrachtungen zum Einsatz von Mikroarrays zur Genexpressionsanalyse wurde bereits 1996 von Schena vorgestellt [Schena 1996]. Ein exemplarisches Beispiel zum Einsatz eines cDNA Mikroarrays für ca. 1000 Gene zur Entdeckung krankheitsbezogener Gene für entzündliche Erkrankungen findet sich in [Heller et al. 1997].

Abbildung 6 veranschaulicht den allgemeinen Ablauf eines Mikroarray-Experiments zur Genexpressionsanalyse. Die entsprechenden Sondensequenzen werden ausgewählt und auf das Mikroarray gebracht (siehe Kapitel 2.5.1). Die Proben-RNA wird aus dem entsprechenden Gewebe isoliert und meist über einen RT-PCR-Schritt (RT=Reverse Transkription, schreibt RNA in cDNA um) markiert. Danach erfolgt die Hybridisierung auf dem Mikroarray und die Auswertung, meist durch scannende Fluoreszenzdetektion.

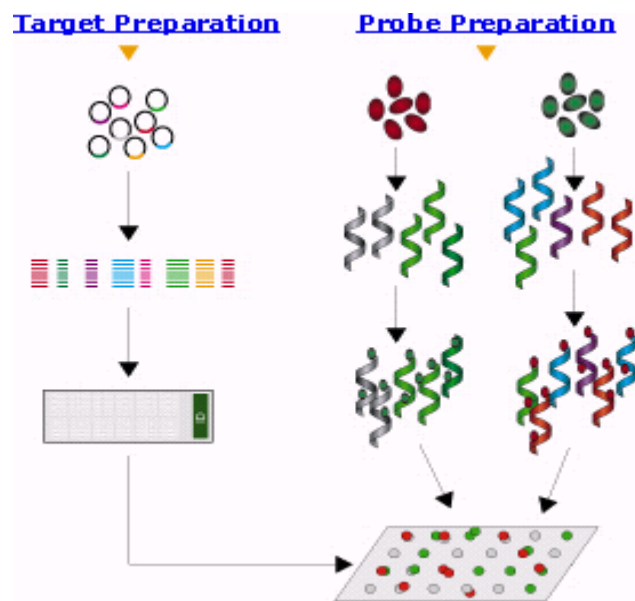


Abbildung 6 Schematischer Ablauf eines Mikroarray Experiments

Um herauszufinden, welche Gene in verschiedenen Geweben angeschaltet sind, benötigt man hochintegrierte Mikroarrays. Mit der Entwicklung von DNA-Mikroarrays wurde es erstmals möglich, bis zu 30.000 Gene anhand von auf dem Mikroarray repräsentierten cDNA-Bibliotheken bzw. Oligonukleotiden zu untersuchen. Dabei kommt isolierte und über RT-PCR umgeschriebene mRNA zum Einsatz.

Heute ist die Firma Affymetrix der Marktführer bei Mikroarrays zur differentiellen Genexpressionsanalyse und Mutationsanalyse auf Mikroarrays. Allerdings stellen kleinere Labore und Konsortien immer noch in großem Maßstab für sie spezifische Mikroarrays selbst her, da die Methode der in-situ Synthese von Oligonukleotidsonden an der Oberfläche der

Affymetrix-Arrays eine schlechte Qualität nachgesagt wird. Dieser Markt wird mit zahlreichen Herstellern von spezifischen Oberflächen und Immobilisierungssystemen bedient.

Eine weitere verbreitete Anwendung von Mikroarrays ist die *Mutationsanalyse*, also die Untersuchung von Punktmutationen, sogenannten SNPs (single nucleotide polymorphisms) auf dem Genom. Diese machen die Unterschiede zwischen Individuen aus. Auf dem gesamten Humangenom gibt es Mutationen in ca. jeder tausendsten Base. Damit geht man von etwa drei Millionen SNPs aus [Gilles 1999], [Tillib 2001], [Dubiley 1999].

Bei der Analyse von Mutationen lassen sich drei Hauptanwendungen unterscheiden: Erstens werden Mutationen in bestimmten Genen gesucht, um einen direkten Einfluss auf ein bestimmtes Protein zu untersuchen, welches wiederum als Zielmolekül für eine mögliche Therapie einer Krankheit dienen kann. Als Beispiel kann hier die bereits gefundene Mutation dienen, welche die Erbkrankheit Korea Huntington auslöst. Zweitens werden sog. "Linkage Studien" zur Erkennung von (möglicherweise krankhaften) polygenen Veränderungen durchgeführt. Diese ermöglichen die Verknüpfung gefundener Allelmuster (Muster von Mutationen über einen bestimmten Bereich des Genoms) mit bekannten phänotypischen Daten, z.B. einem bestimmten Krankheitsbild. Drittens sollen in Zukunft genomweite Studien der Mutationen die Möglichkeit zu weitergehenden Verknüpfungen von Genotyp zu Phänotyp ermöglichen.

Auch die Untersuchung anderer Genotyp-Marker wie zum Beispiel der short tandem repeats (STR) sind teilweise von den klassischen molekularbiologischen Untersuchungsmethoden auf Mikroarrays übertragen worden [Radtkey 2000].

Die Analyse von SNPs auf Mikroarrays steht heute in Konkurrenz zu homogenen Testverfahren wie z.B. Real-Time-PCR (Roche, Applied Biosystems), die sich leicht miniaturisieren, in hoher Parallelität bei niedrigen Kosten ausführen lässt und den Vorteil der genauen Quantifizierbarkeit besitzt. Die bisherigen Mikroarrays haben gerade hier Schwächen, da durch die verwendeten Detektionsmethoden ein Nachweis ohne vorangegangene PCR und damit eine genaue Quantifizierung bisher unmöglich ist.

2.2.4 Weitere Assayprinzipien basierend auf Mikroarrays

Während in der vorliegenden Arbeit zunächst die Grundlagen für einen Einsatz markierungsfreier Detektionsmethoden für genomische Testverfahren gelegt werden sollten (weiteres zu Detektionsmethoden siehe Kapitel 2.3), ergeben sich aus weiterführenden Fragestellungen der Bioanalytik auch andere, weitergehende Einsatzgebiete für die

markierungsfreie Mikroarray-Analytik. Diese sollen deshalb hier überblickartig angesprochen werden.

Auf *DNA-Arrays* lassen sich beispielsweise auch spezifische DNA-Protein-Wechselwirkungen, insbesondere von Transkriptionsfaktoren untersuchen [Bulyk 1999]. Die Verwendung der DNA als „Affinitäts-Anker“ für andere mit komplementärer DNA markierte Moleküle, z.B. Proteine erlaubt sogenanntes DNA-gesteuertes Immobilisieren von interessanten Biomolekülen (DNA-directed Immobilisation) [Niemeyer et. al. 2001]. In diesem Zusammenhang sind auch Oberflächen erwähnenswert, welche spezifische Tag-bindende Gruppen tragen, an die entsprechend getaggte Proteine direkt aus dem Überstand einer Zellkultur immobilisiert werden und dadurch der Analytik an einem DNA-Array zugänglich gemacht werden können.

Auf sogenannten *Antikörper-Arrays* lässt sich die Optimierung monoklonaler Antikörper für diagnostische und therapeutische Anwendungen durchführen. Weiterhin können darauf Antikörpern in hoher Parallelität zum spezifischen Nachweis von Proteinen eingesetzt werden. Ebenfalls möglich sind grundlegende Arbeiten, z.B. ein hochparalleles Epitop-mapping.

Allgemein können auch Proteine auf sog. *Protein-Arrays* angeordnet werden, um damit z.B. Proteinseparation durch Selektion über Affinitäten (auch mit Antikörpern) zu ermöglichen. Nachfolgend kann eine Proteinidentifizierung entweder durch den Einsatz von spezifischen Antikörpern oder durch eine evtl. Kopplung mit weiteren Nachweismethoden wie MALDI-MS, SELDI-MS etc. erfolgen. Auch unbekannter Bindemoleküle bzw. -proteine lassen sich so identifizieren.

Nicht zuletzt können *niedermolekulare Arrays* also z.B. Arrays mit durch kombinatorische Chemie erzeugten, niedermolekularen Liganden, als Werkzeug zur Wirkstoffsuche genutzt werden. Die immobilisierten Liganden zum Hochdurchsatz-Screening können zusätzlich zur kinetischen Charakterisierung der jeweils beobachteten Wechselwirkung herangezogen werden.

Für einige der angesprochenen Testsysteme bzw. Anwendungen existieren bereits heute kommerzielle Verwertungsstrategien, andere befinden sich noch auf dem Stand der Grundlagenforschung. Allen ist aber gemeinsam, dass sie aus der Möglichkeit zur markierungsfreien, kinetischen Messung entscheidende Vorteile ziehen können. Daher wird gerade für hochgenaue, funktionale Analysen im „Post-Genom“-Zeitalter die markierungsfreie Detektion zu einem wichtigen Werkzeug werden.

2.3 Detektionsmethoden

2.3.1 Optische Detektion

Unter optischer Detektion im Zusammenhang mit Mikroarrays versteht man den Spezialfall der Erkennung von Wechselwirkungsereignissen an der Oberfläche des Arrays durch Veränderung der optischen Eigenschaften. Im Gegensatz zur Spektroskopie, die i.d.R. daran interessiert ist, die Eigenschaften von Materie selbst durch die Aufnahme optischer Spektren (IR, UV-vis, Fluoreszenz, Raman etc.) aufzuklären, dienen hier die optischen Eigenschaften gewissermaßen als "Markierung" des eigentlich zu betrachtenden Moleküls, z.B. eines DNA-Oligonukleotids. Ausnahmen bestehen z.B. in der Messung der intrinsischen Fluoreszenz bei 278 nm von Antikörpern zu deren Nachweis.

Eine erschöpfende Aufzählung aller optischen Detektionsmethoden würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen. Trotzdem sollen die gängigsten Verfahren hier kurz dargestellt werden. Die Detektion auf Mikroarrays zur Genomanalyse ist heute praktisch ausschließlich auf Fluoreszenz- und in jüngerer Zeit Chemolumineszenzverfahren beschränkt. Neben den sehr guten Nachweisgrenzen dieser Techniken, hat auch die einfache Handhabbarkeit der Detektoren (heute häufig CCD-Kameras oder Photomultiplier) zur ihrer weiten Verbreitung geführt.

Im Bereich optischer Biosensoren unterscheidet man zwischen direkt optischen (markierungsfreien) und fluoreszenzbasierten Nachweisverfahren. Zu letzteren zählt die Wellenleitertechnik zur Anregung von Fluoreszenz durch das evaneszente Feld, z.B. zur hochparallelen Detektion von Hybridisierung, [Budach 1999]. Sogar mit einem einfachen Computer-Scanner auszulesende Mikroarrays mit Gold- bzw. Silberpartikeln können zu den optischen Detektionsmethoden gezählt werden [Taton 2000].

Auch Systeme, die eigentlich Fluoreszenz als Auslesemethode nutzen, können in der Lage sein, unmarkierte DNA-Fragmente zu detektieren. Diese Möglichkeit kann beispielsweise darauf beruhen, dass die spezifische Hybridisierung an einem fluoreszenzmarkierten Partikel erfolgt und die örtliche Lage und das Vorhandensein des Partikels die analytische Information liefert [Steemers 2000]. Jüngst im Arbeitskreis Prof. Gauglitz entwickelte Verfahren können unmarkierte DNA-Fragmente detektieren, wenn sich der Fluoreszenzfarbstoff an der immobilisierten Sonde befindet und so der eigentliche Analyt nicht markiert sein muss [Seidel 2003], [www.clondiag.de]. Allerdings sind solche Testsysteme hauptsächlich auf genomische Assays beschränkt und nicht ohne weiteres z.B. auf Proteine übertragbar.

2.3.2 Biosensoren und markierungsfreie Detektionsmethoden

Ein entscheidender Vorteil von direkt-optischen Detektionsverfahren gegenüber fluoreszenzbasierten Systemen ist die Tatsache, dass sie einen Bindungspartner an der Oberfläche ohne vorherige aufwändige Fluoreszenzmarkierung erkennen können. Die Detektion erfolgt dabei meist zeitaufgelöst. Allerdings sind die Signale unspezifisch für die jeweiligen Liganden, so dass bei der Oberflächenchemie erheblicher Aufwand zur Unterdrückung aller nicht-gewünschter Wechselwirkungen getrieben werden muss. Eine Übersicht über markierungsfreie optische Transducer findet sich auch in [Brecht et al. 1995]. Die bekannten markierungsfreien Methoden sind Surface Plasmon Resonance (SPR), Gitterkoppler und Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS).

In den 90er Jahren wurden eine Vielzahl von Anwendungen für optische Biosensoren publiziert. Nur überblicksartig soll daher im Folgenden die breite Anwendungspalette dieser Technik, mit Schwerpunkt auf das in dieser Arbeit behandelte Thema der DNA-Detektion, dargestellt werden.

Mit markierungsfreien, zeitaufgelösten Meßmethoden lassen sich *kinetische und thermodynamische Parameter* biomolekularer Wechselwirkungen bestimmen [Haake et. al. 2000] und sie sind somit auch für ein *Screening* nach neuen Wirkstoffen interessant [Markgren et. al. 1999]. Die Einsatzmöglichkeit optischer Biosensoren zur Detektion der *Hybridisierung auf Mikroarrays* konnte von [Wang 2000] bereits gezeigt werden. Erstmals konnte von Sauer gezeigt werden, dass die *Hybridisierung von Oligonukleotiden* auch auf RIfS-Transducern nachgewiesen werden kann [Sauer 1999]. Einer der ersten ausführlichen Artikel zur SPR-Detektion verschiedener *DNA-Manipulationen* wie Strangtrennung, Hybridisierung, enzymatische Modifikation wurde von [Nilsson 1995] veröffentlicht. Genauere Untersuchungen zur *Hybridisierungskinetik von DNA-Oligonukleotiden* mit SPR finden sich in [Kukanskis 1999].

Ein Durchbruch der Biosensor-Entwicklung war außerdem die Möglichkeit der *Detektion kleiner Moleküle* und *Wechselwirkungen mit niedriger Affinität*, z.B. gezeigt mit dem Biacore [Karlsson et al. 1995] oder mit RIfS [Piehler et al. 1997]. Die Nachweisgrenzen der Systeme hängen allerdings außer von der Masse auch wesentlich von der Beladungsdichte an der Oberfläche ab, so dass dieser ein besonderer Augenmerk in der Optimierung zukommen muss.

Gerade wegen des breiten Anwendungsfeldes in der Bioanalytik, das momentan nur durch den niedrigen Durchsatz der existierenden Systeme eingeschränkt ist, und den Vorteilen einer markierungsfreien Detektion, zeichnen sich auch im Gebiet der SPR vermehrt Anstrengungen

ab, die bisherige Beschränkung auf wenige Auslesekanäle zu überwinden. [Steiner 1999], [Guedon 2000], [Nelson 2001], [Lee 2001]. Firmen wie beispielsweise Applied Biosystems (in Kooperation mit HTS Biosystems) und auch BIAcore arbeiten verstärkt an Mikroarray-kompatiblen Plattformen für SPR. All diese Systems basieren ebenso wie die nachfolgend beschriebene, parallele RfS-Detektion auf CCD-Kameras. Allerdings haben die beschriebenen Detektoren alle den Nachteil von bewegten Teilen innerhalb der optischen Detektionsachse.

Nicht unerwähnt bleiben soll in diesem Abschnitt auch die Möglichkeit der elektrochemischen Detektion auf DNA-Mikroarrays wie z.B. in [Pividori 2000] beschrieben. Es handelt sich dabei zwar nur indirekt um optische Detektion (z.B. durch Elektrolumineszenzanregung), meistens wird die Veränderung der Leitfähigkeit oder der komplexen Kapazität gemessen. Diese Anordnungen entsprechen der eingangs besprochenen Bezeichnung DNA-Chip noch am ehesten, da sie wie elektronische, integrierte Schaltkreise aufgebaut werden können.

2.3.3 Reflektometrische Interferenzspektroskopie, RfS

Die Nutzung der RfS zur zeitaufgelösten Detektion von Wechselwirkungen an der Oberfläche geht zurück auf [Gauglitz et al. 1993]. Im Bereich optischer Chemo- und Biosensoren bestand die RfS sehr bald auch Vergleiche mit anderen etablierten Biosensor-Techniken wie SPR, Gitterkoppler etc. [Gauglitz in Sensors Update, Bd. 1, 1996]. Hier soll nur sehr kurz die Funktionsweise des Detektionsprinzips erläutert werden, da dies an anderer Stelle bereits ausführlich und mehrfach nachzulesen ist [Gauglitz et. al. 1997].

RfS beruht auf der Mehrfachreflexion von Weißlicht an dünnen Schichten. Werden kohärente Lichtstrahlen an planparallelen Grenzflächen, deren Schichtdicke im Bereich der Wellenlänge liegt, mehrfach reflektiert, so kommt es zur Interferenz der reflektierten Teilstrahlen. Je nach Schichtdicke kommt es dabei zu einer Verstärkung oder Abschwächung der Intensität (konstruktiver oder destruktiver Interferenz). Es wird bei senkrechtem Lichteinfall auf einem transparenten Schichtsystem gemessen (Abbildung 7, Lichteinfall ist für die bessere Darstellung schräg eingezeichnet), an dem sich teilweise reflektierte Lichtstrahlen unter Bildung eines charakteristischen Interferenzmusters überlagern.

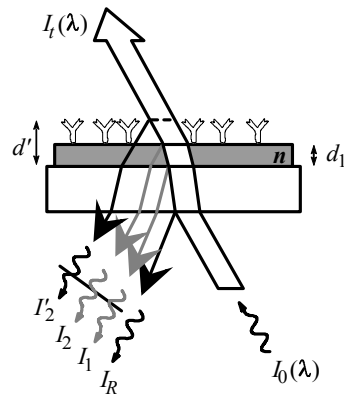


Abbildung 7 RIIS-Transducer

Ändert sich nun die optische Schichtdicke der Interferenzschicht auf dem RIIS-Transducer z.B. durch Bindung eines Rezeptors an einen auf der Oberfläche immobilisierten Liganden, so verschieben sich die Extrempunkte des Interferogramms (zur Berechnung der Extrema und Auswertung der Interferogramme vgl. [Kraus 1992]). Diese Änderung wird bei der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie zeitaufgelöst gemessen. Die Auflösung bei der Detektion der optischen Schichtdicke $n_1 d_1$ beträgt bisher etwa 1 pm [Schmitt et. al. 1997].

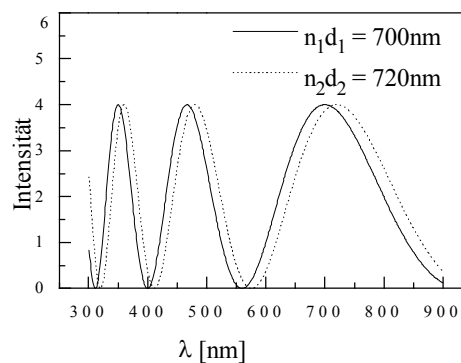


Abbildung 8 Verschiebung des Interferenzmusters in Abhängigkeit von der optischen Schichtdicke

Die optische Schichtdicke kann aus dem Interferogramm durch Polynomregression an den Kurvenverlauf eines Extremwertes bekannter Ordnung berechnet werden. Die Bindungskurven lassen sich dann als diese Veränderung der scheinbaren optischen Schichtdicke gegen die Zeit registrieren.

2.4 Affinitätsreaktionen an der Oberfläche

Die Detektion einer Affinitätsreaktion (hier eines Antikörpers) an einer Grenzfläche beruht auf einer Abfolge mehrerer Prozesse. Der Rezeptor in Lösung bindet an den immobilisierten Liganden. Durch die Bindung an den immobilisierten Liganden verarmt die Umgebung der Grenzfläche an freiem Rezeptor. Dieser wird durch Diffusion aus der Lösung nachgeliefert.

Die Geschwindigkeit des ersten Prozesses wird durch die Bindungskinetik, die des zweiten durch die Diffusion bestimmt. In Abbildung 9 ist dies nochmals schematisch dargestellt.

Formal handelt es sich hierbei um eine Folgereaktion, deren geschwindigkeitsbestimmenden Schritt man letztendlich detektiert. Eine genaue Betrachtung dieser Umstände findet sich in [Gauglitz et. al. 1997], [Glaser 1993] und [Eddowes 1990].

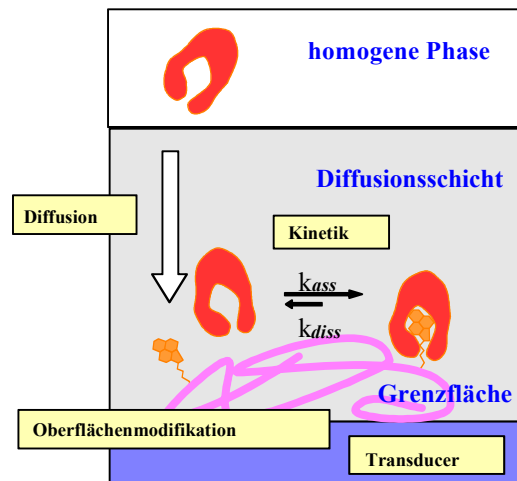


Abbildung 9 Prozesse bei der Detektion von Ligand-Rezeptor Wechselwirkungen an einer Grenzfläche im Durchfluß, d.h. mit konstanter Dicke der Diffusionsgrenzschicht.

Oligonukleotide:

Wie bereits oben beschrieben handelt es sich auch bei der Hybridisierung von Oligonukleotiden um eine sogenannte Affinitätsreaktion, das heißt, die Gesamtwechselwirkung setzt sich aus mehreren schwächeren, nicht-kovalenten Wechselwirkungen zusammen. Im Falle der DNA-Hybridisierung sind dies Wasserstoffbrückenbindungen. An der Oberfläche eines RfS-Transducers kann diese Wechselwirkung bestimmt werden, indem ein Oligonukleotid immobilisiert und ein zweites, komplementäres Oligonukleotid zur Bindung angeboten wird. Der Vorgang der Hybridisierung kann so wie beschrieben zeitaufgelöst durch RfS verfolgt werden.

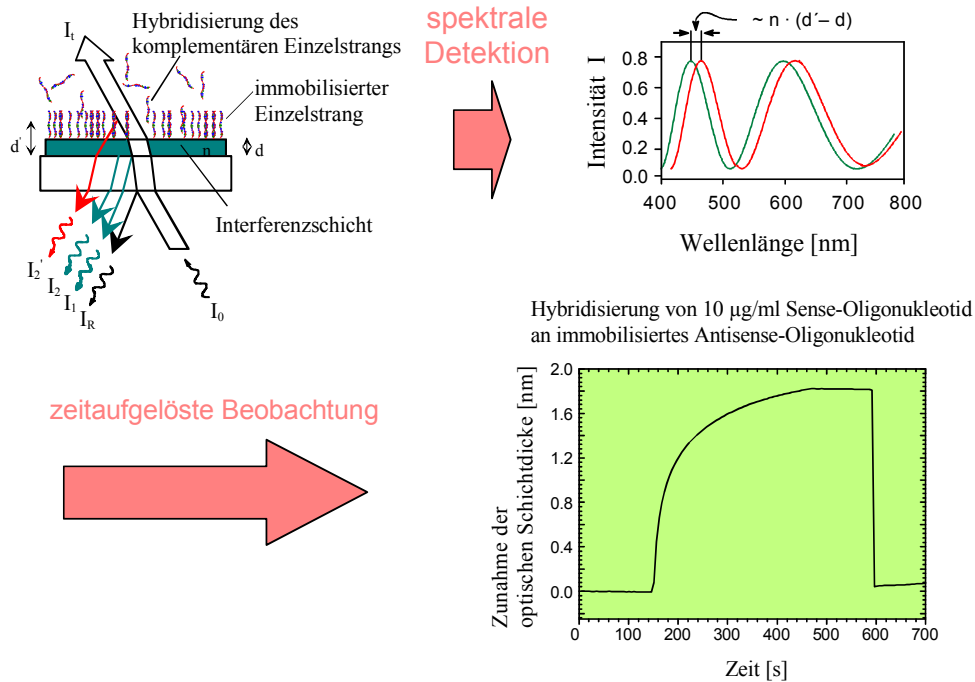


Abbildung 10 Zeitaufgelöste Beobachtung von Hybridisierungsreaktionen an der Oberfläche mit RfS

2.4.1 Parallele Detektion mit RfS

Bereits in einem Artikel von [Brecht 1996] wird die Möglichkeit angesprochen, durch ein bildgebendes Verfahren und dem Einsatz einer Kamera die Anzahl der Messkanäle der RfS Detektion zu erweitern, ohne komplizierte optische Multiplextechnik einsetzen zu müssen. In dieser Zeit wurden auch erste hochauflösende CCD-Kameras und Rechner mit entsprechender Speicherkapazität verfügbar, so dass diese Weiterentwicklung möglich wurde.

Ein Aufbau der parallelen RfS-Technik zum Einsatz für biologische Testverfahren im Pharmascreeing wurde im Verbundprojekt Librarian des BMBF entwickelt und ist erstmals in [Rothmund et al. 1997] beschrieben. Eine Weiterentwicklung im Rahmen dieses Projektes führte zu einem Labormuster, das in der Lage ist, 96 und 384-well Mikrotiterplatten auszulesen und damit auch den Kompatibilitätsanforderungen für das Pharmascreeing zu genügen. Ausführliche Anwendungsbeispiele hierzu finden sich in [Birkert, 2002].

In der folgenden Abbildung wird das allgemeine Funktionsprinzip der parallelen RfS-Detektion erläutert. Während beim beschriebenen Einkanalenaufbau ein Monochromator die Wellenlängen im Spektrometer selektiert, wobei alle gleichzeitig detektiert werden, ist dies beim Parallelgerät nicht mehr möglich, da eine Fläche statt eines Punktes ausgelesen werden muss. Daher erfolgt die Wellenlängenselektion zeitlich seriell und für jede Wellenlänge wird ein Kamerabild aufgenommen. Der Dunkelstrom des Detektors, hier der Kamera, wird vor jeder Messung bestimmt. Als Referenzintensität wird ein reflektierter Strahl verwendet, der

nicht der Interferenz an der dünnen Schicht unterworfen wurde. Das gemessene Gesamtsignal bei jeder Wellenlänge setzt sich also wie folgt zusammen:

$$\text{Signal}(\lambda, \text{Pixel } x) = \frac{I(\lambda)_{\text{Pixel } x} - I_{0, \text{Pixel } x}}{I(\lambda)_{R, \text{Pixel } y} - I_{0, \text{Pixel } y}}$$

mit $I(\lambda)$ gemessene Intensität am jeweiligen Pixel der Kamera

I_0 gemessener Dunkelstrom

Pixel x und y sind die jeweils zusammengehörigen Mess- und Referenzpunkte

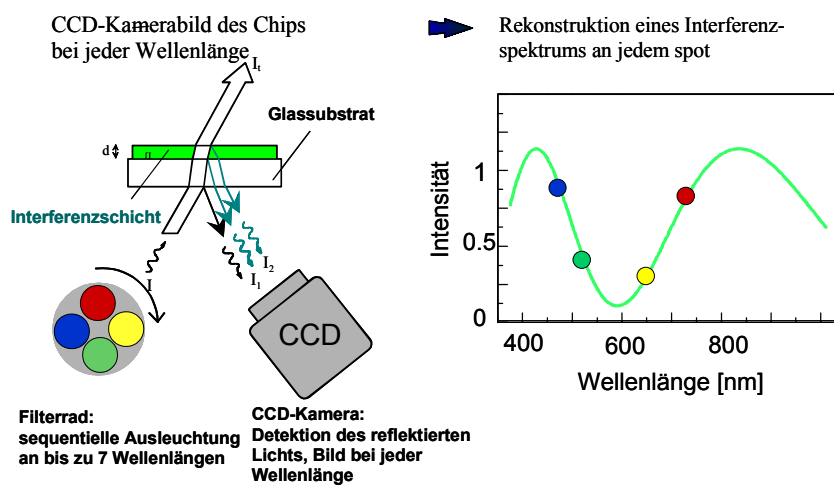


Abbildung 11 Zusammensetzung eines Interferogramms aus Messungen bei verschiedenen Wellenlängen (hier z.B. 4). Die Referenzierung erfolgt simultan für jede Probenposition auf dem Probenträger.

Aus den wellenlängenabhängigen Einzelsignalen an jedem Messpunkt kann durch parabolische Anpassung die optische Schichtdicke an diesem Punkt bestimmt werden. Das von der Software bestimmte Signal für jede Probenposition setzt sich dabei nicht Pixelweise aus einzelnen Signalen zusammen, vielmehr wird der Wert aller Pixel, die zuvor als zu einer Probenposition zugehörig bestimmt worden sind, zu einer Gesamtintensität addiert. Die Anzahl der ausgewerteten Pixel in Referenz- und Probenposition sowie der Dunkelmessung müssen also gleich groß sein, um sinnvolle Zahlenwerte zu erhalten. Die Signalintensität wird zusätzlich auf eine Wellenlänge normiert, da die absoluten Maximalintensitäten aufgrund der unterschiedlichen Transmission der eingesetzten Interferenzfilter unterschiedlich sind. Im Falle der sequenziellen Messung ist es hier sogar möglich, die CCD-Kamera für jede Wellenlänge mit unterschiedlicher Integrationszeit zu betreiben, um jeweils den ganzen Dynamikbereich der Kamera nutzen zu können.

2.4.2 Strategien zur Miniaturisierung

Bei der Miniaturisierung von Detektionsmethoden und Testverfahren für biochemische Fragestellungen ist in den neunziger Jahren zusammen mit der Mikroarray-Technologie ein wahrer Boom ausgebrochen. Die wesentlichen Randbedingungen einer Miniaturisierung ist das verkleinerte Volumen bis in den Nanoliterbereich und damit die Möglichkeit, bei gleichbleibender Probenmenge viel mehr Tests durchführen zu können. Bei der beschriebenen Reflektometrischen Interferenzspektroskopie beispielsweise kann im parallelen Aufbau mit derselben Probenmenge 384 Messungen statt nur einer im Einkanal Aufbau durchgeführt werden.

Zur Erreichung der Miniaturisierung haben sich Systeme etabliert, mit denen sich kleinste Flüssigkeitsmengen handhaben lassen, sogenannte Nanodispensersysteme [Yang 2001]. Das Limit dieser Verkleinerung liegt bei DNA-Assays in der Anzahl der zur Verfügung stehenden DNA-Moleküle für eine Analyse. Will man beispielsweise eine Probe von 1 ng DNA für einen hochparallelen Testverfahren auf ca. 30.000 Probenpositionen verteilen, kommen rechnerisch nur noch 0,6 Moleküle DNA auf eine Probenposition, d.h. im Schnitt enthalten 4 von 10 Positionen kein Molekül.

Die Probenhandhabungssysteme werden in jüngster Zeit immer wieder mit Chip-Plattformen kombiniert, auf denen auch bereits eine Ausleseeinheit integriert ist [Hosokawa 1999]. Man erhofft sich von den sogenannten Lab-on-a-Chip Systemen, die viele der obengenannten Merkmale der Miniaturisierung in einer Plattform vereinigen auch direkte, von der reinen Forschung unabhängige Anwendungen, beispielsweise im diagnostischen Bereich. [Talary 1998], [Hodgson 1998]. Ein Modellbeispiel für eine solche erfolgreiche Integration sämtlicher Probenhandhabungsschritte auf einer Plattform ist z.B. in [Anderson 2000] beschrieben. Dort ist sogar bereits ein Affymetrix-Mikroarray auf der Silizium-Plattform integriert (Abbildung 12³).

³ Die Beschriftungen stammen aus der Publikation und sollen hier nicht im Detail erläutert werden.

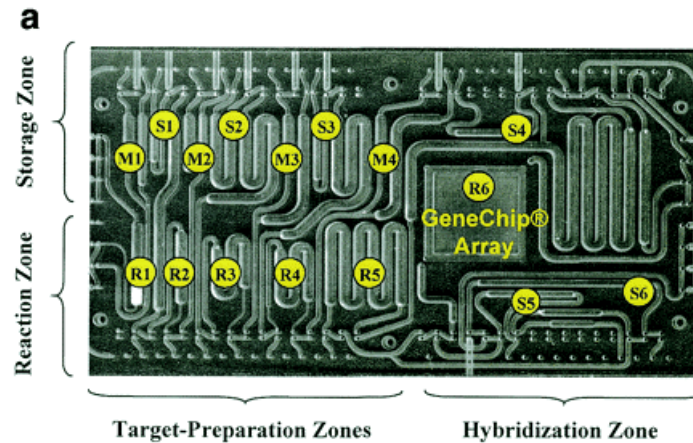


Abbildung 12 Integriertes Analysensystem mit Mikroarray nach [Anderson 2000]. In der linken Hälfte erkennt man die Kanäle zur Amplifizierung durch PCR (R1-M1-S1 etc.), in der Mitte ein DNA-Mikroarray (R6).

Weitere Ansätze zur Miniaturisierung von Bioassays beruhen vielfach auf Partikeln oder Nanopartikeln, die meist auf eine bestimmte Art kodiert oder markiert sind und die z.B. mit gängigen Zellsortiersystemen ausgelesen werden können [Smith 2000].

2.5 Oberflächen für Mikroarrays

Während die Notwendigkeit zur Immobilisierung von Biomolekülen wie DNA, Oligonukleotide, Antikörper, Proteine für die Detektion von Wechselwirkungen an Grenzflächen zu einer riesigen Vielfalt an Lösungsansätzen geführt hat, haben sich für DNA-Mikroarrays im Wesentlichen zwei Verfahren etabliert. Entweder werden die benötigten Biomoleküle in-situ auf der jeweilig verwendeten Fläche synthetisiert, wie es vom Marktführer Affymetrix bei seinen Gene-Chips betrieben wird, oder sie werden off-line synthetisiert und durch Spotting-Systeme auf die Oberfläche aufgebracht.

Die verwendeten Materialien für Mikroarrays sind vielfältig und durchaus nicht auf Glas bzw. SiO_2 beschränkt. Die Auswahl erstreckt sich von Siliziumschichten [Jansshoff 1998] über komplexe Wellenleiter aus $\text{Si}_x\text{O}_y\text{N}_z$, Goldoberflächen (meist für SPR) bis hin zu Membranen aus Kunststoff oder Cellulose. Die geeignete Oberflächenchemie ist so meistens eine optimierte und spezifische Lösung für die gewählte Technik. Die hier gezeigten Strategien orientieren sich im Wesentlichen an der Einsetzbarkeit für die in dieser Arbeit verwendete RfS Methode.

Die Oberflächenrauigkeit ist dabei ein wichtiges Qualitätskriterium und kann beispielsweise durch AFM-Untersuchungen bestimmt werden. Folgende Abbildung zeigt die

AFM-Aufnahme einer ultraflachen SiO_2 -Oberfläche für den Einsatz für RfS-Messungen im Vergleich zu einer silanisierten und mit Polyethylenglycol behandelten Oberfläche.

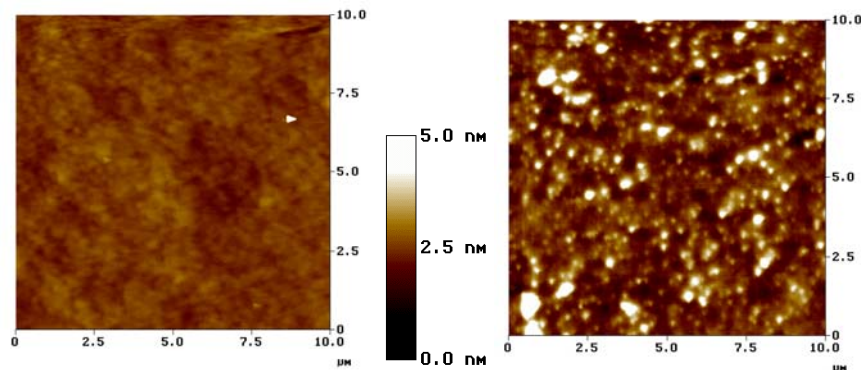


Abbildung 13 AFM-Aufnahmen von der Modifikation einer ultraflachen SiO_2 -Oberfläche (links) mit einem Polymer (rechts).

Trotzdem letztere als besonders homogen angesehen wird, verändert sich die beobachtete Rauigkeit um fast einen Faktor zehn. Die meisten schlecht reproduzierbaren Effekte auf Oberflächen können daher vermutlich auf (Sub-)Strukturen im Nanometer-Bereich zurückgeführt werden. Eine entsprechende Charakterisierung der eingesetzten Oberflächen ist stets notwendig.

2.5.1 Kovalente Immobilisierung von Oligonukleotiden auf Mikroarrays

Die weitaus meisten Mikroarrays zur Genomanalytik basieren auf Glasschichten oder Nylonmembranen. Demgegenüber herrschen in der Biosensorik Goldoberflächen (für SPR) vor. In der Reflektometrie und vielen anderen Wellenleitertechniken kommt dagegen wieder eine SiO_2 oder ähnliche Schicht zum Einsatz, die vorab silanisiert wird, um eine dedizierte funktionelle Gruppe an der Oberfläche in großer Homogenität zur Verfügung zu stellen. In Abbildung 14 ist eine allgemeine Strategie vorgestellt, wie im Prinzip auf allen diesen Oberflächenarten eine kovalente Immobilisierung von Oligonukleotiden erreicht werden kann.

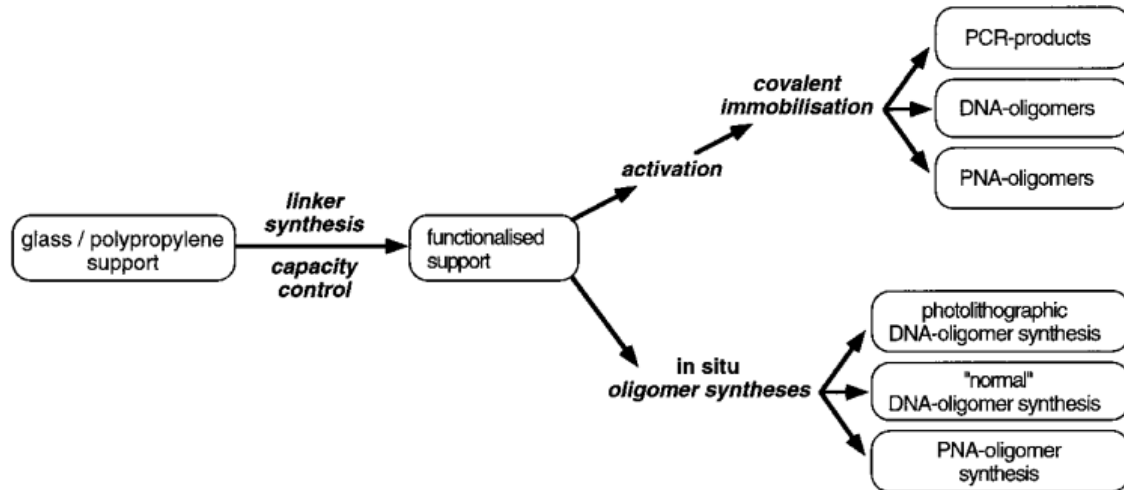


Abbildung 14 Allgemeine Strategien zur kovalenten Immobilisierung von DNA auf Mikrochips (aus [Beier 1999])

Mikroarrays werden auf zwei Arten mit Oligonukleotiden oder cDNA belegt. Erstens können sie direkt *an der Oberfläche in-situ synthetisiert* werden, wie dies von Affymetrix (www.affymetrix.com), Clondiag (www.clondiag.com) oder auch Febit (www.febit.de) realisiert wird. Werden dabei nasschemische Methoden verwendet, kann die Syntheseausbeute mit der einer off-line Synthese vergleichbar sein, während bei den von Affymetrix eingesetzten photolithographischen Verfahren keine hohen Ausbeuten erzielt werden. Eine besondere Variante der photolithographischen Synthese ist die von Febit eingesetzte Methode, bei der die Mikroarrays zunächst nur aus einem mikrofluidischen Chip bestehen, auf den dann vom Kunden in einem vollautomatisierten Syntheseprozess Oligonukleotide erzeugt werden. Dies ist eines der schnellsten bekannten Systeme und kann bis zu 10.000 Oligonukleotide in ca. zwei Stunden auf dem Mikroarray erzeugen.

Als zweite Möglichkeit können *vorsynthetisierte Oligonukleotide* auf die Oberfläche aufgebracht werden. Hierzu muss diese zuvor aktiviert werden. Die gängigste Methode zur hierzu stellt die aus der Peptidchemie bekannte Kupplung einer mit Succinimid aktivierten Carboxylgruppe mit einer Aminogruppe am Oligonukleotid dar. Eine ausführliche Gegenüberstellung der verschiedenen Methoden findet sich in [Beier 1999]. In dieser Arbeit werden zur Immobilisierung vorsynthetisierte Oligonukleotide (20mere) mit Aminofunktion verwendet.

Weitere Immobilisierungstechniken haben sich vor allem im Bereich der Biosensoren als spezifische Lösungen für bestimmte Detektionssysteme und Anwendungsfälle herausgebildet. Erwähnenswert sind z.B. Ansätze, welche die Dichte an der Oberfläche durch

selbstorganisierte Schichten optimieren. Einen Überblick über diese Techniken gibt [Everhart 1999]. Beispielsweise lässt sich Acrylamid zusammen mit Acrylamid-funktionalisierten Oligonukleotide direkt auf der Oberfläche zur Copolymerisation bringen [Rehmann 1999]. Silanisierte Oligonukleotide führen bereits zu einer Oligonukleotidbelegung während des Silanisierungsprozesses auf Glasoberflächen [Kumar 2000]. In dieselbe Richtung gehen auch die Überlegungen von [Pirring 2000] oder [Cras 1999], denen es gelang, durch die Art der Silanisierung die Oberflächendichte zu optimieren. Thiolmodifizierte Oligonukleotide können direkt auf Goldoberflächen aufgebracht werden [Yang 1998]. Sie bilden dort selbstorganisierende Monoschichten und lassen sich daher in großer Dichte, zweidimensional immobilisieren [Huang 2000].

Schon bald wurde allerdings für den Biosensor-Bereich erkannt, dass außer der Qualität der Silanisierung der Einbau von Zwischenschichten positiven Einfluß auf die unspezifische Bindung hatte. So ließen sich z.B. Antikörperbindungen an Oberflächen für SPR-Systeme optimieren [Toyoma 1998]. Insbesondere für die Arbeiten mit Proteinen erwies sich eine Polyethylenglycol-Zwischenschicht als sehr gut geeignet [Piehler 2000].

Das Signal-zu-Rauschverhältnis als der wichtigste Parameter in der Biosensoroptimierung kann außerdem noch durch eine möglichst große Anzahl an spezifischen Bindungsstellen an der Oberfläche begünstigt werden, d.h. durch eine hohe Oberflächenbeladung. Hierfür eignen sich Zwischenschichten gut, die eine Immobilisierung der Bindungsstellen im Volumen der Schicht von wenigen bis zu einigen hundert Nanometern Dicke zulassen. Beispielsweise können dafür dendrimere Strukturen verwendet werden, wie in [Benters 2001]. Hier konnten Bindungskapazitäten von bis zu 600 pg/mm^2 erreicht werden. In [Jung et. al. 2001] sind Methoden zur Immobilisierung von Oligonukleotiden verglichen worden. Hierbei stellte sich eine in dieser Arbeit verwendete Technik der Aufbringung von Oligonukleotiden auf aktivierte Dextranschichten als besonders geeignet heraus.

Auch die Zugänglichkeit der immobilisierten Spezies für die Reaktion ist ein wichtiges Qualitätskriterium für eine Immobilisierungstechnik. Der Einsatz von Spacern schafft hier oftmals positive Resultate [Riccelli 2001], [Zhao 2001].

Für die vorliegende Arbeit können diese Vorerfahrungen und Erkenntnisse positiv genutzt werden, um daraus die für das RIfS-Mikroarray-System günstigste Oberflächenchemie zu ermitteln. Vergleichende Untersuchungen hierzu sind in Kapitel 4.2 durchgeführt worden.

2.5.2 Weitere Immobilisierungsmethoden

Die einfachste Möglichkeit Liganden oder Oligonukleotide an Oberflächen zu immobilisieren ist die Ausnutzung von Affinitätsreaktionen. Die wohl bekannteste und verbreitetste Methode ist die Immobilisierung über das Biotin-Streptavidin System, welches eine sehr hohe Affinität von etwa 10^{15}M^{-1} besitzt. Auch kann es interessant sein, Proteine mit einem Histidin-Tag über ihre Wechselwirkung mit Nickel-NTA zu immobilisieren. All diesen Verfahren ist gemein, dass sie für mehrfache Regenerationen nur bedingt geeignet sind. Außerdem steht die Affinität der Immobilisierung immer mit der Affinität der zu untersuchenden Wechselwirkung in Konkurrenz, was zu verfälschten Resultaten führen kann.

Ein Spezialfall von Oligonukleotidoberflächen ist die Möglichkeit, diese über die reine DNA-Analytik hinaus als Anker für selbstorganisierte Immobilisierung von Proteinen oder Antikörpern zu verwenden. Diese werden dazu an die entsprechenden komplementären Sequenzen kovalent gekoppelt. Dieses Prinzip bezeichnet man als DNA-directed immobilization [Niemeyer 1999-2]. Hier dient das immobilisierte Oligonukleotid nur als eine Art Hausnummer (= zip-code) und dirigiert den Analyten, automatisch die richtige Stelle auf dem Array. Die Oberfläche dient dabei nur noch als Dekodierplattform. So lassen sich auch hochkomplexe Arraystrukturen quasi selbstorganisiert herstellen und komplexe Testverfahren nicht nur für die Bioanalytik, sondern auch für die Umweltanalytik etablieren [Niemeyer 1999]. Angewendet wurde dieses Prinzip z.B. für Pestizid-Immunoassays in [Kröger et. al. 2002].

2.5.3 Immobilisierung von DNA-Oligonukleotiden auf RfS-Mikroarrays

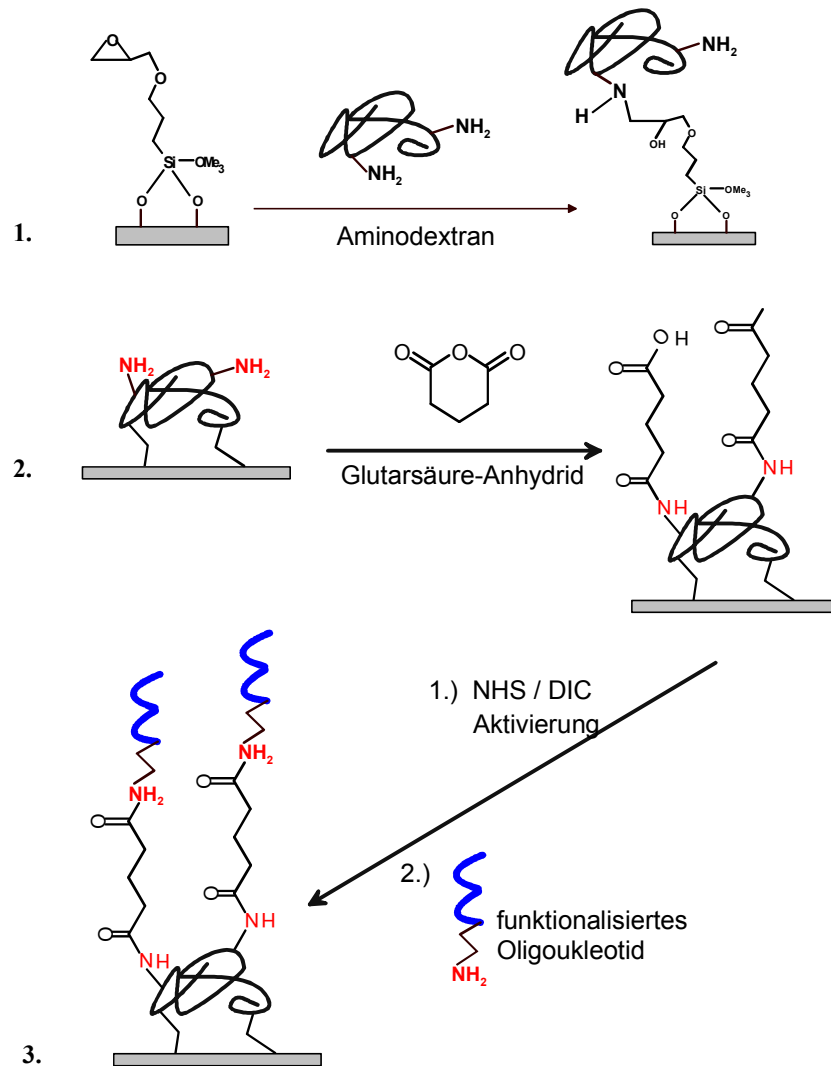


Abbildung 15 Allgemeine Strategie zur kovalenten Immobilisierung von DNA-Oligonukleotiden auf RfS-Mikroarrays.

1. Silanisierung mit GOPTS und Aufbringung der Aminodextranschicht.
2. Reaktion von Glutaranhydrid mit verbleibenden Amino- und auch Hydroxylgruppen des Dextrans.
3. Aktivierung der Carboxylgruppen mit N-Hydroxysuccinimid und anschließende Reaktion mit dem aminofunktionalisierten Oligonukleotid.

2.5.4 Ortsaufgelöste Immobilisierung

Die Immobilisierung von Oligonukleotiden auf Mikroarrays benötigt Methoden, die automatisiert und reproduzierbar die Punkte auf der Oberfläche modifizieren, an denen später gemessen werden soll. Für diese Aufgabe wurden zunächst verschiedenste Geräte entwickelt,

die auf dem Transfer von Flüssigkeit an einem Pin beruhen. Dieser Pin setzt die Flüssigkeit auf der Mikroarray-Oberfläche ab und setzt so die Immobilisierung in Gang.

Eine weitere Möglichkeit zur orts aufgelösten Immobilisierung sind sogenannte Freistrahldosierautomaten, die zumeist auf Piezotechnik zur Abgabe kleinster Flüssigkeitsmengen im sub-Nanoliterbereich basieren. Diese wurden auch ausschließlich in dieser Arbeit eingesetzt. Über die genauen Charakteristika der Methode kann man etwas in [Stemmler 1999] oder auch [Jung 2001] in Erfahrung bringen. Da in dieser Arbeit zunächst die Detektionsseite der parallelen RfS-Hybridisierungsmessung entwickelt werden sollte, wurde auf Seiten der Immobilisierung auf bekannte und vorhandene Technologie zurückgegriffen.

Trotzdem soll nicht unerwähnt bleiben, dass auch technisch sehr simple Lösungen, wie z.B. sehr einfache mechanische Stempel, die in PDMS ausgeformt werden dazu benutzt werden können, Antikörper auf eine aktivierte Oberfläche zu überführen und diese dort kovalent zu immobilisieren [Martin et al.]. Selbst Proteinarrays können in beschränkter Masse bereits mit solchen Stempeltechniken erzeugt werden. [Gaber 1999]. Für einen Einsatz in der Sensorik, die im Zentrum dieser Arbeit stand sind solche robusten, technologischen Verfahren zur kommerziellen Herstellung von DNA-Arrays sicher von sehr großem Interesse.

2.6 Kinetik, Thermodynamik

2.6.1 Statische Modelle

Theoretische Modelle zur Auswertung von Biosensordaten sind etwa seit 10 Jahren gründlich untersucht worden. Die Hauptrolle bei den Betrachtungen spielen dabei grundsätzlich zwei Parameter. Erstens der Einfluss der Diffusion zur Oberfläche des Biosensors und zweitens die Zugänglichkeit und damit die oberflächenbeeinflusste Kinetik des Vorganges. Den gesamten Bindungsvorgang in einem Biosensor kann man daher als Folgereaktion von Diffusion und Bindungskinetik zur Oberfläche auffassen und beschreiben. Den genauen Einfluss der Diffusion wurde bereits sehr früh von [Glaser et al. 1993] untersucht und dargestellt. Weitergehende Untersuchungen, beispielsweise über den Einfluss einer polymeren Matrix an der Biosensoroberfläche auf die gemessenen Kinetiken stellte unter anderem [Schuck et al. 1996] an. Einen guten Gesamtüberblick, sowie eine genaue Beschreibung der Vorgehensweisen bei der kinetischen oder thermodynamischen Auswertung von Biosensordaten findet sich bereits bei [O'Shannessy 1994]. Mikrofluidische Systeme und die Ausdehnung der Reaktionszeiten für außergewöhnlich langsame Reaktionen gewinnen in der jüngeren Entwicklung der Biosensortechnik ebenfalls an Bedeutung [Abrantes 2001].

Wendet man zur Beschreibung verschiedene Modelle der Anpassung empirischer Bindungskurven an, ist man letztendlich in der Lage, auch die Reaktionsmolekularität der stattfindenden Oberflächenreaktion und daraus dann auch deren kinetische Konstanten abzuleiten [Eddowes 1990], [Myszka 1997], [Edwards 1999]. Dabei muss die Umgebung und Zuverlässigkeit der Biosensormessung kritisch mitberücksichtigt werden, um keine Artefakte in die Betrachtung mit einzubeziehen. Eine wesentliche Rolle dabei spielt insbesondere bei unvorhersehbarer unspezifischer Bindung die Benutzung einer internen Referenz wie sie z.B. bei [Ober et al.] beschrieben ist.

In der Regel werden biochemische Assays quantifiziert, indem nach dem Ablauf einer spezifischen Reaktion, oft auch mit nachfolgender DNA-Amplifikation, ein Endsignal des Assays, also z.B. eine bestimmte Fluoreszenzintensität oder ein radioaktives Signal ausgelesen wird. Damit können durch Konzentrationsreihen und auch durch Wiederholungsexperimente gute Ergebnisse im Sinne von reproduzierbaren, thermodynamischen Daten von Interaktionen, oder eben Konzentrationsbestimmungen durchgeführt werden. Während des Ablaufes der jeweiligen Reaktion hat man jedoch keine Einflussmöglichkeit und auch keine Kontrollmöglichkeit durch schnelle, kontinuierliche Messung. Bei Fluoreszenzfarbstoffen verhindert das häufig auftretende Photobleaching eine kontinuierliche Beobachtung. Ebenso können technische Parameter, z.B. bei Radioaktivmessungen die Dauer derselben, oder bei der Fluoreszenzdetektion von Mikrotiterplatten die scannende Auslesetechnik, eine zeitaufgelöste Beobachtung verhindern.

Die Bestimmung von kinetischen Konstanten von Wechselwirkungen ist dabei einer der wichtigsten Merkmale von Biosensormessungen wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden. Einen guten Überblick über die damit verbundene Theorie gibt [Haake et al. 2000].

2.6.2 Kinetische Modelle für markierungsfreie Detektion

Auswertung kinetischer Biosensordaten hat seit der Einführung der Technologie erhebliche Fragen aufgeworfen. Anfangs wurden Ergebnisse aus solchen Messungen grundsätzlich angezweifelt. Es besteht auch heute noch die Gefahr, dass ungeprüft übernommene Werte aus automatischen Auswertungen falsch sind. Weitere ausführliche Diskussion dieses Themenkomplexes findet sich in [Blake 1999], [Hall 2001], [Crouch 2000], [Shank-Retzlaff 2000] oder [Wang 1998].

Die grundsätzlichen Untersuchungen zum Verhalten nicht-diffusionslimitierter Bindungen und Verdrängungsreaktionen an Biosensoroberflächen sowie deren theoretische Ableitung

von [Joos et al.] gaben der Methode des sog. "global fit" von Biosensordaten, also der Einbeziehung aller Teile der Messung zur Auswertung, erstmals eine eindeutige theoretische Untermauerung. Außerdem wurde deutlich, dass mathematische Modelle und Parameter zur Beschreibung der Biosensordaten zu erheblich sichereren Ergebnissen führten. Diese gesamten Untersuchungen gehen allerdings davon aus, dass das Vorhandensein einer Diffusionslimitierung der Oberflächenreaktion ein Störfaktor für die Messung sei. Nachfolgende Überlegungen sollen dagegen zeigen, dass auch Kinetiken mit Biosensoroberflächen, unter Ausnutzung der Tatsache, dass die Diffusion an die Oberfläche den Gesamtprozess limitiert, bestimmt werden können. Als Hilfsmittel wird dazu eine Fluidik benötigt. Der Einsatz solcher komplexerer Probenhandhabungssysteme und die daraus resultierenden Möglichkeiten einer Erweiterung der Biosensormessungen beispielsweise auf Gleichgewichtstitrationen wurde von [Schuck et al. 1998] eingeführt.

Kinetische Untersuchungen biomolekularer Wechselwirkungen mit markierungsfreien Methoden waren allerdings bisher auf die Untersuchung der Bindung an eine Oberfläche beschränkt und werden durch Oberflächeneffekte, wie Rückbindung oder Zugänglichkeit der oberflächengebundenen Reaktanden beeinflusst. Dadurch sind sie von der Immobilisierung jedes einzelnen Analytmoleküls, d.h. von der Zugänglichkeit, also der Umgebung und dem Solvationsstatus der Oberfläche abhängig. Dies repräsentiert für viele Reaktionen nicht die Bedingungen, denen diese in der Realität ausgesetzt sind (außer den Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen, die explizit an einer Oberfläche stattfinden, so wie z.B. die Ligandbindung an membrangebundene Rezeptoren o.ä.). Meist finden Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen in Lösung statt, so dass auch die gängigen Untersuchungsmethoden wie stopped-flow Fluoreszenz oder UV-Messungen Reaktionen in Lösung untersuchen können.

Das Ziel dieser Arbeiten war deshalb die Entwicklung einer Methode und eines Testformats zur Beobachtung der Kinetik einer Affinitätsreaktion in Lösung mit Reflektometrischer Interferenzspektroskopie (RIfS) zur markierungsfreien Detektion. Weiterhin wurde ein Probenhandhabungssystem zur Vermischung im Durchfluss benötigt. Die Untersuchungsmethode, die im Folgenden beschrieben werden soll, kann kurz unter der Bezeichnung **KIA** (engl. für Kinetic-Inhibition-Assay) zusammengefasst werden.

2.6.2.1 Modellbildung für die Auswertung homogener Kinetiken von Antigen-Antikörper Reaktionen

Die grundlegenden Vorarbeiten zu den Untersuchungen über homogene Bindungskinetik wurden in der Diplomarbeit von [Jung, 1997] unter Berücksichtigung von enzymkinetischen

Grundlagen nach [Bisswanger 1994] gemacht. Im Wesentlichen beruhen die gemachten versuche auf Antigen-Antikörper Wechselwirkungen, für die im Folgenden einmal die Theorie allgemein hergeleitet werden soll.

Man betrachtet die Reaktion



Für die *Bildungsgeschwindigkeit* des Antigen-Antikörper-Komplexes gilt die normale Differentialgleichung einer Reaktion zweiter Ordnung:

$$\frac{dc_{AgAk}}{dt} = k_{ass} \cdot c_{Ak} \cdot c_{Ag} - k_{diss} \cdot c_{AgAk}$$

Deren Lösung für einen äquimolaren Ansatz c_0 lautet

$$\frac{c_{AgAk,Gl}}{(c_{0,Ag}^2 - c_{AgAk,Gl}^2)} \cdot \ln \frac{c_{AgAk,Gl} (c_{0,Ag}^2 - c_{AgAk} \cdot c_{AgAk,Gl})}{c_{0,Ag}^2 (c_{AgAk,Gl} - c_{AgAk})} = k_{ass} \cdot t$$

Für zweiwertige Rezeptoren (Ak) muss der Spezialfall für statistische Besetzung der Bindungsstellen berücksichtigt werden. Detektiert werden nur die nicht besetzten und einfach besetzten Antikörper, was in Abbildung 16 dargestellt ist.

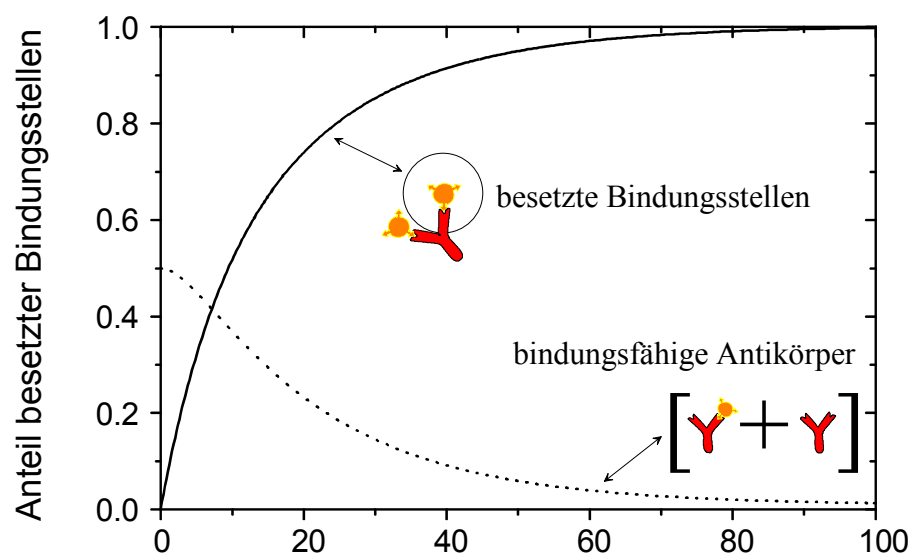


Abbildung 16 Zeitlicher Verlauf der Besetzung von Bindungsstellen des Antikörpers und gleichzeitige Abnahme der bindungsfähigen (detektierbaren) Ak durch vollständige Inhibierung

Die Gesamtkonzentration an noch freien Bindungsstellen, also $\left[\text{Y} + \text{Y} \right]$ ist dabei zu jedem Zeitpunkt gegeben durch:

$$\left[\text{Y} + \text{Y} \right] = \frac{c_{0,Ak}}{2} - \frac{\left(\frac{c_{0,Ak} + c_{0,Ag} + \frac{1}{K}}{2} - \sqrt{\frac{(c_{0,Ak} + c_{0,Ag} + \frac{1}{K})^2}{4} - c_{0,Ak} \cdot c_{0,Ag}} \right)^2}{2c_{0,Ak}}$$

Durch formale Integration (beispielsweise in Maple), ergibt sich daraus eine Gleichung, die sich direkt zur Anpassung der mit KIA erhaltenen Bindungskurven eignet. Dies ist flexibler als die früher verwendete Methode der numerischen Integration, welche nur sehr statisch für vorgegebene Werte die Konzentrationsverläufe berechnen konnte [Jung, Diplomarbeit 1998]. Das Modell ist insbesondere für gleiche Ausgangskonzentrationen wichtig, während, wie bereits früher ebenda gezeigt werden konnte, ab einem Überschuss eines Reaktanden von mehr als 2,5-fach, der Unterschied zwischen dem Modell zweiter Ordnung und dem Modell pseudo-erster Ordnung nicht mehr signifikant ist. Dadurch benötigt man für solche Messungen nur noch ein "einfacheres" Modell der integrierten Differentialgleichung für Reaktionen pseudo-erster Ordnung.

Simulationsrechnungen

In dieser Arbeit wurde mit dem Programm Maple in Zusammenhang mit einem C++ Programm (Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Dr. Weber in der Informatik) eine Möglichkeit geschaffen, solche kinetischen Messungen zu simulieren und den simulierten Konzentrationsverlauf den entsprechend gemessenen Kurven direkt anzupassen und auszuwerten. Eine direkte Anwendung findet dieses Verfahren in nachfolgenden Projekten im Arbeitskreis Prof. Gauglitz, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll.

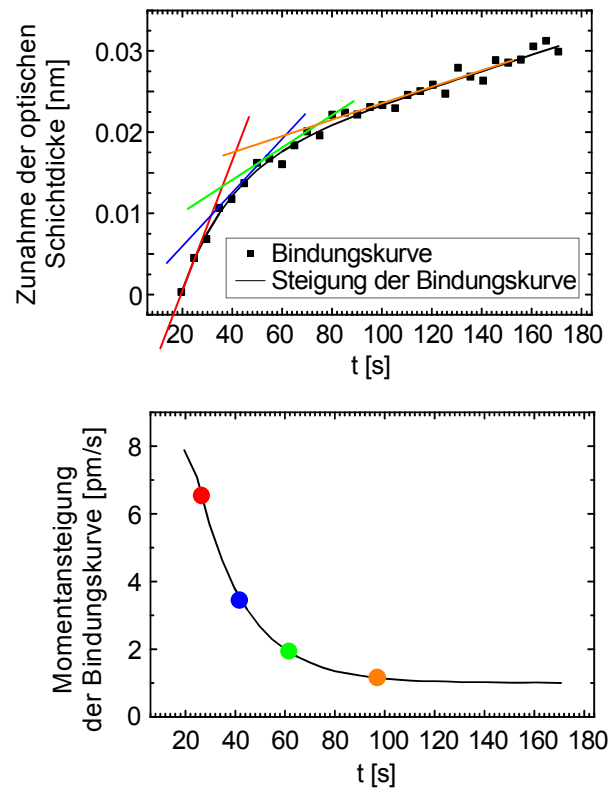


Abbildung 17 Auswertung der kinetischen Messung in homogener Phase (Kinetic Inhibition Assay KIA)

3 Material, Geräte und Methoden

3.1 *Materialien*

3.1.1 *Chemikalien und Biochemikalien*

- Standardchemikalien und -biochemikalien stammten von FLUKA, Neu-Ulm und SIGMA, Deisenhofen, in anderen Fällen sind die Quellen angegeben.
- DNA-Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech AG, Ebersberg, oder von IBA GmbH, Göttingen bezogen. Die Substanzen waren mit HPLC gereinigt und zur Immobilisierung in bidestilliertem Wasser gelöst. Zur Hybridisierung wurde die Substanz in PBS-verdünnt.
- PNA-Oligonukleotide wurden freundlicherweise von der Firma Applied Biosystems, Überlingen/Foster City zur Verfügung gestellt.
- DNA aus Lachsspermien stammte von FLUKA, Neu-Ulm.
- 3-Glycidyloxypropyl-trimethoxysilan (GOPTS) und Diisopropylcarboxydiimid (DIC) wurden von der Fa. Fluka, Neu-Ulm bezogen.
- Aminodextran (AMD) 260/10, hergestellt nach [Piehler 1996], wurde von Herrn Jochen Mehne bereitgestellt.
- Diamino-und Dicarboxy-Polyethylenglykol (DA- und DC-PEG) wurden von Rapp-Polymere, Tübingen erworben.
- 2-Chlor-6-Isopropylamio-1,3,5-Triazin-2-(6'-amino)hexansäure (Atrazincapronsäure, ACA), hergestellt nach [117], wurde von Herrn Dr. Ivo Stemmler überlassen.
- Der monoklonale Antikörper K4E7 wurde vom Arbeitskreis Hock, Fachbereich Botanik an der TU München, zur Verfügung gestellt.

3.1.2 *Lösungen*

- Piranha-Lösung
57,5 % (v/v) H₂SO₄
12 % (v/v) H₂O₂
(sofort nach dem Mischen verwendet)
- Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)
150 mM NaCl
10 mM KH₂PO₄
Mit 2 M KOH wird auf pH 7,4 titriert.

- Regenerationslösung für RfS
500 mg Pepsin in 25 ml bidestilliertem Wasser (10% Lösungsmittel) und 225 ml PBS (90% Lösungsmittel) gelöst und mit 2 M HCl auf pH = 2 titriert. Die Lösungen wurden in 40 ml Portionen bei -18°C aufbewahrt.
- Aktivierungslösung
aus 100 mM NHS in DMF und 400 mM DIC in DMF. Zur Aktivierung wurden beide Lösungen frisch 1:1 zusammengemischt.

3.2 Geräte

3.2.1 Microdrop-Anlage

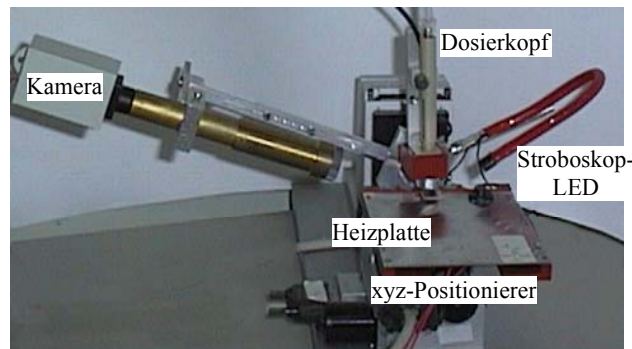


Abbildung 18 Piezo-System zum Aufbringen von Proben an die Oberfläche. Eigenbau nach [Stemmler, 1999]

Das Inkjet System der Firma Microdrop (heute Packard) besteht aus einer Glaskapillare, die konzentrisch in einen piezoelektrischen Aktuator eingebracht ist. Der Tropfen wird von einer $70\ \mu\text{m}$ weiten und $50\ \mu\text{m}$ lange Düse geformt an die sich ein Reservoir von etwa $1\ \mu\text{l}$ anschließt. Durch Anlegen von Rechteckspannungspulsen an den Piezoaktuator können Tropfen bis zu einer Frequenz von 2 kHz aus der Düse ausgestoßen werden. Die Form und Größe der Tropfen kann durch die Variation der Spannung und Pulslänge variiert werden. Die gesamte Prozedur wird im gezeigten Aufbau durch eine CCD Kamera überwacht.

Mit dem gezeigten Aufbau können sowohl Flächen bis zu $2\ \text{mm}^2$ homogen behandelt werden, als auch einzelne Spots zur Herstellung von Arrays aufgebracht werden. Im ersten Fall werden die einzelnen Tropfen eng nebeneinander und überlappend aufgebracht, was zu einer sehr homogenen Oberflächenmodifikation führt.

3.2.2 Komponenten der RfS Aufbauten

Für Standard Schichtdickenmessungen mit einem Kanal wurden verschiedene in der Arbeitsgruppe vorhandene Aufbauten verwendet. Die Aufbauten mit Fließinjektion sind in früheren Arbeiten beschrieben worden. Es wurde sowohl der Aufbau mit ASIA-Schlauchpumpen mit ca. 1000 μl Probenvolumen, als auch derjenige mit Hamilton Spritzenpumpen für ca. 100 μl Probenvolumen verwendet.

- Simultanspektrophotometer SPEKOL 1100, Fa. Zeiss, Jena, modifiziert nach [Schmitt et. al., 1997], integrierte Lichtquelle: 5W/10V Halogenlampe, Fa. Welch Allyn, New York.
- Simultanspektrometer LILIPUT in Verbindung mit dem integrierten Diodenzeilenspektrometerbaustein MMS 256 der Firma Zeiss, Jena.
- Lichtquelle: Halogenlampe 20W, Osram, eingebaut in eine optische Bank mit Lichtleiteranschluss. Das Licht wird durch einen Hohlspiegel und eine Linse auf den Lichtleiter fokussiert.
- FIA-Anlage ASIA der Firma Ismatec, Wertheim. Der verwendete Standardaufbau besteht aus einer Fixpumpe mit 20 Umdrehungen pro Minute und einer Variopumpe mit maximal 50 Umin (variabel in 100 Schritten).
- Als SIA-System wurde ein Microlab 541C Dilutor/Dispenser mit zwei Spritzen in Kombination mit einem 6 aus 1 Ventil auf dem Ventilantrieb MVP der Firma Hamilton, Darmstadt, verwendet. Das Volumen der Spritzen beträgt je 500 μl . Beide Geräte sind über den Computer direkt ansteuerbar. Es wurden Schläuche mit dem Durchmesser 0,8 mm der Firma Ismatec eingesetzt. Die Flussrate hängt hier anders als bei dem FIA-System nicht vom Pumpschlauchdurchmesser ab, sondern ausschließlich von der Spritzengeschwindigkeit und der Spritzengröße. Die maximale Flussrate beträgt für 500 μl -Spritzen 125 $\mu\text{l/s}$ (4 s für einen vollen Spritzenhub), die minimale 120 $\mu\text{l/min}$ (250 s für einen vollen Spritzenhub). Die Auflösung der Spritzen beträgt 2000 Schritte.
- D263 Glas mit 10 nm und 330 nm SiO₂ beschichtet, Firma Schott, Mainz. In 1.5 x 1.5 cm² große Transducer geschnitten. Für den parallelen RfS-Aufbau „Demonstrator Null“ wurden grössere Platten von 4x6 cm geschnitten. Der Mikroarray-RfS-Aufbau wurde mit anderen Transducern mit einer SiO₂ Schicht von 500 nm und einer Ta₂O₅-Schicht von 20 nm betrieben.
- Polymerlichtleiter PMMA (Polymethacrylsäure-methacrylat) \varnothing 1 mm, Koppелеlement 1x2 (50:50), NA 0.46, Firma microParts, Dortmund.

3.2.3 RfS-Aufbau für homogene, kinetische Messungen

Der Aufbau von fluidischen Komponenten für die Messungen von Kinetiken in homogener Phase mit dem RfS-Detektionsprinzip (nach [Jung 1998]) erfolgte mit Komponenten wie Schläuchen (PCTFE), Fittings und Kupplungen der Firma Ismatec soweit dort erhältlich. Der wesentliche Unterschied in der Anordnung der Pumpen im Vergleich zum beschriebenen Einkanal-Aufbau ist die Verwendung eines T-Stücks zur Verbindung zweier vorgeschalteter Probenschleifen, die von beiden Spritzen getrennt bedient werden. Dies ermöglicht ein genaues, zeitgesteuertes Starten und Erfassen der Reaktion. Im Messverlauf, d.h. nach dem Vermischen der Reaktionskomponenten arbeiten die beiden Spritzen im Gleichtakt, um die Reaktionslösung durch die RfS Flusszelle zu transportieren.

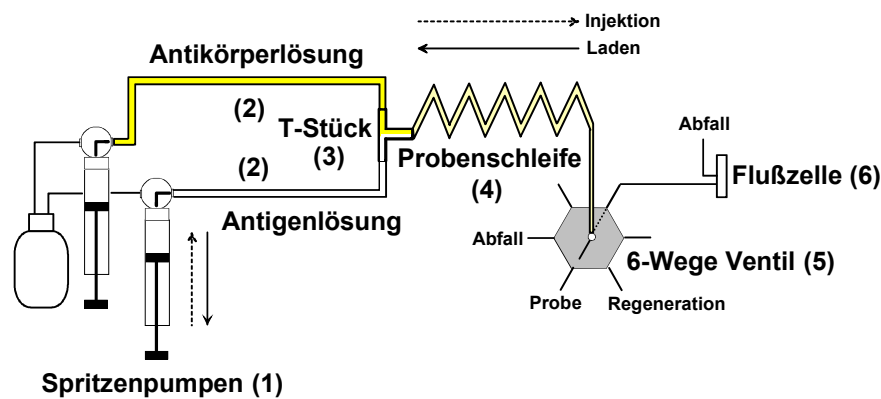


Abbildung 19 Aufbau für kinetische Messungen in homogener Phase, Fluidikkonzept

Vermischung der Antigen- und Antikörper-Lösungen (2) in der Probenschleife (4) erfolgt schnell ($250 \mu\text{l/s}$) über ein T-Stück (3) durch Spritzenpumpen (1). Das Gemisch wird dann, während es reagiert, langsam ($120 \mu\text{l/min}$) durch die Flusszelle (6) gepumpt.

3.2.4 Paralleler RfS-Aufbau („Demonstrator Null“)

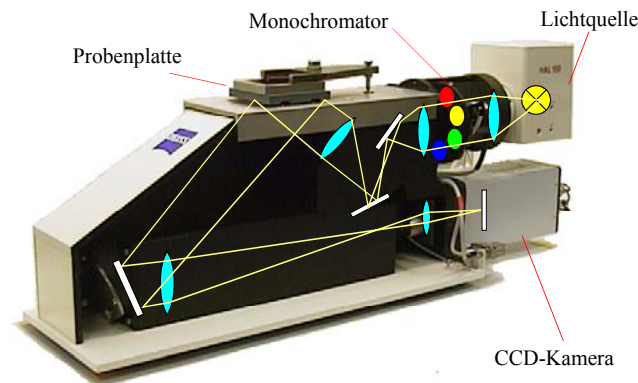


Abbildung 20 Erster Demonstrator zur RfS Parallelisierung. Verwendung zum Nachweis der Machbarkeit der Detektion von DNA-Arrays mit RfS.

Der Demonstrator aus dem Librarian Projekt besitzt eine Detektionsfläche von der Fläche einer viertel Mikrotiterplatte, auf der eine 64-Well Lochplatte aufgebracht ist. Er ermöglicht Messungen an Punkten des Durchmessers 2 mm und wurde in dieser Arbeit zum Beweis der Machbarkeit von Hybridisierungsmessungen auf parallelen RfS-Geräten herangezogen, bevor das Mikroarray-System umgebaut wurde. Die gute Leistungsfähigkeit des Gerätes und die Trennung der Probenpositionen in einzelne Reaktionskavitäten ermöglichte auch Messungen unterschiedlicher Konzentrationen in einem Experiment. Die einzelnen Komponenten des Aufbaus und seine Funktionsweise sind in [Rothmund 1999], [Schütz 2000] sowie in [Rothmund et. al. 1997] beschrieben.

3.2.5 RfS-Mikroarray-Aufbau

Die Messungen auf Mikroarrays wurden auf einem modifizierten RfS Aufbau, dem sog. Mikroarray-Aufbau durchgeführt (Der gelegentlich ebenfalls verwendete Begriff miniaturisierter RfS-Aufbau ist irreführend, da ja nicht der Aufbau selbst, sondern nur die Detektionsfläche miniaturisiert wurde.). Dieser Laboraufbau besteht hauptsächlich aus Spindler & Hoyer Komponenten aufgebaut auf einer optischen Bank, ergänzt durch einige Eigenkonstruktionen und ist in folgenden Abbildungen gezeigt. Die verwendeten Komponenten sind bereits in [Sauer 1998] aufgeführt. Hier soll nur erwähnt werden, dass das Filterrad inkl. Ansteuerung von Carl Zeiss Jena zur Verfügung gestellt wurde.

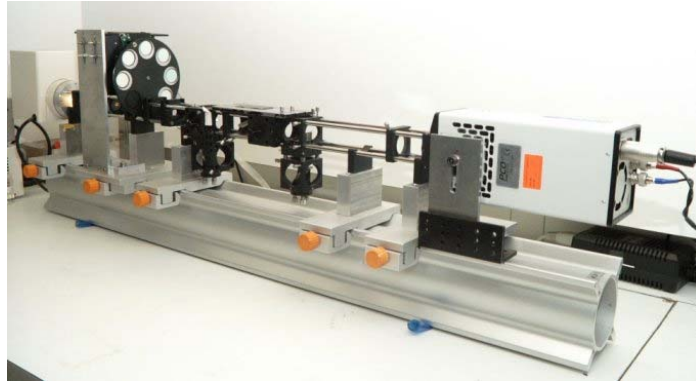


Abbildung 21 Umgebauter optischer Aufbau "Mini-RIFS". Das Zeiss-Filterrad und die PCO-Kamera sind die wesentlichen Modifikationen.



Abbildung 22 Man erkennt die auf das Prisma aufgebrachte und mit Rändelschrauben angepresste Probenaufnahme in Form einer rechteckigen Küvette. Die Prismenhalterung kann in dieser Konfiguration auch eine Durchflusszelle aufnehmen. Davon wurde in dieser Arbeit aber noch kein Gebrauch gemacht.

3.2.5.1 Optischer Aufbau

Nachfolgende Abbildung gibt den für den Laboraufbau berechneten Strahlengang und optische Parameter wieder. Diese Zeichnung wurde freundlicherweise von Carl Zeiss Jena angefertigt und zur Verfügung gestellt. Im Verlauf des Umbaus wurde das bisherige Abbildungsverhältnis von Probenträger zu Kamera von 2,6:1 auf 2,8:1 verändert. Dies wurde mit der Verkürzung des Kameraabstandes und dem Einsatz eines stärkeren Achromaten auf der Bildseite erreicht. Berechnet man das Abbildungsverhältnis und die Kantenlänge der abgebildeten Transducerfläche bzw. der Blende im parallelen Primärstrahlengang von 18 mm x 8,5 mm auf den CCD-Kamerachip mit 8,6 mm x 6,9 mm (frühere Kamera 4x4 mm²), so ergibt sich ein Abbildungsverhältnis von 2,8:1. Horizontal bedeutet dies eine

Kantenlänge des Bildes von 6,4 mm und vertikal eine Kantenlänge von 6 mm, was einer Flächenausnutzung des CCD-Chips von etwa 65% entspricht. Diese Anordnung kommt durch die Notwendigkeit zustande, die Bilder von Referenz- und Messstrahlengang in der Software nebeneinander darstellen zu können. Ein automatisiertes Drehen der Kamerabilder bereits bei der Bilderfassung könnte hier noch eine Verbesserung der Bildausnutzung auf etwa 80% ergeben. Berücksichtigt man allerdings die mechanische Toleranz der Referenzstrahlerfassung, so sind ein bis zwei Millimeter Toleranz auf dem CCD-Chip eine hilfreiche Reserve. Der Aufbau konnte durch die Maßnahmen insgesamt verkürzt und stabilisiert werden. Außerdem konnte so das neue Seitenverhältnis des Kamerachips von 1024x768 Pixel nahezu optimal ausgeleuchtet werden, um so viele Pixel wie möglich zur Auswertung zur Verfügung zu haben.

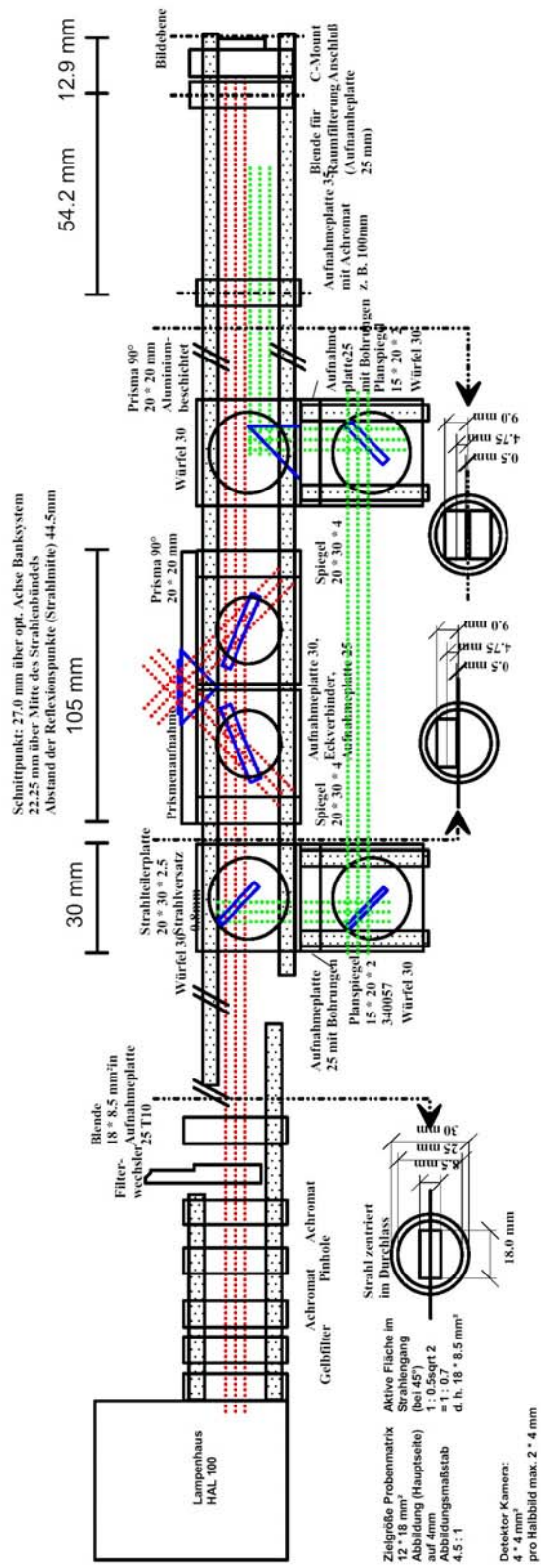


Abbildung 23 Strahlengang im miniaturisierten RfS-Aufbau.

3.2.5.2 Kameraspezifikationen

Die Kamera, die statt der früher verwendeten 256x256 Pixel 8 Bit Kamera eingesetzt wurde, ist eine PCO-Sensicam mit 1280x1024 Pixeln und einer aktiven CCD-Chipkühlung. Die Rahmendaten der Kamera sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 1 **Daten der eingesetzten CCD Kamera PCO Sensicam.**

	Einheit	Bezug	Wert
Auflösung (hor. x ver.)	pixel		Chip: 1360 x 1034 eff. 1280 x 1024
Pixelgröße (hor x ver)	μm^2		6.45 x 6.45
Chipgröße	mm^2		8.6 x 6.9
Max. Quanteneffizienz	%	bei 500 nm	62
Dynamischer Bereich A/D	bit		12
Ausleserauschen	$\text{e}^- \text{ rms}$	bei gain high / bei gain low	4-5 / 5-6
Bildfrequenz Frame-Rate	fps	bei full frame / bei binning 2x2	10 / 19.8
Expositionszeit	s		500ns..1000s
Horizontales Binning			1,2,4,8
Vertikales Binning			1,2,4,8,16,32
Optischer Eingang			C-mount, Nikon adapter
Datenbus			PCI local bus, Rev. 2.1
CCD Temperatur	$^{\circ}\text{C}$		-12

3.3 Methoden

3.3.1 Assays, Protokolle

Vielen der in diesem Kapitel verwendeten Protokolle liegen bereits beschriebene Techniken und Anweisungen aus folgenden Handbüchern zugrunde:

[Hermanson, 1992], [Hermanson et al., 1996], [Cass and Ligler, 1998], [Skena, 2000], [Lottspeich, 1998]

3.3.1.1 Vorbereitung von RfS-Transducern

Es wurden mit der im folgenden beschriebenen Methode RfS-Transducer für Einkanal- und Mehrkanal-Aufbauten gleichermaßen beschichtet. Die Handhabung der großen RfS-Transducer für den „Demonstrator Null“ erfordert dabei etwas größere Sorgfalt bei der Reinigung, um ein homogenes Immobilisierungsergebnis zu erzielen.

Für RfS-Experimente im Einkanal-Aufbau wurden 12 x 12 x 1 mm Glasträger aus D263-Glas, beschichtet mit 10 nm TA_2O_5 und 330 nm SiO_2 verwendet. Im Falle Transducer des RfS-Mikroarray-Aufbaus betrug die Schichtdicke der Interferenzschicht 500 nm SiO_2 . Die Transducer wurden in 6 M KOH für eine Minute gereinigt und anschließend mit bidestilliertem Wasser abgespült. Danach wurden die reaktiven Si-OH-Gruppen an der Oberfläche durch dreißigminütige Inkubation mit frisch zubereiteter Piranha-Lösung im Ultraschallbad oxidiert (aktiviert). Es wurde nochmals mit bidestilliertem Wasser gespült und die Transducer im Stickstoffstrom getrocknet. Die aktivierten Transducer wurden sofort weiterverarbeitet.

Die Silanisierung mit 3-Glycidyoxypropyl-trimethoxysilan (GOPTS) erfolgt in einer geschlossenen, wasserfreien Kammer für eine Stunde. Danach werden die Transducer gründlich mit trockenem Aceton gespült, im Stickstoffstrom getrocknet und sofort weiterverarbeitet.

a) Aminodextran-Oberflächen (AMD 260/10)

Eine gesättigte Lösung von AMD 260/10 in bidestilliertem Wasser wird auf die silanisierten Transducer gegeben und ein zweiter wird umgekehrt daraufgelegt, um eine gleichmäßige Verteilung der zähflüssigen AMD-Lösung zu gewährleisten. Nach der Reaktion über Nacht (oder 6-8 Stunden) in einer mit Wasserdampf gesättigten Kammer werden die Plättchen mit bidestilliertem Wasser gründlich abgespült und wiederum getrocknet. Auf diese Weise hergestellte Transducer lassen sich bis zu ihrem Einsatz bei trockener Raumluft längere Zeit aufbewahren.

b) Polyethylenglykol-Oberflächen (Diamino-PEG, $M = 2000$ g/mol)

Eine 1 mM Lösung von DA- bzw. DC-PEG in Dichlormethan wird auf die silanisierten SiO₂-Transducer gegeben. Nach Abdampfen des Lösungsmittels reagieren die Oberflächen über Nacht im Ofen bei 70 °C. Die Transducer werden direkt nach dem Herausnehmen mit warmem, bidestilliertem Wasser (60 °C) abgespült und mit Stickstoff trockengeblasen.

3.3.1.2 Immobilisierung von Liganden

a) Kupplung von Atrazincaprinsäure

Eine frisch hergestellte Lösung von 0.3 M ACA und 1.1 M DIC in trockenem DMF (Wassergehalt max. 0.1 %) wird auf einen mit AMD modifizierten RfS-Transducer gegeben und dieser wird mit einem zweiten abgedeckt. Nach Reaktion über Nacht in einer mit DMF-Dampf gesättigten Kammer wird gründlich mit DMF und bidestilliertem Wasser abgespült und getrocknet.

b) Kovalente Immobilisierung von DNA und PNA-Oligonukleotiden

Die modifizierten SiO₂-Transducer werden mit einer Lösung von 2 mg/μl Glutarsäureanhydrid in DMF für 6 h in einer mit DMF-Dampf gesättigten Kammer zur Reaktion gebracht und anschließend mit DMF und bidestilliertem Wasser gespült. Die jetzt vorhandenen Carboxylgruppen an der Oberfläche werden mit einer Lösung aus 1 M N-Hydroxysuccinimid und 1.5 M DCC in trockenem DMF in einer mit DMF-Dampf gesättigten Kammer für 4 h aktiviert.

c) Aufbringen von Spots auf die aktivierten Transducer

Nach dem Spülen mit trockenem DMF und Trocknen im N₂-Strom werden die DNA oder PNA-Oligonukleotide mit dem Microdrop-System auf die Oberfläche getropft.

Für die Modifikation größerer Flächen war aus Zeitersparnis auch eine direkte Betropfung der aktivierten Oberfläche mit der Pipette (drei mal 1 μl pro Spot) möglich, wenn auch mit geringfügigen Ausbeuteverlusten. PNA wurde im Gegensatz zu DNA aus einer Lösung mit ca. 20% DMF getropft, während DNA-Oligonukleotide mit einer Konzentration von 1 mg/ml direkt aus Wasser immobilisiert werden können.

Während des Tropfvorgangs wird die Oberfläche des Transducers auf 40 °C erwärmt um die Verdampfung des Lösungsmittels zu beschleunigen und die Reaktionsgeschwindigkeit zu erhöhen. Mit dieser Methode lassen sich homogene Oberflächen mit hoher Belegung erzielen [Stemmler, 1999].

Bei der Immobilisierung von PNA ist auf ein gutes Abspülen der Transducer mit DMF (PNA-Oligonukleotide sind schlecht in Wasser löslich!) zu achten, da sonst nicht-immobilisierte

PNA an der Oberfläche haften bleiben kann, was manchmal zu einer so hohen Schichtdicke führt, dass kein auswertbares Interferenzspektrum mehr aufgenommen werden kann. Außerdem könnten Sonden bei der Messung an nicht-immobilisiertes Material binden.

3.3.2 Messabläufe, Software

Alle verwendeten Messprotokolle für den RfS Einkanalaufbau sind bereits in früheren Publikationen wie [Schmitt 2000] oder [Jung 2001], die Standard-Messprotokolle für die parallelen RfS-Messungen in [Rothmund 1999], [Schütz 2000] oder [Birkert 2001] veröffentlicht und wurden fast ohne Modifikationen in dieser Arbeit angewandt. Es soll hier nur auf die neuen Arbeitsabläufe und Methoden näher eingegangen werden, die direkt mit der RfS-Detektion auf Mikroarrays zusammenhängen. Größere Abweichungen, die in diesem Zusammenhang gefunden wurden, wie z.B. spezielle Leistungsdaten des Mikroarray-Aufbaus finden sich auch im Ergebnisteil dieser Arbeit.

3.3.2.1 Die Software "Screening"

Die von Carl-Zeiss Jena programmierte Software "Screening" gehörte ursprünglich zu den Demonstrationsgeräten des Projektes Librarian II, ist aber durch Austausch einzelner Module (im Wesentlichen Kameramodul und Filterrad) in der Lage, den Mikroarray-Aufbau für RfS, wie er oben beschrieben wurde, anzusteuern und die Messdaten zu erfassen. Dazu müssen die Parameter des Aufbaus wie z.B. die Wellenlängen des Filterrades eingegeben werden. Manuell können dann im Kamerakontrollfenster der Abstand zwischen Mess- und Referenzstrahl eingegeben und Auswertebereiche (sogenannte Masken) festgelegt werden. Abbildung 24 zeigt die Parameter, mit denen die RfS-Mikroarray-Messungen durchgeführt wurden. Hier werden die verwendeten Wellenlängen zur Auswertung festgelegt. Ausserdem wird der Abstand zwischen Mess- und Referenzpunkt auf der CCD-Kamera durch einen x,y-Offset festgelegt.

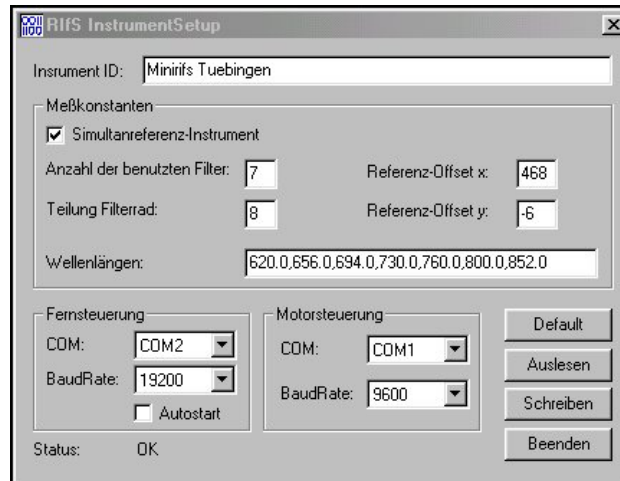


Abbildung 24 Software "Screening" Parameterfenster. Durch die adaptierbare Programmierung können hier die Daten des Mikroarray-Aufbaus leicht angepasst werden. Einzig die technischen Komponenten (Kamera, Filtrerradelektronik, Shutter) müssen kompatibel sein.

3.3.2.2 Dunkelstrommessung

Vor jeder Messung ist von der Software eine Dunkelstrommessung vorgesehen, die in die Berechnung der Intensität bei jeder Wellenlänge nach oben genannter Gleichung (Kapitel 2.4.1) eingeht. Dieser Wert kann im verwendeten Aufbau nur durch manuelles Unterbrechen des Strahlenganges aufgenommen werden, da ein Shutter noch nicht eingebaut wurde. Der gemessene Dunkelwert wird von der Software zur Auswertung während der gesamten Messung herangezogen.

3.3.2.3 Integrationszeit

Zusätzlich zur Vorgabe an die Software, mit dem Aufnehmen des Bildes nach Drehung des Filtrerrades ca. 1 s zu warten, um das Einschwingen des Systems abzuwarten, muss die Integrationszeit der Kamera für die Messung bei jeder Wellenlänge vor Beginn der Messung festgelegt werden. Da die Filter eine unterschiedliche Transmission besitzen, kann so der jeweils optimale Dynamikbereich der Kamera für jedes Filter ausgenutzt werden. Hierzu nimmt die Kamera zu Beginn der Messung Bilder auf und bestimmt über deren mittlere Helligkeit die einzustellende Integrationszeit. Gelegentlich, bei Messungen in Puffer oder Wasser, muss dieser Prozess manuell beeinflusst werden, da Luftblasen o.ä. zu übersteuerten Stellen im Kamerabild führen. Dann regelt die Automatik die Belichtungszeit bis auf den Minimalwert herunter, was zu wesentlich verschlechterten Rauschverhältnissen bei der Messung führt. Um dies zu vermeiden, muss die automatische Belichtungseinstellung in

einem solchen Fall bei manuell gedimmter Lichtquelle erfolgen, wobei danach bei der eigentlichen Messung die ursprüngliche Lampenintensität wieder eingestellt wird.

3.3.2.4 Messablauf

Eine Messung am Mikroarray-RIFS System wird wie in 3.3.2.1 und 3.3.2.2 beschrieben vorbereitet. Vor dem Start der Messung muss lediglich der ungefähre Zeitrahmen bedacht werden, der dann in "Anzahl der Messungen" eingegeben werden kann. Unter den vorliegenden Bedingungen dauert die Aufnahme eines Datenpunktes zwischen 10 und 14 Sekunden.

Sämtliche Probenhandhabungsschritte am Mikroarray-System müssen bisher noch von Hand vorgenommen werden. Hierzu wird Probenlösung in die Messkammer über dem Transducer einpipettiert. Um große Signalschwankungen durch den Pipettiervorgang zu vermeiden, muss am Rand der Kammer pipettiert werden. Grundsätzlich wird die Probenlösung zum Puffer hinzupipettiert, um Luftblasen auszuschließen. Die Konzentrationsänderung muss dabei berücksichtigt werden. Der veränderte Füllstand der Testküvette hat dabei keinen Einfluss auf die Messwerte.

Während dieser Handhabungsvorgänge nimmt die Software in regelmäßigem Abstand Kamerabilder der jeweiligen Filtrerradposition auf. Ist jeweils eine volle Umdrehung des Filtrerrades beendet, kann die Software aus der eingegebenen Maske und den 7 Kamerabildern für jeden Messpunkt einen Wert für die optische Schichtdicke berechnen. Dieser wird von der Software gegen die laufende Nummer der Messung aufgetragen, was die Online-Verfolgung der Messung an jedem Punkt ermöglicht.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 RIfS-Entwicklung für Mikroarrays

Ausgehend von Arbeiten, in der die grundsätzliche Eignung der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie zum Einsatz auf miniaturisierten Probenträgern nachgewiesen werden konnte [Sauer 1998], sollte in der vorliegenden Arbeit das Potential der RIfS für den Einsatz auf miniaturisierten Arrayformaten ausgelotet werden. Anwendungsbeispiele ergaben sich dabei aus der Beteiligung am BMBF Projekt "Gensensorik" in Zusammenarbeit mit Arbeitsgruppen der Universität Bremen. Das Ziel, einen integrierten Gensensor mit der RIfS-Detektionstechnik auszustatten, sollte das Auslesen von (DNA)-Mikroarrays mittlerer Dichte (von 96 bis 384 Probenpositionen) unter besonderen Bedingungen ermöglichen. Erstens sollte die Messung in Echtzeit möglich sein, zweitens temperaturabhängig und zudem im Durchfluss gemessen werden können. Die Messungen sollten wiederholbar sein, das Mikroarray also regenerierbar. Diese Eigenschaften konnten für einen RIfS Aufbau mit CCD Kamera, wie er prinzipiell in verschiedenen Arbeiten beschrieben worden ist, antizipiert werden. Dadurch konnte die RIfS im Projekt als Detektionsmethode etabliert werden.

Hauptziel der Untersuchungen war es nachzuweisen, dass auf dem RIfS-Aufbau mit einer Detektionsfläche von nur noch $12 \times 18 \text{ mm}^2$ gleichzeitig an allen Probenpositionen Hybridisierungen in Echtzeit detektiert werden können. Dabei wurde zunächst der bestehende Aufbau modifiziert und angepasst und danach Charakterisierungen der Leistungsfähigkeit des Aufbaus durchgeführt. Ein weiteres Ziel war der Nachweis einer Multiplex-Hybridisierung am RIfS-Mikroarray Aufbau, also die parallele, zeitaufgelöste Messung an unterschiedlichen Messpositionen eines Mikroarrays.

Der folgende Abschnitt untergliedert sich in eine Erläuterung der Funktionsweise des parallelen RIfS-Aufbaus, einer Beschreibung der grundsätzlichen Fähigkeit zur Multiplex-Hybridisierung an einem RIfS-Demonstrator sowie der ausführlichen Beschreibung der Arbeiten am miniaturisierten RIfS-System, sowie dem Nachweis der Multiplex-Hybridisierung an diesem System.

4.1.1 Technik des miniaturisierten RfS-Auslesesystems

4.1.1.1 RfS-Mikroarray Aufbau

Im Folgenden wird der Umbau und Ersatz technischer Komponenten wie Lichtquelle, Filter, Probenträger, Software und Kamera, die für die Weiterentwicklung des Mikroarray-Aufbaus notwendig waren, besprochen. Der grundsätzliche Aufbau, wie er in Kapitel 3.2.5 beschrieben wird, besteht aus einer Lichtquelle, einem Filtersystem in einem Filterrad, einem Probenträger-Halter und einer CCD-Kamera (Abbildung 25). Der Strahlengang ist so gestaltet, dass der Lichtstrahl vor dem Probenträger durch einen Strahlteiler in Referenz- und Messstrahl geteilt und nebeneinander auf der CCD-Kamera detektiert werden. Da der Referenzstrahl nicht vom Probenträger reflektiert wird, eignet sich dieser als Referenz nach Kapitel 2.3.3.

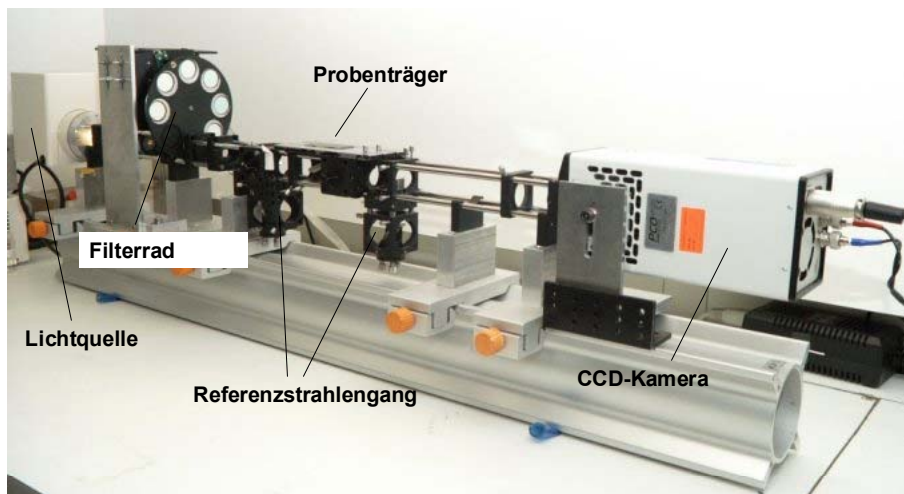


Abbildung 25 Mikroarray-RfS-Aufbau mit den veränderten Komponenten.

Die CCD-Kamera

Die bisher verwendete Dalsa-Kamera mit 8 Bit Auflösung wurde durch eine gekühlte 12 Bit Kamera von PCO ersetzt, die mit einem fehlerfreien CCD-Chip mit einer Auflösung von 1280 x 1024 Pixel ausgestattet ist. Dies diente zwei Zielen, erstens der Erhöhung der ausgewerteten Pixelzahl pro Messpunkt, was sich direkt auf das Signalrauschen auswirkt und zweitens der Verringerung des Ausleserausches und damit der Verbesserung des Signal zu Rauschverhältnisses. Zur Zeit der Experimente war diese CCD-Kamera das beste Modell hinsichtlich ihres Ausleserausches und ihrer Pixelzahl. Außerdem waren bereits gute Erfahrungen bei anderen Aufbauten mit dieser Kamera gemacht worden. Mit dieser

Maßnahme sollte also das Signalrauschen des RIFS-Signals auf das Niveau der bisher bekannten parallelen Aufbauten, insbesondere des in Kapitel 3.2.4 beschriebenen Demonstrators gebracht oder noch verbessert werden.

Die im Vergleich zur Dalsa-Kamera größere Chipfläche der PCO-Kamera (mit einem Seitenverhältnis von 1,25) konnte durch eine Anpassung der Abbildungsoptik bestmöglich ausgeleuchtet werden. Dazu wurde der Abstand von objektseitigem Spiegel zur Kamera verkürzt und ein stärkerer Achromat abbildungsseitig verwendet. Dies verbesserte ebenfalls die Verwindungssteifigkeit des Aufbaus und machte ihn gleichzeitig kompakter. Die Abbildung der reflektierten Chipfläche sowie der Referenzfläche auf den CCD Chip entspricht dabei etwa einem Abbildungsverhältnis von 2,8:1. Dies ergibt insgesamt eine Verbesserung der Pixelanzahl, die pro Chipfläche zur Auswertung zur Verfügung steht um den entsprechenden Faktor 4,3 und sollte bereits aufgrund der Pixelzahl eine Verbesserung des Rauschens um einen Faktor zwei bewirken. Außerdem ist der Dynamikumfang der 12 Bit PCO Kamera größer, das Dunkelrauschen (durch die Kühlung) niedriger, nämlich im Bereich von ± 1 Elektron/Pixel, was den Signal-Rauschabstand bei niedrigen Lichtstärken verbessern kann.

Die Lichtquelle

Die regelbare, stabilisierte Halogenlichtquelle aus dem vorigen Aufbau wurde beibehalten. Sie findet sich in gleicher Form auch in den Demonstrationsaufbauten aus Librarian II und erfüllt Ihren Zweck in ausreichender Weise. Die abgegebene Wärmestrahlung der Lichtquelle wird beleuchtungsseitig durch ein Gelbfilter herausgefiltert. Die Ausleuchtung der Blende, die genau einen Ausschnitt von $12 \times 18 \text{ mm}^2$ aus dem Probenträger beleuchtet (Blende ist $18 \times 8,5 \text{ mm}^2$, der Einfallswinkel des Lichts auf die Deckfläche des Prismas beträgt 45°), ist durch den parallelen Strahlengang homogen. Die Intensität der Beleuchtung spielt für den Signal/Rauschabstand für die RIFS Detektion eine große Rolle, da die Lichtintensität durch die Reflexion um etwa 90% abgeschwächt wird. Außerdem verliert das Licht an den eingesetzten Interferenzfiltern ebenfalls nicht unerheblich an Intensität. Entsprechend wird im Referenzstrahlengang, der ja in diesem Aufbau nicht reflektiert, sondern durch einen Strahlteiler abgetrennt wird, ein 90% Graufilter eingebracht, um die beiden Strahlengänge in annähernd gleicher Intensität an der Kamera zu detektieren. Dies ermöglicht eine bestmögliche Ausnutzung des Dynamikbereiches der Kamera.

Das Filtrerrad

Das Filtrerrad zur Wellenlängenselektion wurde durch ein mit der Zeiss-Software kompatibles ersetzt und durch Adapter mit den bisherigen Filtern (620, 656, 694, 730, 760, 800 und 852 nm) ausgestattet. Der Wellenlängenbereich ist optimiert auf RIfS-Transducer mit 500 nm physikalischer Schichtdicke. Dadurch ist es jetzt möglich, mit der Software „Screening“ (der Firma Carl Zeiss Jena AG) am Mikroarray-RifS-Aufbau Messungen durchzuführen. Grundsätzlich limitieren vor allem mechanische Details die Leistungsfähigkeit einer solchen Filteranordnung, speziell wenn wie im vorliegenden Fall mit einer Freistrahloptik in einem offenen Gerät gearbeitet wird. Daher wurde für Messungen stets das Umgebungslicht abgeschaltet. Für die Minimierung von Falschlicht wurde durch speziell angefertigte Blenden gesorgt. Auch die Geometrie des Einbaus der Interferenzfilter hat großen qualitativen Einfluss auf die Messungen; sie müssen exakt senkrecht zum Strahlengang ausgerichtet sein, um die richtige Wellenlänge ebenso wie die optimale Strahlgeometrie sicherzustellen. Die im Rahmen dieser Arbeiten vorgenommenen manuellen Optimierungen können daher nur ein Schritt in Richtung einer professionellen Fertigung der optischen Komponenten im Allgemeinen und der Filtereinrichtung im Besonderen sein. Erfolge professioneller Fertigung konnten beispielsweise bereits im Librarian II Gerät für Mikrotiterplatten erzielt werden.

Die Software „Screening“

Die zuvor von [Sauer 1998] vorgenommenen Arbeiten, sowie die Vorarbeiten zu dieser Arbeit am miniaturisierten RIfS Aufbau waren im Wesentlichen durch eine nicht vorhandene integrierte Softwarelösung zur einfachen Erfassung und Auswertung der Messdaten erschwert worden. Es konnte zwar mit manueller Maskenerstellung in Microsoft Excel an einigen Spots die Funktionsfähigkeit nachgewiesen werden, allerdings eignete sich diese Lösung nicht zur gleichzeitigen Darstellung vieler Messungen am Bildschirm und damit nur sehr eingeschränkt zur Optimierung des Systems. Das Messen blieb so ein unbeobachteter Vorgang, der durch nachgeschaltete Auswertung verifiziert werden musste [Sauer, Diplomarbeit 1999].

Für die vorliegende Arbeit wurden daher die Einzelkomponenten des miniaturisierten RIfS-Aufbaus, die einer Computersteuerung bedürfen, durch solche ersetzt, die mit der vorhandenen Librarian II-Software ansteuerbar waren. Dies betraf das Filtrerrad bzw. dessen Elektronik, sowie die CCD-Kamera. Ein ebenfalls ansteuerbarer Shutter wurde noch nicht eingebaut.

Die Kameramodule für die PCO-Kamera waren bei Vorversuchen für das Projekt Librarian II bereits ausprogrammiert worden und mussten für die vorliegende Arbeit nur in

das Steuerprogramm Screening eincompiliert werden. Das so modifizierte Programm erfüllte nun folgende Voraussetzungen für den Messablauf:

- Benutzergeführte Referenzpunktbestimmung
- Mausgesteuerte Maskenerstellung
- Automatische Maskenerstellung für 96er (8x12) und 384er (16x24) –Spotmuster
- Dunkelmessung vor jeder Messung (s.u.)
- Auswertung und Online-Darstellung aller relevanter Messparameter
- Protokollerstellung
- Speicherung von Messdaten, Masken und Protokollen

Die folgende Abbildung 26 zeigt eine Originalmessung mit dem Mikroarray-RIFS-Aufbau an 96 Messpunkten mit dem Programm „Screening“. Die Darstellung von Intensitäten, Schichtdicken und der Auswertung in Form von Bindungskurven macht diese Software zu einem geeigneten Instrument, um im Forschungsbetrieb Testverfahren auf dem neuen Instrument zu etablieren. Sämtliche nicht messtechnischen Abläufe, wie z.B. Pipettieren müssen allerdings von Hand erledigt werden.

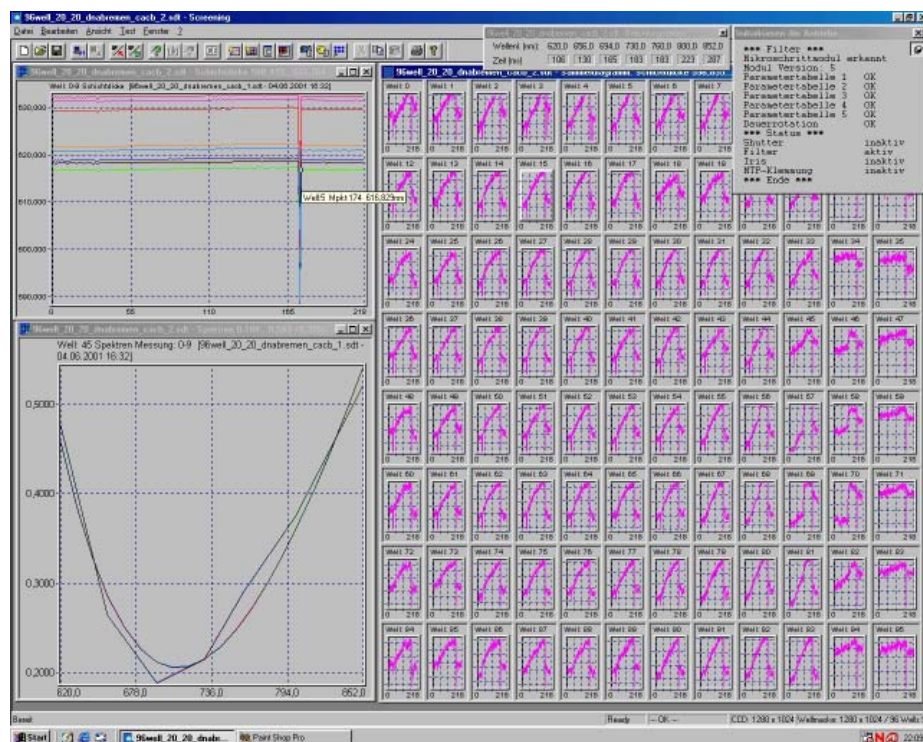


Abbildung 26 Der Messablauf und die Online-Anzeige der Ergebnisse mit "Screening"

Der Probenträger

Ein Probenträger für die Fixierung des Prismas wurde so konstruiert, dass es damit möglich ist, den Chip auf dem Prisma auszurichten und ihn dann entweder mit einer Küvette oder

einer Durchflusszelle zu versehen. Beide Optionen werden mit denselben Befestigungsvorrichtungen fixiert (siehe auch Abbildung 27). Die Kompatibilität zur einer von Projektpartnern entwickelten Durchflusszelle wurde hierbei ebenfalls sichergestellt. Die Messungen in dieser Arbeit wurden alle unter Bedingungen ruhender Lösung ausgeführt, das heißt in einer Küvette. Dies hat zur Folge, dass die Diffusion der Reaktanden (Antikörper, später DNA-Oligonukleotide) an die Oberfläche dem zweiten Fickschen Gesetz unterliegt. Die Bindungskurven sind daher erwartungsgemäß auch bei niedrigen Konzentrationen gekrümmt (Wurzel t-Abhängigkeit), solange die Oberfläche eine hohe Gleichgewichtsbeladung ermöglicht. Zur Gegenüberstellung von Küvetten-Systemen und Durchflusssystemen in der Biosensorik vergleiche etwa [Ward 2000], [Schütz 2000].

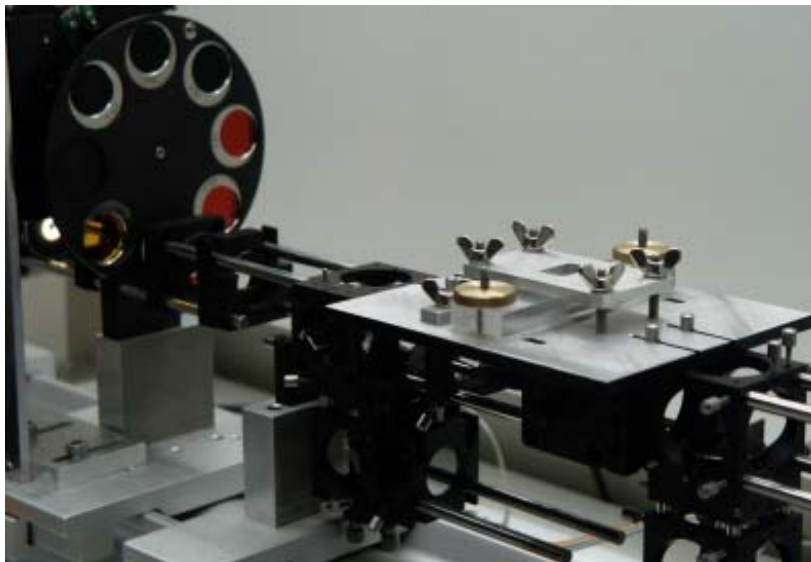


Abbildung 27 Probenträger und Filtrerrad im umgebauten RfS-Mikroarray-Aufbau. Die Reaktionskammer (Küvette) ist hier bereits auf dem Probenträger fixiert.

4.1.1.2 Chipdesign und Spot-Erkennung

Eine Maskenerstellung durch Software mit automatischer Spot-Erkennung (Kontrast) ist prinzipiell möglich. Nach Vorgabe des Formats von $12 \times 18 \text{ mm}^2$ und der gewünschten Spotgrößen wurden mögliche Chipdesigns entworfen, die Messungen an Spots von 1 mm bis 250 μm Durchmesser ermöglichen und eine Anzahl von Spots von 54 bis 1536 erlauben. Durch weitere Verringerung des Abstandes zwischen den Spots sind auch höhere Spotzahlen realisierbar.

Diese Chipdesigns wurden zunächst auf transparente Folien ausgedruckt und auf dem Detektionssystem als Vorlage zur Maskenerkennung aufgelegt. Damit konnten für das

Detektionssystem notwendige Spotmasken erstellt werden. Im Folgenden ist ein Kamerabild dargestellt, das die Abbildung der gedruckten Spots auf dem RIFS-Aufbau zeigt.

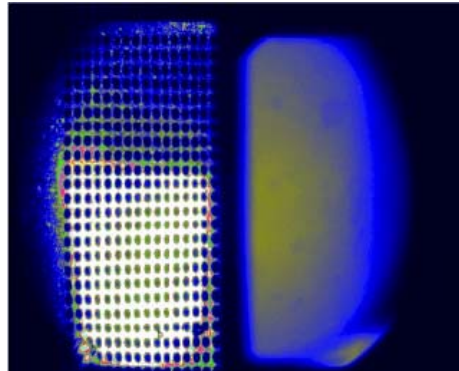


Abbildung 28 Gedrucktes Spot-Array im Kamerabild des Mikroarray-RIFS-Aufbaus als Strategie zur Maskenerstellung.

Allerdings ist diese Hilfsmassnahme letztlich nicht notwendig, um Masken eines gespotteten Arrays zu erstellen, da die Screening Software in der Lage ist, auch aus einem recht kleinen Kontrast noch Spots für die Maskenerstellung erkennen zu können. Die Erkennung lässt sich über Schwellwerte regulieren und damit der jeweiligen Kontrastsituation aus dem eingesetzten Array anpassen. Versuche ergaben, dass der Kontrast einer nicht abgespülten Transduceroberfläche, auf die per Mikrodropverfahren Sonden immobilisiert wurden ausreichend ist, um von der Spoterkennung der Software erkannt zu werden.

Für erste Studien wurde auf flächig immobilisierte Transduceroberflächen zurückgegriffen auf welche sozusagen virtuell, mit Hilfe der Software, Spots aufgebracht werden und an diesen dann die Messungen durchgeführt wird. Diese Methode konnte benutzt werden, um den Einfluss der Spotgröße auf die Qualität der Messung hinsichtlich Rauschen und Gleichgewichtsbeladung zu erfassen (Kapitel 4.2.4.1).

4.1.1.3 Charakterisierungsmessungen am parallelen RIFS-Aufbau

Für die Erzeugung eines Interferogramms wurde mit der CCD-Kamera das Bild des Probenträgers detektiert, der sequenziell von Licht verschiedener Wellenlänge beleuchtet wird. Nachdem durch das Filtrerrad alle sieben verwendeten Wellenlängen eingestrahlt worden sind, lässt sich für jede gewählte Probenposition ein Interferogramm berechnen, wie in der nachfolgenden Abbildung 29 nochmals verdeutlicht wird. Die Tatsache, dass überhaupt ein Interferogramm erhalten wird, wenn die Filterenergien nach der Theorie referenziert werden (vgl. Kapitel 2.3.3), lässt den Schluss zu, dass hier tatsächlich ein RIFS-Signal gemessen wird, das von der Interferenzschicht des Transducers ausgeht. Die Position des Minimums wird von der Software durch eine parabolische Anpassung ermittelt. Die Messung erfolgt durch

Verfolgung der Position der Minima über die Zeit. Im praktischen Betrieb des RfS-Mikroarray-Aufbaus ergab sich in etwa eine Zeitauflösung von 12-14 Sekunden pro Messpunkt. Die erforderliche Messzeit ergibt sich aus der Gesamtzeit für eine Filtrerradbewegung. Dies lag im Wesentlichen an der Wartezeit, die nach jeder Drehung des Filtrerrades eingehalten werden musste, um das Einschwingen des Systems abzuwarten. Die gemessenen Belichtungszeiten lagen dagegen meist im Bereich von 100 ms. Pro Filtrerradposition wird hier also noch ein Zeitvorteil von etwa einem Faktor 10 verschenkt. Hier könnte die Leistungsfähigkeit des Aufbaus also nochmals etwa um einen Faktor drei (Wurzel 10) verbessert werden. Entkopplung des Filtrerrades wird daher bei einem weiteren Umbau in der folgenden Entwicklung notwendig sein.

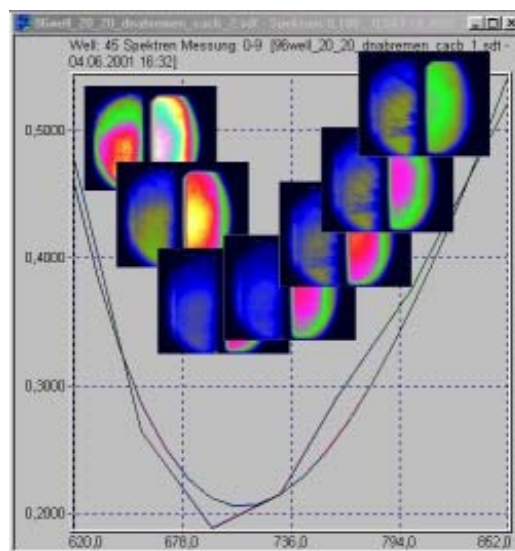


Abbildung 29 Darstellung der Rekonstruktion des Interferogramms aus den Intensitäten der sieben Filtrerradpositionen

Zur Optimierung des Signal/Rausch Verhältnisses wurde die Belichtungszeit der Kamera manuell variiert und dadurch die optimale Belichtungszeit (Aussteuerung des A/D-Wandlers der Kamera) sichergestellt. Die automatische Belichtungszeiteinstellung der Software versagt hier gelegentlich, wenn auf dem Transducer Stellen mit sehr hoher Reflektivität (z.B. kleine Luftblasen) vorhanden sind. Für die folgenden Messungen wurde daher die Belichtungszeit jeweils manuell optimiert.

Die Drift des Systems ist selbst bei Lampenschwankungen durch den Vorteil der Simultanreferenzierung sehr gering, im Bereich von < 50 pm/h.

4.1.1.4 Maskenerstellung an Mikroarrays

Mit der Software „Screening“ lassen sich sehr einfach Masken aus Kamerabildern mit getropften Arrays erstellen. Die Software erkennt aus dem Hell-Dunkel Kontrast die Begrenzung der Messpunkte und kann diese auswerten. Für die Charakterisierungsmessungen wurden allerdings quadratische Messpunkte gewählt, wie sie in Abbildung 30 gezeigt sind, um reproduzierbare Messpunktgrößen zu erhalten.

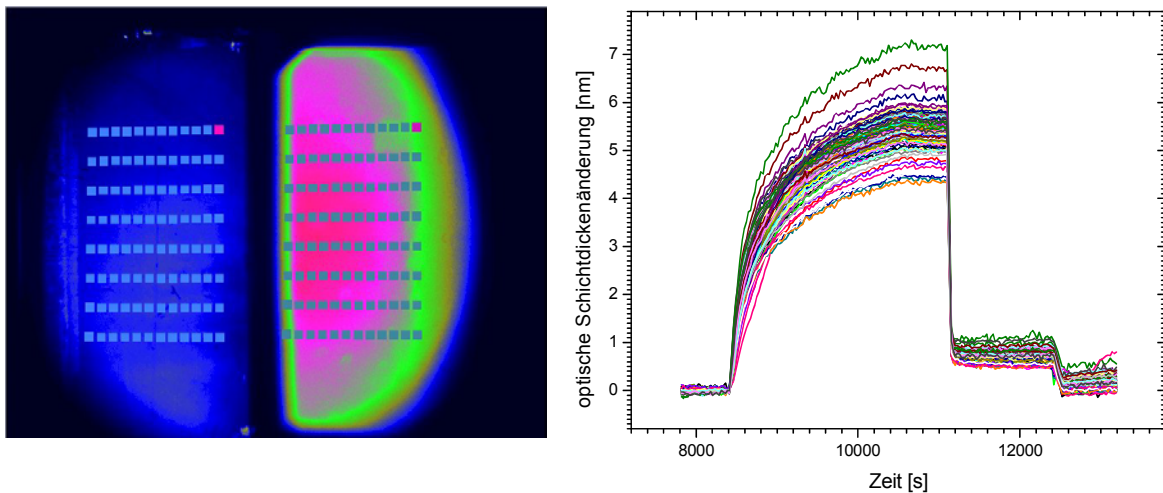


Abbildung 30 Bild der Auswertemaske auf einer homogenen Detektionsfläche links (Referenzspots rechts, Detektionssots links). Rechts die dazugehörigen Messkurven einer Antikörpermessung, die im 4.2.4.1 noch diskutiert werden wird.

Getropfte Arrays auf AMD Oberflächen ergeben im Mittel ca. 250 μm große Spots auf teilhydrophilen Oberflächen wie z.B. Aminodextranoberflächen. Diese enthalten auf dem Kamerabild nach der Maskenerkennung immerhin zwischen 270 und 300 Pixel pro Spot. Das gemessene Abbildungsverhältnis beträgt 17:24. Gegenüber der zuvor verwendeten Kamera (256 x 256 Pixel, 8 Bit) ergibt dies einen Vorteil von über 200 Pixel pro Mikrospot (s.o.). Legt man für das ursprüngliche System dieselbe Kameralleistung zugrunde (gekühlte 12 Bit Kamera) ergäbe das etwa das halbe Rauschen. Gleichzeitig ist das Dunkelrauschen der neuen Kamera aber nicht der rauschbestimmende Faktor, da (wie später besprochen) nicht der volle Effekt einer gekühlten Kamera auf diesem Laboraufbau umgesetzt werden kann. Diese Einschränkung ergibt sich aus der oben erwähnten mechanischen Einschränkung des eingesetzten Filterrades zur Wellenlängeselektion.

4.1.1.5 Leistungsfähigkeit des Detektionssystems

Theoretische Überlegungen zum Einfluss der ausgewerteten Pixelzahl auf die Leistungsfähigkeit des Detektionssystems sollten aufzeigen, mit welchen Parametern Vergleiche zu Standardmethoden wie Fluoreszenzdetektion mit einer markierungsfreier Detektion an Mikroarrays zu ziehen waren.

Vergleicht man die Methode, Fluoreszenzbilder (von DNA-Mikroarrays) mit CCD-Kameras auszuwerten mit der für RIfS eingesetzten Methode, so sind die grundsätzlichen Parameter, welche die Qualität der Messung ausmachen, zunächst einmal gleich. Die Nachweisgrenze der Systeme ist jeweils durch das Signal zu Rauschverhältnis begrenzt. Geht man nun davon aus, dass die Signal zu Rauschverhältnisse bei einer Fluoreszenzdetektion durch den Hintergrund bestimmt wird, so kann dieses Verhältnis auch bei Erhöhung der Integrationszeiten nicht verbessert werden. Die Intensitätsmessung wird also durch Miniaturisierung verschlechtert, was in Abbildung 31 schematisch für zwei Messpunkte mit Durchmesser 2 mm bzw. 200 μm dargestellt ist. Erhöht man nun die Integrationszeit um den gleichen Faktor, um den die Intensität reduziert ist, so erhält man theoretisch beim kleineren Messpunkt die gleichen Rauschwerte, wie beim größeren.

Nun soll eine zeitabhängige Messung betrachtet werden, wie sie bei der Reflektometrischen Interferenzspektroskopie üblich ist. Der optimale Messablauf erzeugt ein Interferogramm (=Messwert) pro Zeiteinheit der Integrationszeit (z.B. 100 ms). Dies ist im Gegensatz zur Fluoreszenzmessung unabhängig von der betrachteten Spotgröße. Während man also bei der Fluoreszenzmessung im genannten Beispiel etwa 100 mal seltener messen kann, ändert sich bei RIfS bei der Miniaturisierung die Messzeit nicht. In unserem Beispiel erhalten wir für die RIfS dadurch einen Vorteil um einen Faktor 10 bei der Miniaturisierung eines Messpunktes von 2 mm auf 200 μm . Gleichzeitig bleibt die gemessene optische Schichtdickenänderung gleich, da diese nicht von der Spotgröße abhängt.

Betrachtung der Fläche eines Spots auf dem Array:		<u>Verhältnis</u>	
Durchmesser des spots	2 mm	10 : 1	200 µm
Fläche	3,14 mm ²	100 : 1	0,0314 mm ²
Anzahl Pixel auf CCD-Kamera	160	1 : 1	160
Lichtintensität / Ausleuchtung RfS		1 : 1	
Fluoreszenzintensität		100 : 1	
Signal : Rausch - Verhältnis, Fluoreszenz		100 : 1 (oder 100 fache Integrationszeit)	
Zeitaufgelöste Messung, Fluoreszenz		10 : 1 (da Faktor 100 seltener gemessen wird)	
Zeitaufgelöste Messung RfS, optische Schichtdickenänderung		1 : 1 (Schichtdickenänderung ist unabhängig von ausgeleuchteter Fläche)	

Abbildung 31 Miniaturisierung der Spotgrößen eines Mikroarrays. Vergleich der Fluoreszenzmessung mit RfS bei zeitaufgelösten Messungen.

4.1.2 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Ziel der Arbeiten in diesem Abschnitt war es, den Mikroarray-RfS-Aufbau durch geeignete Modifikationen für die Messung von Hybridisierung von Oligonukleotiden verwendbar zu machen. Dies gelang durch den Ersatz entscheidender Komponenten des Aufbaus. Gleichzeitig konnte eine benutzerfreundliche Software für die Echtzeit-Verfolgung der Messungen an das Gerät angepasst werden. Die Verbesserung der Detektion am RfS-Mikroarray-Aufbau ergibt sich aus den oben gemachten Voraussagen für das umgebaute Gerät. Der erwartete Gewinn beim Rauschen wird durch die Kühlung der Kamera auf etwa einen Faktor zwei geschätzt. Die größere Anzahl auswertbarer Pixel pro Spot, bedingt durch die größere absolute Pixelzahl berechnet sich auf einen Faktor 1,7.

4.2 Oberflächen für die markierungsfreie Detektion auf Mikroarrays

4.2.1 Haltbarkeit und Stabilität von immobilisierten Sonden

Die Bedeutung, die bei markierungsfreien Nachweismethoden an Oberflächen der Immobilisierungschemie und der Vorbehandlung der Oberfläche zukommt, ist vielfach beschrieben worden und leitet sich aus einigen wenigen Grundprinzipien ab. Erstens wird eine maximale spezifische Wechselwirkungskapazität (meist in Molekülen oder Mol pro Fläche angegeben) gefordert, die gleichzeitig von einer möglichst niedrigen Neigung zur unspezifischen Adsorption von Teilchen aus dem Analysengemisch begleitet werden sollte. Weiterhin sollen die Oberflächen für Biosensormessungen meist für mehr als eine Messung

eingesetzt werden, müssen also nach dem Bindungsereignis regeneriert werden. Da hierzu oft drastische Veränderungen im pH-Wert, der Salzkonzentration oder biochemischen Eigenschaften (Zusatz von Enzymen o.ä.) eingesetzt werden, müssen die Oberflächen und die kovalent gebundenen Sonden solche Bedingungen möglichst lange bzw. häufig unbeschadet überstehen, nach der Regeneration mit möglichst gleicher Bindungskapazität wieder einsatzfähig sein und reproduzierbare Ergebnisse liefern.

Eine ganze Reihe von Optimierungen hinsichtlich des Einsatzes von Glasoberflächen für die RIfS sind bereits in anderen Arbeiten beschrieben worden. Hier soll im Wesentlichen auf die Technik zur Aufbringung von Oligonukleotiden und die Eignung zum Einsatz in miniaturisierten Arrays eingegangen werden.

4.2.2 Immobilisierungsstrategien

Im Allgemeinen kommt es bei der Immobilisierung von Oligonukleotiden oder anderen Biomolekülen auf Oberflächen zu zwei verschiedenen Situationen. Entweder erreicht man durch geeignete Oberflächenchemie eine Anordnung als zweidimensionale Monoschicht oder man erhält eine mehr oder weniger verzweigte räumliche Struktur. Während erstere im Mittel in der Lage sein wird, eine Monolage an Bindungspartnern an der Oberfläche zu binden, kann bei letzterer die Möglichkeit bestehen, dass sich mehr als eine Monolage eines Bindungspartners an die Oberfläche binden lässt. Diese Eigenschaft, allgemeiner vielleicht als absolute Bindungskapazität zu bezeichnen, lässt sich nun dafür ausnutzen, gezielt zu steuern, welche Ziele mit der Oberflächenreaktion verfolgt werden sollen. Kommt es beispielsweise auf eine hohe absolute Bindungskapazität an, dann lässt sich eine schwerere Zugänglichkeit der Oberflächenbindungsstellen sicher verkraften und durch Verlängerung der Einwirkzeit ausgleichen. Interessiert man sich jedoch für die Kinetik der Wechselwirkung, so darf die Matrix der immobilisierten Moleküle darauf keinen Einfluss haben. Man möchte möglichst die Kinetik ohne Oberflächeneinflüsse beobachten. Hierfür sind niedriger beladene Oberflächen und gleichmäßig zugängliche Bindungsstellen am geeignetsten (vgl. dazu auch [Glaser, 1993] und [Piehler 1997]).

Ein weiteres Kriterium einer erfolgreichen Oberflächenmodifikation ist die Tatsache, dass die Oberfläche in der Lage sein muss, bei einem Bindungsexperiment spezifische von unspezifischen Wechselwirkungen zu diskriminieren. Was also bei einem markierten Detektionsverfahren vom entsprechenden Label (Fluoreszenzfarbstoff, Radioaktive

Substituenten) erreicht wird, muss im markierungsfreien Detektionssystem von der jeweiligen Oberfläche sichergestellt werden. Diese Abschirmung unspezifischer Bindung muss von Experiment zu Experiment optimiert werden, da die Wechselwirkung der verwendeten Matrix, z.B. Dextrane, Glykole, aminofunktionalisierte Dendrimere mit der jeweiligen Molekülklasse unterschiedlich ist. Für DNA, die ja im Phosphat-Rückgrat negative Ladungen trägt ist es z.B. von Vorteil, ebenfalls negativ geladene Matrices zu verwenden, während diese Vorgehensweise z.B. für Antikörper oder PNA-Moleküle nicht notwendigerweise von Vorteil ist.

In dieser Arbeit wurden im Wesentlichen zwei unterschiedliche Ansätze zur Oberflächenmodifikation verglichen, der „Tübinger“ Ansatz und der vom Projektpartner entwickelte „Bremer“ Ansatz [Benters, 2001]. Im „Tübinger“ Ansatz kommt eine Dextranschicht zum Einsatz, welche nach dem im Methodenteil beschriebenen Verfahren über ein Epoxisilan immobilisiert wird. Dieses Dextran wird mit Aktivestergruppen versehen, welche die Immobilisierung von aminofunktionalisierten Oligonukleotiden (DNA oder PNA) erlauben. Die Schicht ist für RfS optimiert und erlaubt eine etwa 5-fach höhere Oberflächenbeladung als eine normale 2D-Schicht. Durch ihre Hydrophilie ergeben sich beim Spotten auf diese Oberfläche Punkte von etwa 250 μm Durchmesser. Bei der Fluoreszenzmessung zeigt sich ein sog. Donateffekt, wie in folgender Abbildung 32 zu sehen ist. Die AMD-GA Oberflächen sind dabei nach Aktivierung und Immobilisierung von Oligonukleotid (in 8 verschiedenen Konzentrationen von links nach rechts) mit 1 nmol/l Cy-5 markiertem, komplementärem Oligonukleotid hybridisiert worden. Die Detektion erfolgte mit einem Axxon (pmt500) Chemolumineszenzreader.

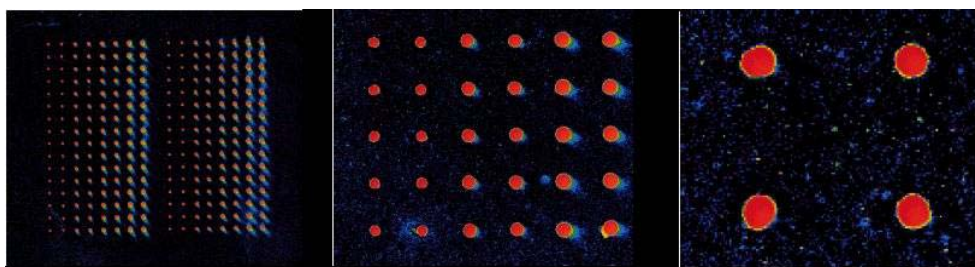


Abbildung 32 Getropftes Mikroarray of Dextranoberflächen in verschiedenen Zoomstufen von links nach rechts. Deutlich ist die Konzentrationsabhängigkeit von links nach rechts zu erkennen. "Donutbildung" aufgrund der hydrophilen Oberfläche ist ganz rechts in der höchsten Zoomstufe zu sehen.

Man erhält ein einheitliches Fluoreszenzbild mit gut auswertbaren und diskriminierbaren Spots. Die Dextranoberfläche ist also auch für die Fluoreszenzauswertung geeignet und kann

ihren Vorteil der hohen Hybridisierungskapazität hier ausspielen. Allerdings ist die Oberfläche für RfS optimiert und wurde daher auch mit RfS charakterisiert.

Gleichzeitig wurde die Charakterisierung mit einer „Bremer“ Oberfläche zur Vergleich durchgeführt. Die Ergebnisse des Gesamtvergleichs sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die Besonderheit des Bremer Ansatzes ist der Einsatz von dendrimeren Strukturen zur Verbesserung der Bindungskapazität der Oberfläche. Der Effekt ist allerdings nicht so ausgeprägt wie bei den Dextranoberflächen. So erhält man bei RfS-Mesungen auf den Dendrimer Oberflächen nur eine Gleichgewichtsbeladung von 0,6 nm während die Dextranoberfläche 2,3 nm erreicht.

Tabelle 2 Vergleich der Immobilisierungsstrategien

	Bremer Ansatz [Benters et. al. 2001]	Tübinger Ansatz
Grundchemie	Dendrimere	Aminodextran
Hybridisierungskapazität RfS	0,6 nm	2,3 nm
Eignung für Fluoreszenzmessungen	sehr gut	Geeignet
Regeneration	NaOH, pH 14	HCl, pH 1,5
Anzahl Regenerationen	nicht bek.	300
Lagerfähigkeit	nicht bek.	0,5 Jahre
Eignung für Spotter	Gut	Gut
Unspezifische Wechselwirkung	Gut	Nicht detektierbar
Eignung für Proteinimmobilisierung, z.B. Streptavidin	Sehr gut	Sehr gut

Zusammenfassend erwies sich beim Vergleich der Dendrimer- mit der Dextran-Chemie jede für sich jeweils für ihren Einsatzzweck optimiert. Das bedeutet, dass für homogene Spots für die Fluoreszenzauswertung die Dendrimerchemie optimal war und für die RfS war vor allem durch die deutlich höhere Hybridisierungskapazität die Tübinger Dextran-Chemie besser geeignet.

4.2.2.1 PNA als immobilisierte Sonde⁴

Zur spezifischen Erkennung von Oligonukleotidsequenzen und damit realistischer Abbildung der tatsächlichen Bindungsereignissen und der Unterscheidung von unspezifischen Bindungsereignissen wurde Mitte der 90er Jahre die PNA als eine Art DNA-Mimetikum bekannt. Zur Hybridisierung mit natürlichen DNA-Molekülen in eingeschränktem Maße (d.h. in der Länge von Oligonukleotiden bis wenigen hundert Basen Länge) befähigt weist diese synthetisch leicht zugängliche Substanz einige vorteilhafte Eigenschaften auf, die sie auch für den Einsatz auf Biosensoroberflächen und letztlich für Mikroarrays interessant machen. Im Einzelnen wurden diese Vorteile bereits in Kapitel 2.2.1.3 ausführlich besprochen. Es handelt sich kurz um die verbesserte Affinität bei gleichzeitig ungeladenem Rückgrat.

Es sollte durch ein Titrationsexperiment gezeigt werden, dass diese Vorteile auch auf das RfS-Biosensorsystem übertragbar und damit für diese Art von Experimenten nutzbar sein würde. Hierzu wurden DNA-Oligonukleotide an einer RfS-Oberfläche immobilisiert und es wurde ein sogenannter Bindungshemmtest durchgeführt. Dieser erlaubt es, bei verschiedenen Konzentrationen an komplementärer PNA die jeweils verbleibende freie Konzentration an DNA-Oligonukleotid durch Bindung an die Oberfläche zu bestimmen. Trägt man die gemessenen Konzentrationen gegen die eingesetzte inhibierende Konzentration an PNA auf, so lässt sich aus diesem Experiment die Affinität der PNA zur DNA für diese spezifische Sequenz ermitteln. Das Ergebnis dieser Messung ist in Abbildung 33 dargestellt. Zur Anpassung der parametrisierten Gleichung zur Bestimmung der Bindungskonstanten wurde das Programm Origin (Microcal, Ver. 5.0) verwendet.

⁴ Die Arbeiten in diesem Kapitel sind in enger Zusammenarbeit mit Frau Kerstin Kröger, Ak Gauglitz ausgeführt worden.

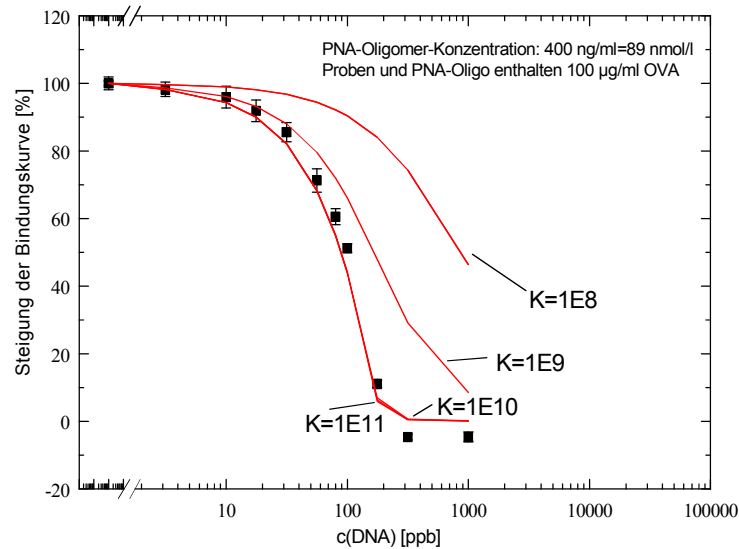


Abbildung 33 Titration von DNA mit PNA-Oligonukleotiden und Auswertung durch Simulation der Affinitätswerte.

Ebenfalls in der Abbildung gezeigt, sind simulierte Affinitätskurven für 10^8 bis 10^{11} L/Mol für gleiche Konzentrationsverhältnisse. Der tatsächliche Kurvenverlauf der Messung liegt deutlich zwischen 10^{10} und 10^{11} L/Mol. Ausgehend von dieser Tatsache kann von einer minimalen Affinität von 10^{10} L/Mol für die 15mere PNA-Oligonukleotid zu 21mer DNA-Oligonukleotid ausgegangen werden was in der Tat deutlich höher liegt als beispielsweise gefundene Affinitätswerte in [Sauer et. al. 1999] von maximal 10^8 L/Mol für 15-mere oder den in Kapitel 4.2.3.2 gemessenen ca. 10^9 L/Mol für antisense-Oligonukleotide.

Für die Charakterisierung des Verhaltens von PNA an einer Biosensor oder Mikroarray-Oberfläche eignet sich die Messung von Assoziations- und Dissoziationskinetiken. Also wurden kinetische Messungen mit DNA auf PNA-Oberflächen in Abhängigkeit von der Konzentration durchgeführt. Die Ergebnisse der monoexponentiellen Anpassung der jeweiligen Assoziationsphasen der Bindungskurven sind in Abbildung 34 in Abhängigkeit von der Konzentration aufgetragen. Die Steigung der Geraden liefert die Assoziationsratenkonstante, der Achsenabschnitt die Dissoziationsratenkonstante.

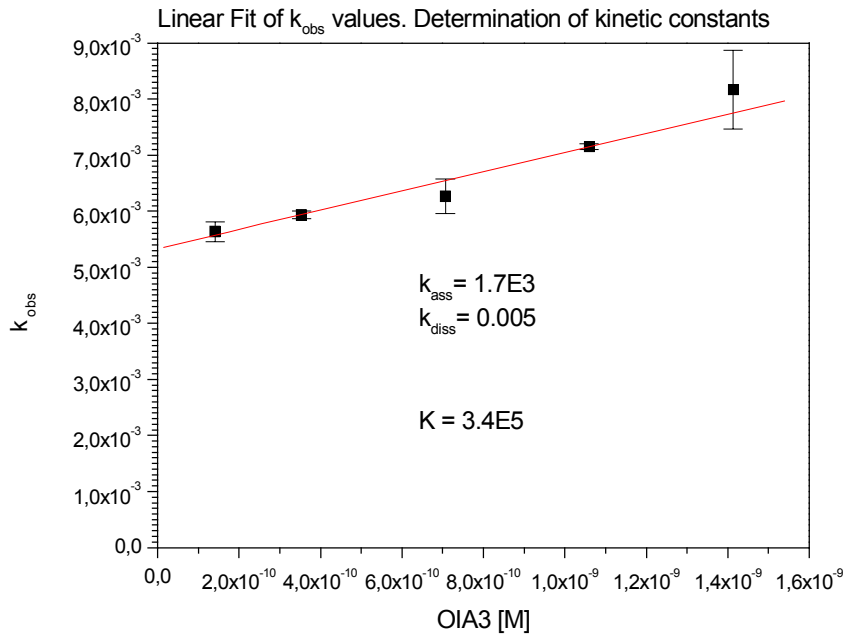


Abbildung 34 Kinetische Konstanten von DNA-PNA Wechselwirkung an einer Oberfläche.

Als Ergebnis erhält man eine niedrige Assoziationsratenkonstante und eine ungewöhnlich niedrige Dissoziationsratenkonstante. Die gemessene Affinität ist zwar nicht im erwarteten Größenordnungsbereich, aber immerhin erwartungsgemäß höher als bei reiner DNA-DNA-Oligonukleotid Hybridisierung an einer Oberfläche. Die Effekte der dreidimensionalen Dextranoberflächen kommen hier zum Tragen. Das heißt die gemessenen Kinetiken sind immer als eine Kombination aus Diffusion zur Oberfläche, Oberflächenbindung, Diffusion in die 3D-Matrix, Bindung in der 3D-Matrix zu betrachten. Dies ist ein Argument dafür, kritische kinetische und thermodynamische Parameter in homogener Phase statt an der Oberfläche zu bestimmen. Nähere Untersuchungen hierzu sind in den Kapiteln 4.2.3.2 und 4.2.3.3 gemacht worden. Beim vorliegenden Versuch kann allerdings deutlich an den sehr niedrigen, beobachteten Dissoziationsratenkonstanten erkannt werden, dass es sich hier um eine höher affine Bindung handelt, als diejenige zwischen entsprechenden DNA-Oligonukleotiden. Damit werden PNA-Oberflächen und auch PNA-Sonden für den Einsatz auf RIFs-Mikroarrays von ihren kinetischen und thermodynamischen Eigenschaften her als geeignet erachtet.

Im Folgenden soll dargestellt werden, welche besonderen Eigenschaften die Oberflächen für eine markierungsfreie Detektion mit RIFs durch die Verwendung von PNA-Oligonukleotiden erhalten. Eine Reihe von Experimenten wurde dazu durchgeführt, die nicht nur die Immobilisierung der PNA sondern auch ihre Hybridisierung an immobilisierte DNA-Oligonukleotide besser veranschaulichen und erklären sollen.

Zunächst wurden Oberflächen untersucht, welche mit Aminodextran und DNA-Oligonukleotiden modifiziert waren. Die Oberfläche wurde mit 10 µg/ml komplementärem DNA- sowie PNA-Oligonukleotid beladen und die jeweils erzielte Maximalbeladung verglichen. Abbildung 35 zeigt, dass die beobachtete optische Schichtdickenänderung für das PNA-Oligonukleotid mit 6,5 nm deutlich höher ausfällt, als beim DNA-Oligonukleotid mit ca. 2,3 nm unter gleichen Bedingungen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die PNA aufgrund ihres ungeladenen Rückgrats auch die Bindungsstellen im „Inneren“ der Dextranschicht besser erreichen kann als die DNA, welche durch ihre negative Ladung vom hauptsächlich negativ geladenen Dextran abgestoßen wird.

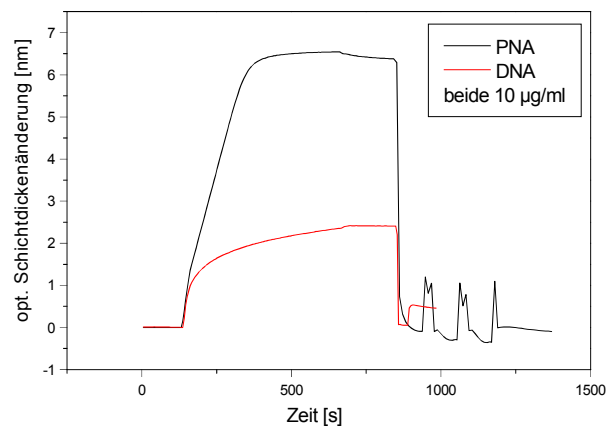


Abbildung 35 DNA-Oberfläche immobilisiert auf AMD. Die Hybridisierung mit komplementärer DNA und PNA wird verglichen.

Andererseits ist diese Abstoßung der DNA-Oligonukleotide aufgrund der Ladung möglicherweise der Grund für die gefundene Spezifität der Hybridisierungsmessung auf Dextran-Oberflächen. Daher wurde im folgenden Experiment untersucht, ob die PNA unspezifisch an die Dextran Matrix bindet. Dazu wurden 10 µg/ml komplementäre und nicht komplementäre PNA-Lösung injiziert und die Beladungen verglichen. In Abbildung 36 ist das vergleichende Ergebnis dieses Versuchs dargestellt. Amn erkennt, dass die PNA-Bindung spezifisch ist, da bei der Injektion des nicht-komplementären Stranges keine Bindung zu beobachten ist.

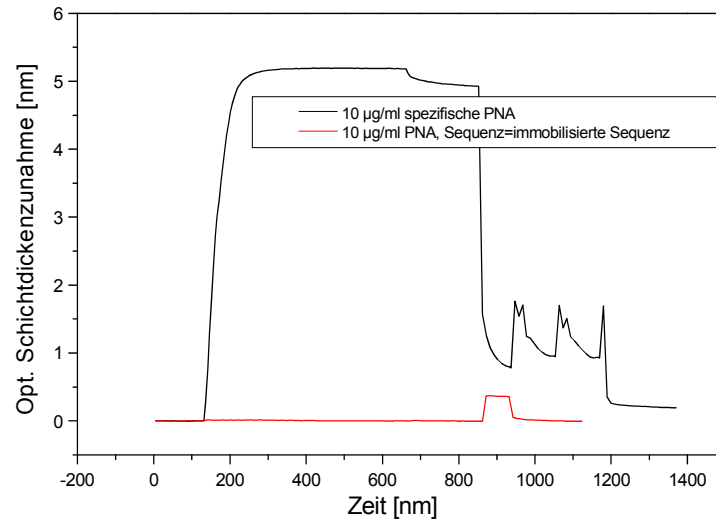


Abbildung 36 Die Spezifität der PNA/DNA Hybridisierung konnte durch Verwendung eines unspezifischen Stranges nachgewiesen werden.

Die weiteren Untersuchungen konzentrierten sich auf das Immobilisieren von PNA-Oligonukleotiden (mit zwei Glycol-Spacern ausgestattet und mit einer Aminogruppe funktionalisiert), um die Eigenschaften dieser Oberflächen direkt nachweisen zu können. Nicht zuletzt ist es eine vielversprechende Idee, sehr stabile Oberflächen mit den gleichen spezifischen Eigenschaften von DNA-Oligonukleotiden für den Gensensor herstellen zu können und damit die Standzeiten und Reproduzierbarkeit zu verbessern.

Bei den Versuchen stellte sich zunächst heraus, dass die geringe Löslichkeit der PNA im Vergleich zur DNA im Immobilisierungspuffer ein großes Hindernis bei der Immobilisierung ist. Während DNA bei einer Konzentration von ca. 1-2 mg/ml immobilisiert wird ist bei der PNA nur ca. ein Zehntel dieser Konzentration erreichbar. Die Schwierigkeiten mit gesättigten PNA Lösungen zu immobilisieren ergeben eine deutlich geringere Beladungsdichte der hergestellten Oberflächen. Dies ist in Abbildung 37 dargestellt. Im Vergleich zum umgekehrten Experiment mit DNA-Oberflächen (Abbildung 35) erhält man wesentlich geringere Hybridisierungskapazitäten für beide Sonden, nämlich etwa 0,4 nm für DNA und 4 nm für PNA. Dabei bleibt die Spezifität der Bindung und auch die bereits beobachtete Überlegenheit der PNA-Hybridisierung gegenüber DNA an PNA-Oberflächen erhalten.

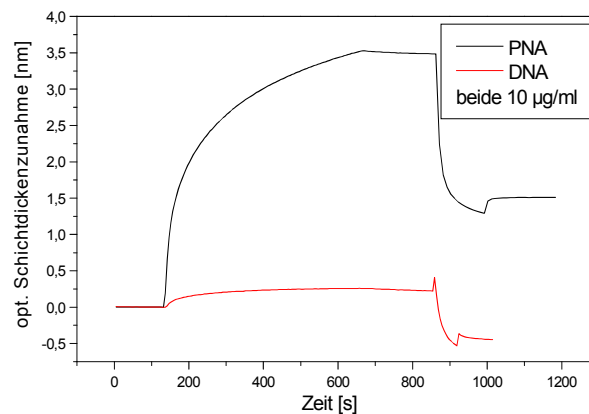


Abbildung 37 Das gleiche Experiment auf PNA-modifizierten Oberflächen verdeutlicht die niedrigere Hybridisierungskapazität. Die PNA-Hybridisierung liegt dennoch höher als die DNA-Hybridisierung in diesem Fall um ca. einen Faktor 10.

Die beiden Experimente zu den Beladungsdichten von PNA und DNA-Oberflächen wurden nun noch mit Polyethylenglycol (PEG)-Oberflächen durchgeführt auf denen PNA-Oligonukleotid immobilisiert worden war, um den Einfluss der Dextranmatrix auf die Hybridisierung zu verdeutlichen. Bei den PEG-Oberflächen handelt es sich um reine 2D-Oberflächen. Alle Bindungsstellen sind an der Oberfläche der Schicht angeordnet und gleichermaßen für eine Bindung zugänglich. Hier erhält man die Situation, dass die PNA-Bindung etwa 3 mal höher als die DNA-Bindung ist, allerdings auf sehr viel niedrigerem Niveau von 200 pm (DNA) bis 600 pm (PNA). Die Daten sind hier nicht gezeigt. Vergleichend sind in der folgenden Tabelle die Ergebnisse der Beladungsstudien nochmals zusammengefasst.

Tabelle 3 Beladungsexperimente von PNA und DNA-Oligonukleotiden auf Dextran- und PEG-Oberflächen und immobilisierter PNA und DNA.

Oberflächen →	Dextran-DNA-Oberfläche	Dextran-PNA-Oberfläche	PEG-PNA-Oberfläche
Hybridisierung			
von spezifischer DNA	2,3 nm	0,4 nm	0,2 nm
von unspezifischer DNA (Kontrolle)	0 nm	0 nm	-
von spezifischer PNA	6,5 nm	4 nm	0,6 nm
von unspezifischer PNA (Kontrolle)	0 nm	0 nm	-

Zusammenfassung und Diskussion der Bindungsuntersuchungen

Auf Dextran-Oberflächen mit immobilisierten DNA-Oligonukleotiden ist die beobachtete Gleichgewichtsbeladung für PNA etwa drei Mal höher, als für DNA-Oligonukleotide bei gleicher Konzentration. Mit immobilisierter PNA liegt die beobachtete Gleichgewichtsbeladung für PNA Oligonukleotide sogar zehnmal höher als bei DNA-Oligonukleotiden. Allerdings auf niedrigerem Niveau als bei DNA Oberflächen. Auf Polyethylenglycol-Oberflächen ist dieser große Effekt nicht zu beobachten; hier ist die Überlegenheit der PNA-Hybridisierung nur etwa ein Faktor drei.

Die beobachtete, dreifach höhere Gleichgewichtsbeladung kann der literaturbekannten und auch auf RfS nachgewiesenen höheren Affinität von PNA zu komplementärer DNA zugeschrieben werden. Was hingegen die zehnfache Zunahme der Gleichgewichtsbeladung betrifft, so kann diese nur bei dreidimensionalen AMD und nicht bei quasi-zweidimensionalen Oberflächen wie PEG beobachtet werden. Dies lässt den Schluss zu, dass die unterschiedliche Zugänglichkeit der dreidimensionalen Matrix des Dextrans das jeweilige Bindungsverhalten bestimmt. Das ungeladene PNA Teilchen diffundiert stärker in die geladene Matrix ein, als das negativ geladene DNA-Oligonukleotid. Ein Randaspekt hierbei ist allerdings, die dadurch erhaltene Spezifität. Zunächst eher abgestoßene Teilchen binden im Mittel praktisch ausschließlich an spezifische Bindungsplätze, während unspezifische Bindung durch die Abstoßung unterdrückt wird. Dies kann eine wertvolle Optimierungshilfe beim Design von Mikroarrays darstellen, da die Hybridisierung "von sich aus" stringenter erfolgen kann. Allerdings konnten zumindest bei diesen PNA-Bindungsversuchen mit

entsprechend nicht-komplementärer PNA (und DNA) auch auf dreidimensionalen AMD-Oberflächen keine unspezifischen Wechselwirkungen beobachtet werden, was in Abbildung 36 gezeigt werden konnte.

Stabilität und Lagerfähigkeit

Die Anwendung für Biosensoroberflächen im Dauerbetrieb erfordert außerdem eine gute Stabilität, Lagerfähigkeit und Haltbarkeit der funktionalisierten Oberflächen. Von PNA wird erwartet, dass sie diese Eigenschaften durch ihre geringere Empfindlichkeit auf natürliche Degradationsagenzien (Nukleasen, Proteasen etc.) positiv beeinflusst. In den folgenden Untersuchungen sollte gezeigt werden, dass die PNA auf Oberflächen den Anforderungen an ein Gensensor Experiment genügt, also dass mehrere Regenerationszyklen hintereinander durchgeführt werden können und dabei keine wesentliche Beeinträchtigung der Reproduzierbarkeit von Messungen auftritt. Dafür wurden mehrfache Regenerationen hintereinander durchgeführt und die Gleichgewichtsbeladung nach jedem zehnten Regenerationszyklus kontrolliert. In den nachfolgenden Abbildung 39 sind die Ergebnisse von Stabilitätsuntersuchungen für vier solcher Regenerationszyklen an PNA-Oberflächen im Vergleich zu entsprechenden DNA Oberflächen zusammengefasst.

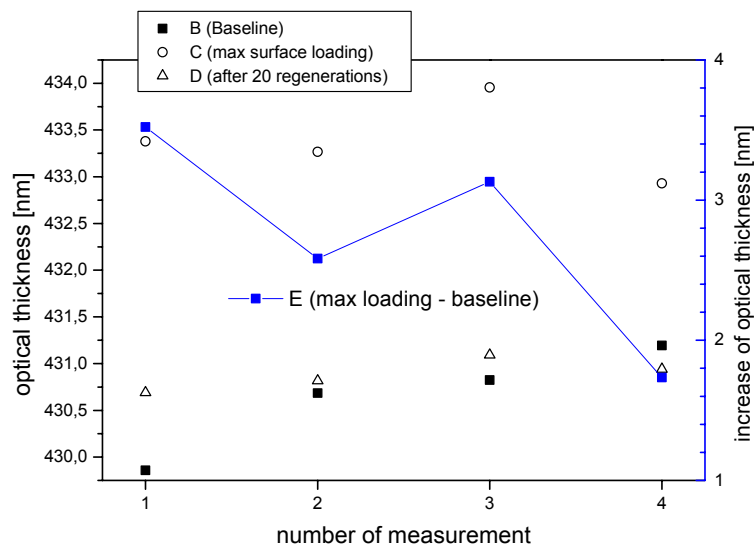


Abbildung 39 Regenerationsstabilität von PNA Oberflächen bei mehrfacher Regeneration.

PNA-Oberflächen lassen sich schwerer nach der Hybridisierung regenerieren. Dies zeigte dieses Experiment durch eine Abnahme der Hybridisierungskapazität von Regeneration zu

Regeneration. Die Regeneration wurde daher für PNA Oberflächen bei den nachfolgenden Experimenten unter etwas härteren Bedingungen durchgeführt (pH 1,2 statt 1,7).

Die Experimente wurden für einen längeren Zeitraum mit mehr Regenerationszyklen wiederholt und auf andere Regenerationsbedingungen ausgeweitet. Die folgende Abbildung 40 zeigt die Ergebnisse für Regenerationszyklen mit pH-Änderung (für PNA Regeneration ist ein niedrigerer pH von 1,2 verglichen mit 1,7 für DNA erforderlich) und unter denaturierenden Bedingungen (Guanidiniumchlorid/Harnstoff).

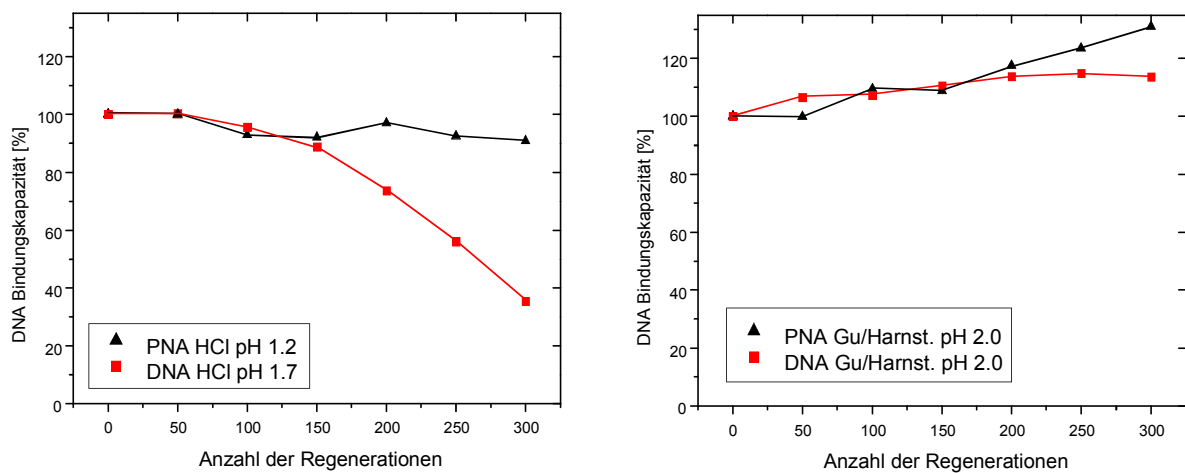


Abbildung 40 Regenerationsstabilität bei häufiger Regeneration. Links Regeneration mit HCl bei pH 1,7 (1,2 für PNA) und rechts mit Guanidinium/Harnstoff bei pH 2.0

Wie man deutlich erkennt, sind beide Oberflächen deutlich stabiler als man erwarten könnte. Die DNA-Oberflächen überstehen pH 7 ohne wesentliche Veränderung der Bindungseigenschaften für ca. 150 Regenerationen. Allerdings übertrifft die PNA-Oberfläche die DNA-Oberfläche noch bei weitem in der Regenerationsstabilität unter harten pH-Bedingungen. Unter denaturierenden Bedingungen waren beide Oberflächen gleichwertig gut geeignet.

Die Lagerstabilität der PNA und DNA-Oberflächen in der Laborumgebung wurde bei offener Lagerung in der Laborumgebung über mehrere Wochen verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 41 dargestellt.

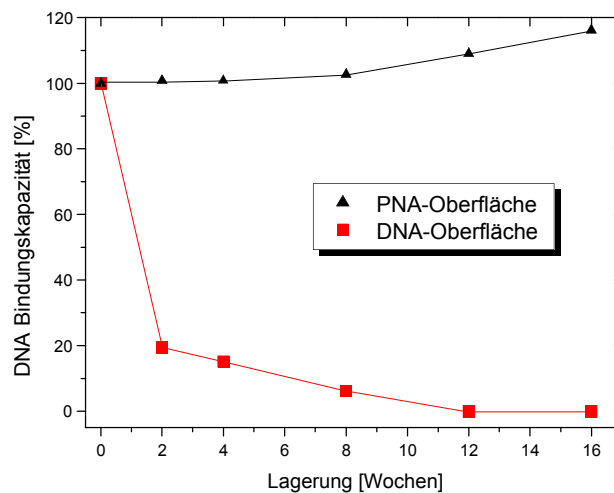


Abbildung 41 Lange Lagerstabilität von PNA Oberflächen im Vergleich zu immobilisierten DNA Sonden unter Laborbedingungen, d.h. ungekühlt, offen etc. (Abbildung aus [Kröger 2003] mit freundlicher Genehmigung)

Es zeigt sich, dass unter den gleichen Bedingungen PNA Oberflächen wesentlich stabiler und haltbarer waren. Dies wird im Wesentlichen auf Nukleaseaktivität zurückgeführt.

Zusammenfassung

Zusammenfassend sind die erzielten Ergebnisse sowohl für DNA als auch für PNA Oberflächen bei weitem ausreichend, um die Anforderungen an ein Mikroarray Experiment zu erfüllen. Die Experimente gaben außerdem noch wertvolle wissenschaftlichen Aufschluss über das Verhalten der Zwischenschichten Dextran und PEG in Standard Biosensorexperimenten. Die Ladung als entscheidender Faktor regelt die Zugänglichkeit der Bindungsstellen im Dextran. Mit PNA konnten daher aufgrund seines neutralen Rückgrats erheblich höhere Beladungsdichten erzielt werden als mit vergleichbaren DNA-Sequenzen. Dies ist für eine spätere Gensensoranwendung von entscheidender Bedeutung, da die Beladungsdichte der Oberfläche letztlich die Nachweisgrenze des RIFS-Mikroarrays bestimmt.

Die Stabilität der untersuchten Oberflächen lässt sogar den Dauereinsatz, etwa in einem Routinelabor, für sehr viele Messungen mit einem Array möglich erscheinen. Dies könnte beispielsweise den bestehenden Kostendruck von Mikroarrayexperimenten nehmen und diese in neue Anwendungsbereiche z.B. der zeitabhängigen Genexpressionsstudien oder des online-Monitorings von Produktionsabläufen führen.

Die Ergebnisse wurden in der Arbeit von [Kröger, 2003] verifiziert, ausführlich weiter verfolgt und zur Anwendung gebracht [Kröger et. al. 2002]. Dabei ergaben sich z.T. sogar

noch höhere Zahlen für Regenerationszyklen sowie längere Lagerstabilitäten unter härteren Bedingungen.

4.2.2.2 Ortsaufgelöste Immobilisierungstechniken

Für Mikroarrays wird eine Immobilisierungsmethode benötigt, die es ermöglicht, eine Vielzahl von Sonden auf einer Oberfläche ortsaufgelöst zu immobilisieren. Der Vorgang sollte automatisierbar sein, um die Reproduzierbarkeit zu gewährleisten.

Im Folgenden soll die Frage beleuchtet werden, auf welchen Effekt der eingangs erwähnte Vorteil der Immobilisierung mit "Microdrop" gegenüber der herkömmlichen nasschemischen Immobilisierungsmethode für aminofunktionalisierte Oligonukleotide, zurückzuführen ist. Als entscheidende Parameter kommen dafür im Grunde nur die sehr kleinen Tröpfchen oder die Erhitzung der Oberflächen aus ca. 40°C in Frage. Hierzu wurde zunächst beispielhaft verglichen, wie sich diese beiden Techniken der Immobilisierung auf einem Einkanal-Transducer auf die Hybridisierungseffizienz (gemessen anhand der Gleichgewichtsbeladung) auswirken. Dafür wurde auf die nach der selben Methode vorbereiteten, aktivierten Transducer mit Microdrop und manuell aminofunktionalisiertes Oligonukleotid aufgetropft. Die Bestimmung der unspezifischen Bindung erfolgte im RfS-Einkanalaufbau durch Injektion von nicht-komplementärer, unspezifischer DNA, die Beladungsdichte wurde mit dem entsprechenden komplementären DNA-Oligonukleotid bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 42 vergleichend dargestellt. Im vorderen Abschnitt der Messung zwischen 200 und 700 Sekunden erkennt man die Injektion der unspezifischen Sequenz. Beide Immobilisierungsmethoden ergeben erwartungsgemäß eine sehr niedrige unspezifische Bindung, wie bereits im vorigen Kapitel festgestellt wurde. Bei den spezifischen Bindungen kommt es zum Teil zu Unterschieden in der Ansprechkinetik. Außerdem sieht man eine Streuung der Maximalbeladung von ca. 1,6 bis 2,3 nm Die manuell getropfte Oberfläche weicht nicht signifikant von diesem Ergebnis ab, liegt aber mit etwa 1,8 nm eher im unteren Bereich der erreichbaren Beladung. Für Experimente mit dem RfS-Mikroarray-Aufbau genügt diese Beladungsdichte allerdings. So können für erste Versuche, flächig mit demselben Oligonukleotid funktionalisierte Oberflächen in wesentlich kürzerer Zeit als mit dem Microdrop System hergestellt werden. Die etwas schlechtere Beladung kann dabei in Kauf genommen werden. Die Homogenität der Oberfläche kann allerdings erst später, bei den Mikroarray-Messungen bestimmt werden.

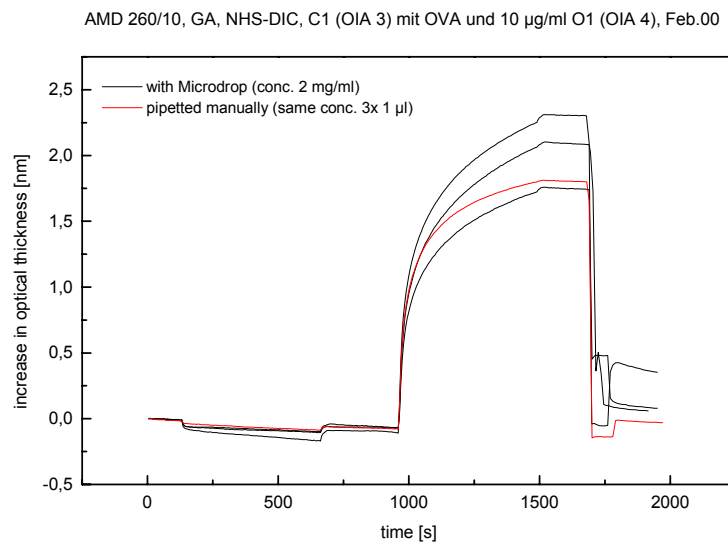


Abbildung 42 Immobilisierung "von Hand" und mit der Microdrop-Technik. Die Ergebnisse streuen in diesem Fall im normalen Maß, es ist zunächst keine signifikante Abweichung der manuellen Technik feststellbar. Diese Ergebnisse können als modellhaft angesehen werden.

Tatsächlich erscheint hier die Immobilisierung mit kleinsten Tröpfchen nicht den entscheidenden Vorteil zu erbringen, sondern die Tatsache, dass die aktivierte Oberfläche während der Oberflächenreaktion beheizt wurde. Entsprechenden Experimente von [Stemmler 2001] legen ebenfalls diesen Schluss nahe, vergleicht man sie mit Experimenten von [Sauer 1998]. Während Stemmler mit ausschließlich mit beheizten Oberflächen agiert und Sauer die Standard Immobilisierungsschemie (nasschemische Immobilisierung aus DMF-Lösung) betreibt, sind bei Stemmler durchweg höhere Gleichgewichtsbeladungen erzielt worden. Die prinzipiellen Vorteile der Immobilisierung mit Piezopipetten, nämlich die mögliche orts aufgelöste Immobilisierung sowie der äußerst geringe Probenverbrauch sind davon natürlich unberührt und von entscheidender Wichtigkeit beim Einsatz zur Herstellung von Mikroarrays. Dies ist in [Jung, Stemmler und Gauglitz, 2001] dargestellt und diskutiert worden.

Insgesamt konnte durch die vereinheitlichte Technik des Immobilisierens aminofunktionalisierter Oligonukleotide auf beheizten, aktivierten Oberflächen die absolute Beladung der Oberflächen auf bis zu 300 fmol/mm^2 gesteigert werden (entsprechend einer Oberflächenbeladung von 2,3 nm mit einem 23-mer Oligonukleotid), was einer nochmaligen Verdoppelung der in [Stemmler 1999] genannten 150 fmol/mm^2 gleichkommt.

Nun stellte sich noch die Frage, was den Effekt der höheren Beladungsdichte einer solcherart modifizierten Dextran-Oberfläche ausmacht. Hierzu wurde ein Experiment durchgeführt, das die Immobilisierung aus wässriger Lösung über Nacht mit der Immobilisierung mit Microdrop auf beheizten Oberflächen vergleicht. Wieder wurde das Ergebnis des Experiments durch die spezifische Hybridisierung an die modifizierte Oberfläche ausgewertet. In Abbildung 43 links ist ersterer Versuch und rechts letzterer dargestellt. Die gleichzeitig bei beiden Versuchen durchgeführte Bestimmung der unspezifischen Bindung ist aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen worden. Hier ergab sich das Ergebnis, dass beide Techniken die Oberfläche gleichermaßen gut gegen unspezifischen Bindung abschirmen. Letztlich zeigt dies auch, dass die zugrundeliegende Dextranschicht und nicht die darauf durchgeführte Chemie für diese Eigenschaft verantwortlich ist.

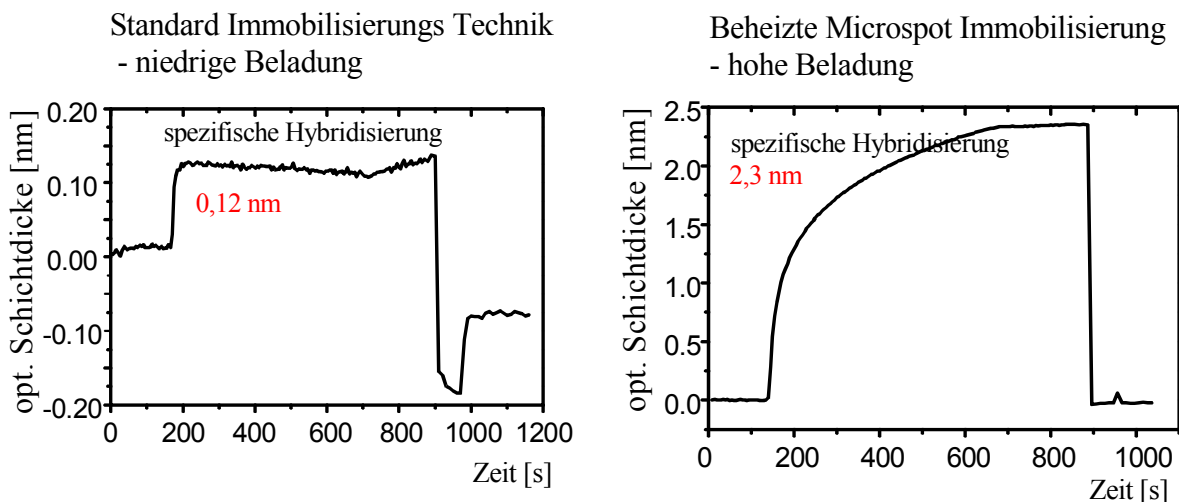


Abbildung 43 Vergleich der Aufbringung von Oligonukleotiden auf aktivierte Oberflächen unter verschiedenen Bedingungen. Links: Über Nacht in H₂O-Kammer inkubiert, rechts: Mit in (Methodenteil) beschriebenem Verfahren auf beheizte Oberfläche getropft.

Der Unterschied der beiden Aufbringungstechniken hinsichtlich der erzielten Oberflächenbeladung ist jedoch signifikant und augenfällig. Erstere Oberflächen zeigen eine Kinetik der Hybridisierung und eine Beladungsdichte, wie sie in etwa zweidimensionalen Oberflächen, beispielsweise PEG-Oberflächen, entspräche. Eine schnelle Kinetik führt praktisch übergangslos zur Gleichgewichtsbeladung, welche im Bereich von 150 pm und damit sehr niedrig liegt. Die Microdrop Technik zeigt dagegen zusätzlich einen deutlich langsameren kinetischen Verlauf und eine wesentliche höhere Beladung. Dies lässt den Schluss zu, dass hier auch die in der Dextranmatrix befindlichen Bindungsstellen mit

Oligonukleotiden belegt werden können, während bei der anderen Immobilisierungsmethode offensichtlich gar keine Bindungsstellen innerhalb der Dextranmatrix geschaffen wurden und damit auch beim Experiment nicht belegt werden konnten. Auch dies stützt die These, dass die Abstoßung (die Immobilisierung erfolgte aus wässriger Lösung) der geladenen DNA von der Dextranmatrix der Grund für dieses Verhalten sein könnte. Die innenliegenden Bindungsstellen führen also zu einer starken Erhöhung der Bindungskapazität der Oberfläche, wenn auch mit etwas unterschiedlicher Kinetik. Dies ist auch im Einklang mit Untersuchungen von [Haake 2000] der dasselbe Verhalten für Antikörper im Vergleich von PEG- und Dextran-Schichten beobachtet hatte.

Weiterhin soll nicht unerwähnt bleiben, dass die Tatsache der Durchführung von Immobilisierungsexperimenten in der normalen Laborumgebung teilweise zu unreproduzierbaren Ergebnissen führt, die wenig Interpretationsspielraum lassen. Daher wird sich hier darauf beschränkt, das bereits sehr hohe Potential der verwendeten Immobilisierungsmethoden anzusprechen, ohne jedoch aus den Augen zu verlieren, dass ein evtl. darauf beruhender Produktionsprozess vielleicht eine niedrigere Gesamteffizienz bei jedoch stark gesteigerter Reproduzierbarkeit erzielen kann. Dies ist z.T. bereits aus laufenden Arbeiten in der Arbeitsgruppe von Prof. Gauglitz ersichtlich. Dort werden Transducer in einem "quasi-Produktionsprozess" immer von ein und derselben Person hergestellt und verarbeitet. Diese DNA-Transducer weisen zwar nicht immer die höchste Hybridisierungskapazität auf, haben dafür aber i.d.R. sämtlich sehr einheitliche, reproduzierbare Eigenschaften (Daten hier nicht gezeigt).

4.2.2.3 Nanoplotter zur orts aufgelösten Immobilisierung

Für die Produktion von Mikroarrays für die späteren RfS-Messungen wurden im Rahmen dieser Arbeit die Voraussetzungen geschaffen. Es war notwendig, Oligonukleotide genau dort zu positionieren, wo das Detektionssystem nachher eine Messung durchführen sollte. Der angestrebte Abstand sollte dabei 250-500 μm sein und die Spotdurchmesser in etwa 150 μm . Letztere werden wie oben bereits erwähnt, hauptsächlich durch das Volumen der Tropfen und die Oberflächeneigenschaften bestimmt. Ein System, bei dem variierbare Tropfenvolumina mit einem xyz-Roboter kombiniert sind, erschien also hier als geeignet. Die Wahl fiel auf ein Gerät der Firma Gesim (Nanoplotter) mit piezoelektrischen Pipetten.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Programmierungen ermöglichen es, auf ein RfS-Mikroarray bis zu 96 verschiedene Proben (aus einer Mikrotiterplatte als Vorlage) automatisiert aufzubringen. Dieser Vorgang nimmt durch die wiederholten Wasch- und

Spülzyklen eine recht lange Zeit in Anspruch, so dass überprüft wurde, ob die Aktivester an der Oberfläche bei eingeschalteter Oberflächenheizung lange genug zur Verfügung stehen, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Hierzu wurden aktivierte Dextran-Transducer auf der Heizplatte des Microdrop-Systems gelagert und nach und nach betropft. Ein Transducer wurde über Nacht liegen gelassen und am nächsten Morgen betropft. Die Hybridisierungskapazitäten der Transducer wurden ausgewertet.

Die Untersuchungen ergaben eine Stabilität von etwa fünf Stunden bei unwesentlicher Änderung der Immobilisierungseffizienz. Nach 24h ist die Kopplungskapazität der Oberfläche dagegen auf Null abgesunken. Diese Stabilität genügt, um Transducer für das RIfS-Mikroarray nach diesem Verfahren herzustellen.

Für die Voruntersuchung am Demonstrator Null und am miniaturisierten RIfS-System wurde hauptsächlich die "manuelle" Immobilisierung mit drei mal 1 µl Lösung mit einer Pipette durchgeführt wie in Kapitel 4.2.2.2 beschrieben. Damit konnte das Problem der genauen Lagebestimmung der Spots mit der Software auf dem RIfS-Mikroarray zunächst umgangen werden, da die so erzeugten Spots mit etwa 1-2 mm Durchmesser (ein Tropfen des Volumens 1 µl hat etwa 1,3 mm Radius) auf jeden Fall größer sind, als die von der Wellmaske abgedeckten Flächen.

4.2.3 Fluidik und temperaturabhängige Messungen

4.2.3.1 Nachweisgrenzen im Durchfluss

Der Nachweis von DNA-Oligonukleotiden auf einem Mikroarray erfordert eine Nachweisgrenze im Bereich nanomolarer Konzentration für optimale Hybridisierungsbedingungen, um tatsächliche Mengen an PCR-Produkten erfassen zu können. Dabei konnte als Modellsystem nur auf synthetische Oligonukleotide zurückgegriffen werden, bei denen bekanntlich die Hybridisierungsbedingungen als optimal anzusehen sind. Verglichen mit den meist um einen Faktor 10 schwereren PCR Produkten ergibt sich aber ein guter Anhaltspunkt für die Nachweisgrenze, da man davon ausgehen kann, dass längere Fragmente in der markierungsfreien RIfS Detektion ein bis zu Faktor 10 größeres Signal (=Steigung der Bindungskurve) ergeben. Entscheidendes Qualitätskriterium wird hier in der Anwendung das optimale Design der aufgebrauchten Oligonukleotidsonden für die jeweilige Gensequenz sein. Insofern unterscheidet sich hier die Optimierungsarbeit nicht von der herkömmlicher Mikroarrays auf Glasoberflächen und wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht berücksichtigt. Es galt im Wesentlichen, die grundsätzliche Eignung für solche Experimente zu erarbeiten.

In [Wegner 2001] ist anhand konzentrationsabhängiger Messungen mit Oligonukleotiden am Einzelplatzaufbau gezeigt, dass über weite Grenzen von einer linearen Abhängigkeit von Konzentration der Oligonukleotide und der Steigung (bzw. Anfangssteigung) der Bindungskurven bei Hybridisierungsmessungen ausgegangen werden kann. Dies gilt allerdings nur für Messungen im Durchfluss, bei niedrigen Konzentrationen und gleichzeitig hoher Oberflächenkapazität. Für das Mikroarray-RifS System sollte im weiteren Verlauf des Projektes auch eine Durchflusszelle konstruiert werden, die solche Messungen ermöglicht. Bis dahin wurden die Experimente mit einer Küvette und manuellem Pipettieren der Hybridisierungslösungen durchgeführt.

Hierzu ist in Abbildung 44 ein Vergleich des RifS-Einzelplatz (die Hybridisierungsmessung aus Kapitel 4.2.2.2) mit dem Küvettenystem des RifS-Mikroarray-Systems (Messungen dargestellt in Kapitel 4.2.5.2) dargestellt. Neben dem nicht vergleichbaren Rauschen sowie der niedrigeren Maximalbeladung auf dem Küvettenystem durch weniger effiziente Oberflächenchemie, fällt vor allem die wesentlich längere Zeit der Hybridisierung am Küvettenystem auf. Auch die langsamere Kinetik am Anfang des Bindungsereignisses ist signifikant. Daher wird es für den Einsatz des RifS-Mikroarray-Systems in einem Gensensor unabdingbar sein, eine entsprechende Fluidik einzubauen. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr verwirklicht werden.

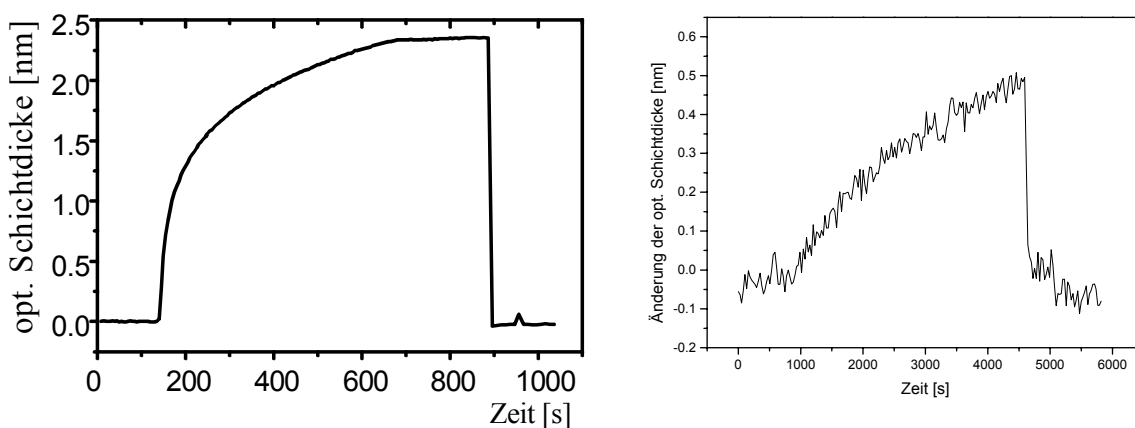


Abbildung 44 Vergleich der Durchflußhybridisierung am RifS-Einkanalaufbau (links) mit der Hybridisierung aus ruhender Lösung auf dem Mikroarray-RifS-Aufbau (rechts).

4.2.3.2 Thermodynamische Untersuchungen an Rückgrat-modifizierten Antisense-Oligonukleotiden

Ein weiterer im Rahmen dieser Arbeit untersuchter Teilaspekt der Wechselwirkung von kurzen DNA-Oligonukleotiden ist die potentielle Anwendung dieser Methode auf die

Optimierung sogenannter Antisense Oligonukleotide. Die RfS-Technik an sich bietet hier bereits im Rahmen der im Theorieteil bereits beschriebenen homogenen Testverfahrens (Bindungshemmtest) die Möglichkeit, die Affinität von DNA-Oligonukleotid-Wechselwirkungen in homogener Phase zu untersuchen. Man titriert dazu eine feste Konzentration einer Oligonukleotidsequenz mit der entsprechenden komplementären Sequenz in verschiedenen Konzentrationen. Mit einer spezifischen Sequenz auf der RfS-Oberfläche lässt sich danach jeweils die noch verbleibende Konzentration an nicht-hybridisierter Sequenz bestimmen. Aus der Auftragung dieser Werte gegen die eingesetzte Konzentration des komplementären Strangs lässt sich die Affinität zwischen den beiden Stränge ermitteln. Die Affinität gilt für die Reaktion in homogener Phase, die Oberfläche dient in diesem Fall lediglich als Detektor. Dadurch lassen sich auch mehrere komplementäre Stränge, beispielsweise Modifikationen von Oligonukleotiden wie in diesem Falle, vergleichend untersuchen.

Im vorliegenden Experiment wird vor allem auf die Affinität der Antisense-Sequenz auf die Target Sequenz (5'-TTC TTG TCT GCT CTT TCT CT-3') bei Übergang von der Phosphodiester- zur Thioat- bzw. Dithioat-Modifikation abgehoben. Wichtig sind solche Modifikationen des Oligonukleotid-Rückgrats für eine potentielle Anwendung als Antisense-Medikament wegen der höheren metabolischen Stabilität der modifizierten Spezies. Die Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Petra Bongardt aus dem Arbeitskreis Prof. Bayer durchgeführt. Daten zu den eingesetzten Oligonukleotiden finden sich daher bereits in [Bongardt, 1999].

20-mere einer Antisense-mdr-Sequenz wurden immobilisiert. Mdr ist die Abkürzung für das Multidrug Resistance Gen; welches die Zelle vor dem induzierten Zelltod schützen kann. Dies kann beispielsweise die Eigenschaft einer Tumorzelle sein. Die Hybridisierung der gelösten Sense-mdr-Sequenz (Target) wurde mit antisense-mdr-Phosphodiester, -Thioat und -Dithioat inhibiert.

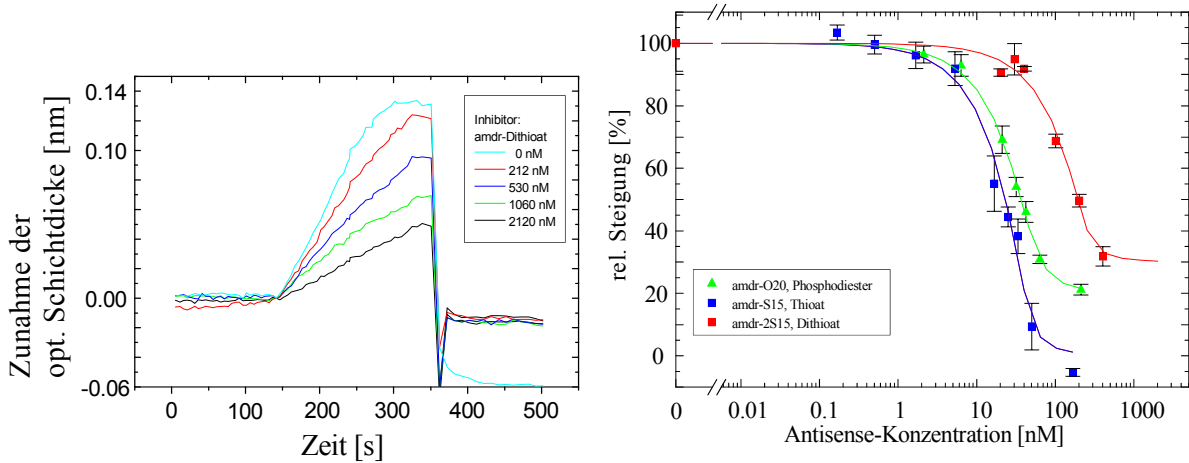


Abbildung 45 Affinitäten der Rückgrat-modifizierten Antisense-Oligonukleotide im RfS-Titrationsexperiment

Durch Anpassung einer Modellfunktion an die Titrationskurven wurden folgende Affinitäten zur Targetsequenz erhalten:

Tabelle 4 Vergleich der Affinitäten unmodifizierter und Rückgrat-modifizierter antisense-Oligonukleotide.

Phosphodiester	Thioat	Dithioat
$2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$	$9 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$	$1 \cdot 10^8 < K < 5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} *$

*effektive Konzentration abgeschätzt

Die Affinitätskonstanten von sense/antisense-Wechselwirkungen zwischen Oligonukleotiden konnten also mit RfS im Einkanalauflaufbau bestimmt werden. Die vergleichenden Bindungshemmtests mit Phosphodiester-, Thioat- und Dithioat-Modifikationen der mdr-Sequenz ergaben als Ergebnis eine Verringerung der Affinität bei Rückgrat-Modifikation.

4.2.3.3 Homogene kinetische Messungen

Simulationsrechnungen

Mit dem Programm Maple wurde in Zusammenhang mit einem C++ Programm (Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Weber in der Informatik) Eine Möglichkeit geschaffen, solche homogenen kinetischen Messungen zu simulieren und den simulierten Konzentrationsverlauf den entsprechend gemessenen Kurven anzupassen. Damit wird es ermöglicht, die erhaltenen Messkurven auszuwerten [Jung et. al. 1999].

Untersuchungen an einem Antigen-Antikörper System

Solche kinetischen Messungen wurden auf Atrazincapronsäure-Oberflächen durchgeführt. Hierzu wurden die Reaktanden in der Probenschleife des RfS-Aufbaus vermischt, wie im Methodenteil beschrieben. Man erhält Messkurven, die den zeitlichen Verlauf der Konzentration an freien Antikörperbindungsstellen zeigt. Die jeweilige Momentansteigung der Bindungskurven ist dabei proportional zur Konzentration. Die Kinetik des Bindungsereignisses entspricht in diesen Experimenten einer Reaktion zweiter Ordnung, kann aber auch durch ein Modell pseudo-erster Ordnung ausgewertet werden, wenn die Konzentration an Antikörper mehr als 2,5 mal so groß ist, wie die Konzentration an eingesetztem Antigen. Dies wurde bereits in [Jung 1999] gezeigt.

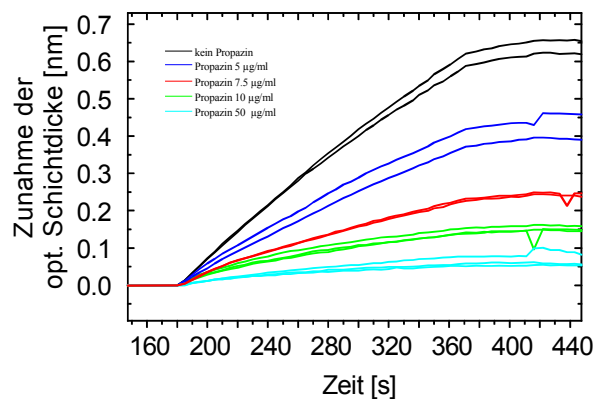


Abbildung 46 Kinetische Messungen mit K4E7 2 µg/ml + Propazin

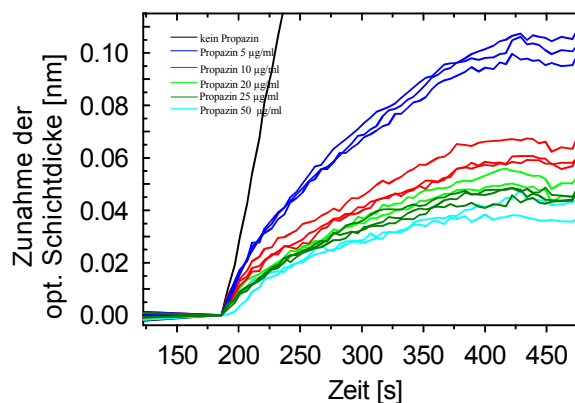


Abbildung 47 Kinetische Messungen mit K4E7 1 µg/ml + Propazin

Man detektiert ein Integral der Konzentration. Die Auswertung der Bindungskurven erfolgt durch Anpassung des zweimal integrierten Zeitgesetzes zweiter Ordnung über eine nichtlineare Regression durch das Programm MAPLE, das für die Durchführung der Regression auf ein C-Programm zurückgreift, um die MAPLE-Formel parametrisieren und anpassen zu können.

Dadurch erhält man direkten Zugang zu den Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten (k_{ass} , k_{diss}) der Affinitätsreaktion als Parameter der angepassten MAPLE-Funktion. Für die Messungen ergibt sich ein Arbeitsbereich von $1 \cdot 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{s}^{-1} < k_{\text{ass}} < 1 \cdot 10^9 \text{ Lmol}^{-1}\text{s}^{-1}$ welcher durch die Nachweisgrenze (bei AK etwa 1 pg/mm^2), die Reaktionsgeschwindigkeit bei großem $k_{\text{diss}} > 1 \text{ s}^{-1}$ und die Drift des Detektionssystems ($< 6 \text{ pm/h}$) begrenzt wird.

Schlussfolgerung: Vorteile des Kinetic Inhibition Assay - KIA

Der Kinetische Inhibitionsassay bietet einen direkten und einfachen Zugang zu kinetischen Konstanten, welche der Reaktion in Lösung entsprechen. Dadurch können eventuelle Oberflächeneffekte ausgeschaltet werden. Beide untersuchten Komponenten müssen dafür nicht markiert werden, es ist nur ein kompetitiver Ligand zur Immobilisierung an der Oberfläche nötig. Dadurch können Markierungsartefakte in der kinetischen Messung vermieden werden. Das indirekte Testformat erlaubt es aus dem selben Grund auch, nicht immobilisierbare Liganden zu untersuchen. Besonders interessant wird dies beispielsweise bei membrangebundenen Rezeptoren, welche nicht immobilisiert werden können, ohne ihre Funktionalität zu verlieren. Die Voraussetzung der diffusionslimitierten Bindung an die Oberfläche lässt sich durch entsprechende Oberflächenchemie, wie sie in Kapitel 4.2 besprochen wird, leicht einstellen. Man erhält bei der Methode keine Oberflächenartefakte, wie beispielsweise Rückbindungseffekte. Die Affinitätskonstante $K = k_{\text{ass}}/k_{\text{diss}}$ kann direkt mit der in homogener Phase bestimmten Gleichgewichts-konstanten verglichen werden, da sie mit derselben Technik des homogenen Titrationsassays bestimmt worden ist. Besonders im Bereich der Protein-Protein Wechselwirkungsanalytik kann und wird diese kinetische Charakterisierungsmethode an Bedeutung gewinnen, da es schwierig ist, Proteine reproduzierbar und funktional an die Oberfläche zu binden. Auch die Größe von Proteinen begünstigt die Diffusionslimitierung und damit die Machbarkeit des KI-Assays. Dieses Assayprinzip kann daher als Ergänzung zu herkömmlichen kinetischen Tests (siehe z.B. [Karlsson et al. 1997]) eingesetzt werden, wenn diese aufgrund der Größe und Diffusionsgeschwindigkeit oder Empfindlichkeit der Proteine nicht mehr sinnvoll durchgeführt werden können.

4.2.3.4 Temperaturabhängige Messungen

Ebenfalls eine Grundvoraussetzung zur Messung stringenter Hybridisierungsmuster auf Mikroarrays, insbesondere bei der Echtzeitmessung, ist die Einstellung der adäquaten Temperatur für den jeweiligen Satz an Oligonukleotiden. Die Hybridisierungsbedingungen im

Gensensor sehen daher ebenfalls eine Variation der Temperatur während der Messung vor. Daher sollte zunächst für ein RfS-Durchflußsystem erstmals eine Vorrichtung aufgebaut werden, die eine temperaturabhängige RfS Messung ermöglicht. Später soll dieses System in den Gensensor übernommen werden, um auch dort stringente Hybridisierungen zu ermöglichen.

Die notwendige Hardware, die in der folgenden Abbildung 48 dargestellt ist, wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Proliquid GmbH, Überlingen, gebaut.

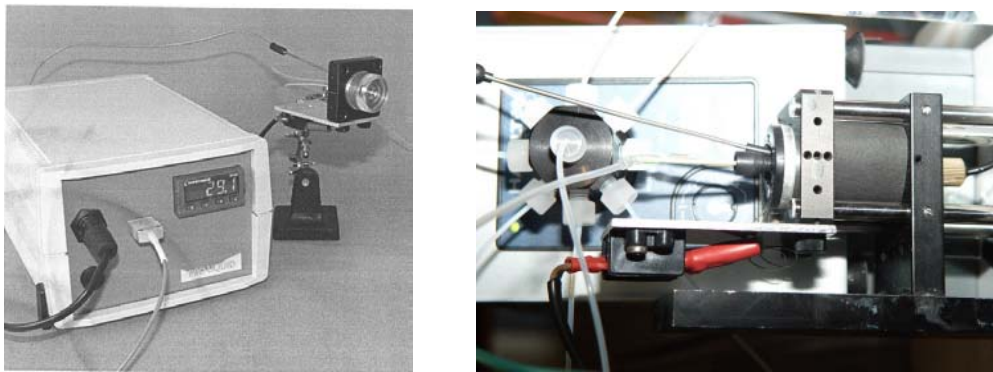


Abbildung 48 Integration einer Temperaturmesszelle in den RfS-Fluidikaufbau

Mit diesem Aufbau können im Durchfluss bei verschiedenen Temperaturen von 25-95 °C RfS-Bindungskurven aufgenommen werden. Die Möglichkeit der temperaturabhängigen Messung konnte mit Hybridisierungsmessungen gezeigt werden. Ganz deutlich ist zu erkennen, wie die Hybridisierungskapazität bei steigender Temperatur abnimmt. Zur späteren Detektion von Einzelbasen-Mismatches ist diese Möglichkeit von entscheidender Bedeutung. In weiterführenden Arbeiten von [Wegner 2001] werden mit diesem System ausführliche Messungen und Charakterisierungen durchgeführt, die beweisen, dass prinzipiell die temperaturabhängige Messung mit RfS möglich ist. Zwei Hauptkenntnisse grundsätzlicher Art sind hierbei gewonnen worden: Zum einen beginnen ab einer Temperatur von ca. 60°C Dampfbläschen die RfS Messung stark zu stören und des weiteren beträgt der Einfluss der Temperatur auf die optische Schichtdicke ca. 10 pm/°C.

4.2.4 Charakterisierung des RfS-Mikroarray-Aufbaus

4.2.4.1 Parallele Messungen mit Antikörpern

Zur grundsätzlichen Charakterisierung der Eignung des Mikroarray-Aufbaus für Bindungsmessungen wurden Bindungsstudien am Mikroarray Aufbau mit Atrazin-Antikörpern an immobilisiertem Atrazin durchgeführt. Die Größe von Antikörpern von ca.

150 kD führt erfahrungsgemäß zu einem zuverlässigen und hohen Signal, was für eine erste Charakterisierung hilfreich erschien. Zunächst zeigt die parallele Bindungsmessung die prinzipielle Funktionsweise und den Ablauf einer Messung am Mikroarray-Aufbau.

Es wird ein Mikroarray-Transducer eingesetzt, der mit Atzrazincapronsäure modifiziert ist. Diese wurde flächig immobilisiert, so dass eine Antikörperbindung über die gesamte Fläche gleichmäßig erfolgen kann. Dies dient der Evaluation der gerätespezifischen Parameter wie Drift und Rauschen unabhängig von eventuellen Unregelmäßigkeiten der Oberflächenchemie. In eine Küvette (vgl. Bilder in Kapitel 4.1.1.1), die den Transducer umschließt wird zunächst 100 µl Pufferlösung eingefüllt. Danach wird die Messung gestartet und wie im Methodenteil beschrieben eine Dunkelmessung und Kalibriermessungen für die Belichtungszeit der Kamera durchgeführt. Unter Pufferlösung wird die Basislinie der Messung ausgenommen. Nach einer gewissen Zeit erweist sich die Basislinie als stabil, was online mit der Software „Screening“ verfolgt werden kann. Die Langzeitdrift des Systems liegt bei weniger als 50 pm/h, was der Tatsache der Simultanreferenzierung zugeschrieben wird. Nun wird die Pufferlösung herauspipettiert und durch Antikörperlösung der Konzentration 50 µg/ml ersetzt. Es beginnt die Assoziationsphase, d.h. alle Bindungspositionen beginnen einen Signalanstieg zu zeigen. Eindeutig ist dabei aus der Krümmung der Bindungskurven der diffusionslimitierte Verlauf der Bindung zu erkennen. Auch die Dauer der Bindung bis zu Sättigung ist typisch für ein solches Küvetten-Experiment. Es wird eine maximale Beladung von ca. 6 nm erreicht, was im Rahmen des erwarteten liegt (gute Transducer erreichen im Einkanal-RIfS-Aufbau etwa zwischen 10 und 20 nm Oberflächenbeladung), wenn man die gegenüber dem Einkanal-RIfS um ca. 50% verminderte Empfindlichkeit des Mikroarray-Aufbaus berücksichtigt [Rothmund 1999]. Nach einer kurzen Dissoziationsphase in der die Antikörperlösung wiederum durch Pufferlösung ersetzt worden ist, wird praktisch keine Abnahme der Bindung beobachtet, was mit der hohen Affinität des verwendeten Antikörpers begründet werden kann. Es kann danach gezeigt werden, dass das Array durch Zugabe von Pepsinlösung, pH 1,7 vollständig regenerierbar ist. Die Messung lässt sich danach beliebig wiederholen. Es zeigt außerdem an sämtlichen Positionen praktisch vernachlässigbare unspezifische Bindung gegenüber Ovalbumin, d.h. die beobachtete Wechselwirkung ist als spezifisch zu betrachten. Alle nachfolgenden Messungen sind auf dem gleichen Array unter Veränderung der Größen der ausgewerteten Messpunkten (Masken in der Software) gemacht worden. So sollten, ausgehend von einer stabilen Oberfläche, für alle Messungen die gleichen Voraussetzungen geherrscht haben.

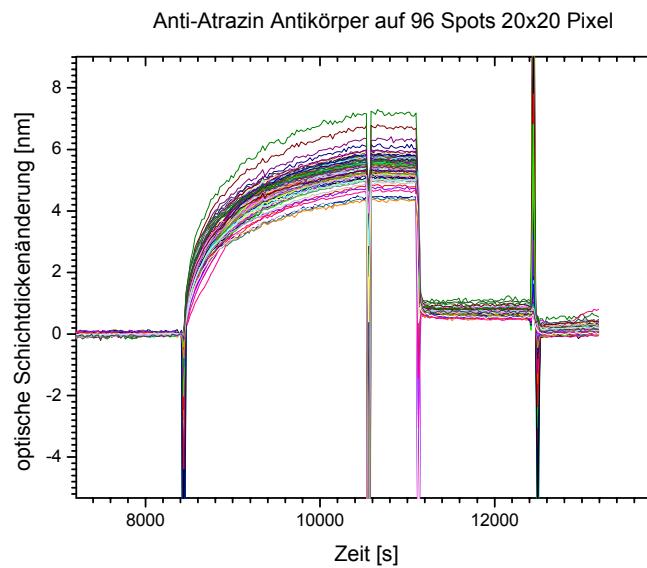


Abbildung 49 Simultane online-Detektion der Bindung von Atrazin-Antikörper an 96 Messpunkten auf dem RfS-Mikroarray-Aufbau.

Nacheinander wurde nun die Antikörpermessung für verschiedene Masken durchgeführt, um die vorher gemachten Voraussagen bezüglich des Verhaltens des Detektionssystems zu verifizieren. Es wurden folgende Masken programmiert und ausgewertet: 384 Messpunkte mit 2x2 Pixel, 384 Messpunkte mit 5x5 Pixel, 96 Messpunkte mit 10x10 Pixel, 96 Messpunkte mit 20x20 Pixel sowie 40 Messpunkte mit 40x40 Pixel. Für jede dieser Masken wurde ein Bindungsexperiment, identisch mit dem oben beschriebenen, durchgeführt und ausgewertet.

Die folgenden Abbildungen zeigen die parallelen Bindungsmessungen, das jeweilig detektierte Rauschen über die Chipfläche sowie die erzielte Beladungsdichte über die Chipfläche. Die verwendeten Arrays zur Detektion waren 384 Spots für die Detektion an 2x2 und 5x5 Pixel/Spot, 96 Spots für die Detektion an 10x10 und 20x20 Pixel/Spot und 40 Spots für 40x40 Pixel große Spots.

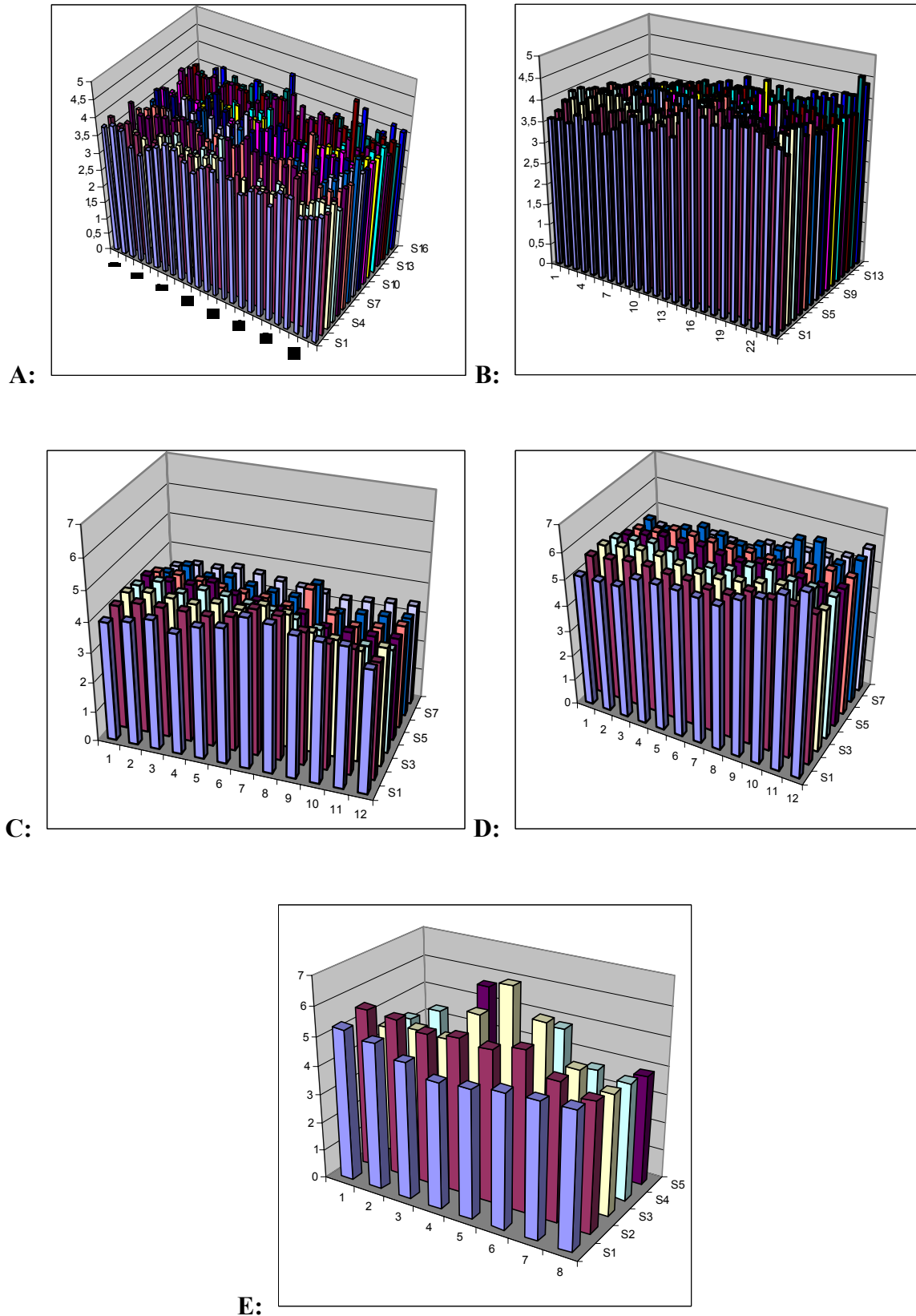


Abbildung 50 Antikörpermessungen an verschiedenen Spotgrößen (A: 2x2, B: 5x5, C: 10x10, D: 20x20 und E: 40x40 Pixel), Dargestellt sind die Gleichgewichtsbeladungen an jedem Messpunkt jedes Arrays.

Die Experimente verdeutlichen die Homogenität und Leistungsfähigkeit der Antikörpermessungen auf dem Chip. Die Variation der Maskeneinteilung und damit der ausgewerteten Flächen ermöglicht einen Vergleich über den Einfluss dieser (nur Geräte- und Softwarespezifischen) Parameter auf die Ergebnisse.

Zunächst sollte die Behauptung überprüft werden, die gemessene Schichtdickenzunahme sei unabhängig von der ausgewerteten Pixelzahl auf dem Mikroarray. Dazu wurden die Mittelwerte aller erreichten Gleichgewichtsbeladungen jeweils eines Arrays gebildet. In Abbildung 51 sind die erhaltenen Werte mit ihren Standardabweichungen nebeneinander aufgetragen.

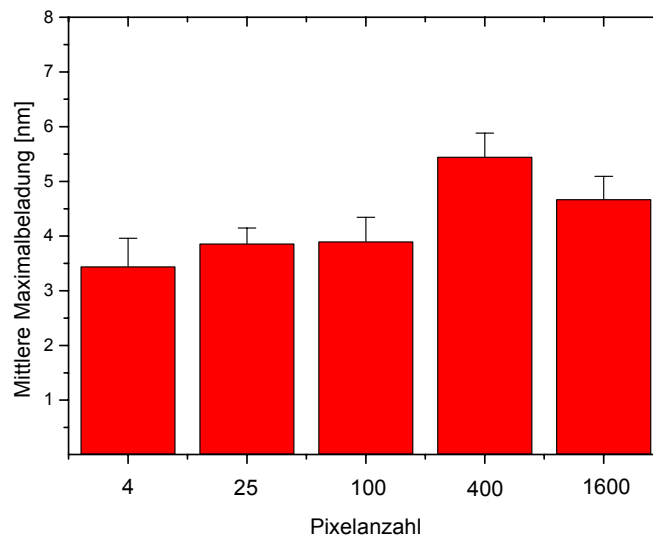


Abbildung 51 Mittlere Maximalbeladungen an Antikörper abhängig von der Spotgröße

Bei der Auswertung der Maximalbelegungen muss man davon ausgehen, dass die nicht vollständige Regenerierung bzw. die Abnutzung des verwendeten Arrays zur Abnahme in Richtung der kleineren Spots führt, da dies der Reihenfolge der Messungen (20x20, 40x40, 10x10, 5x5, 2x2) entspricht. In [Birkert 2001] konnte ebenfalls bereits gezeigt werden, dass sich selbst durch die Auswertung nur eines einzigen Kamerapixels eine vernünftige optische Schichtdickenzunahme aufzeichnen lässt, deren absolute optische Schichtdickenänderung gleich ist, wie die ausgewertete, integrierte Änderung auf einer Fläche von über 400 Pixel. Entsprechend der bereits angeführten Tatsache, dass die gemessene Schichtdickenzunahme unabhängig von der ausgewerteten Pixelanzahl sein sollte, kann dies mit diesem Experiment bestätigt werden. Die theoretischen Überlegungen in Kapitel 4.1.1.5 sind damit in diesem Punkt bestätigt.

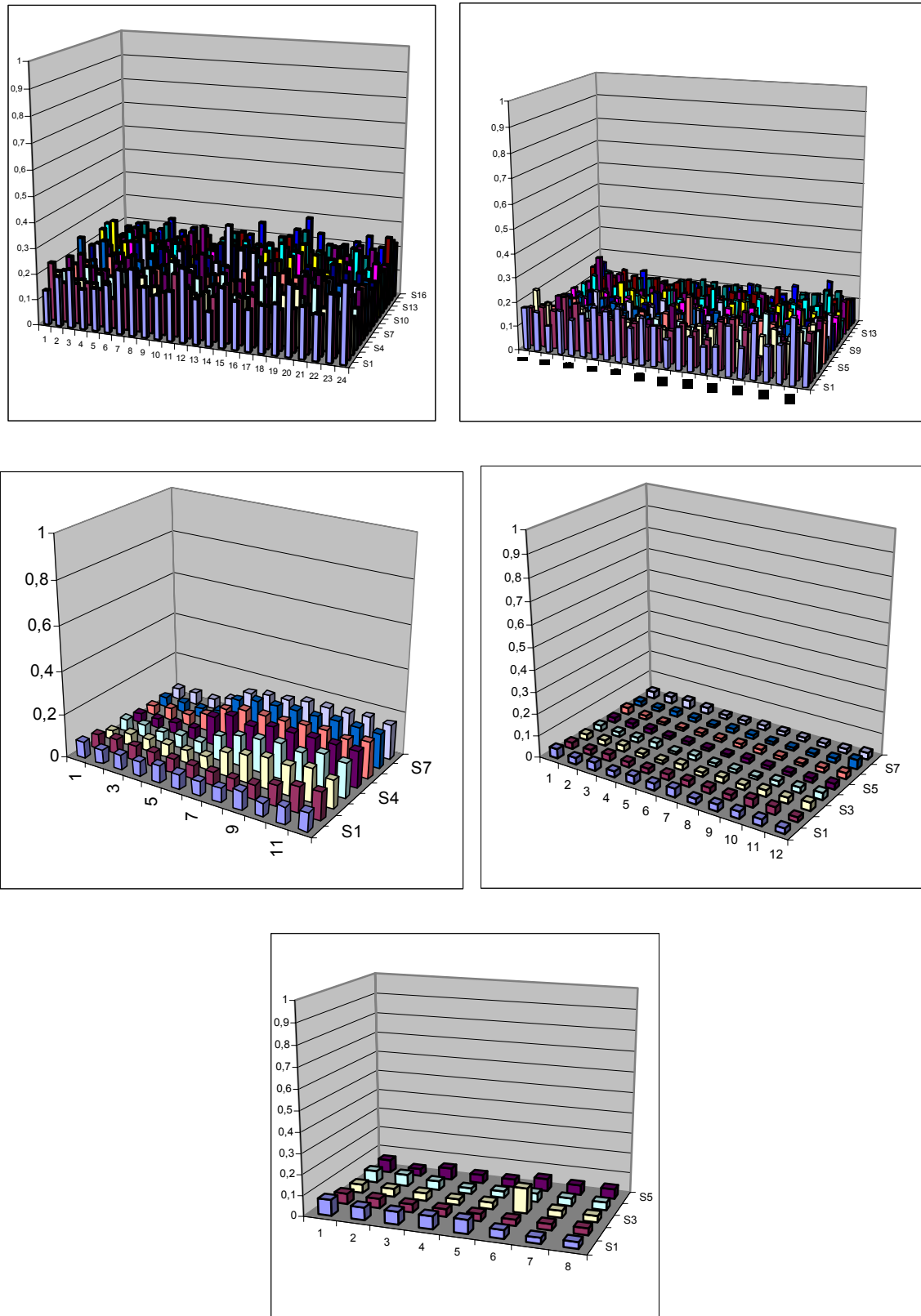


Abbildung 52 Rauschen über das ganze Mikroarray bei Auswertung verschiedener Pixelzahlen pro Messpunkt (von links nach rechts und von oben nach unten: 2x2, 5x5, 10x10, 20x20 und 40x40 Pixel pro Messpunkt), dargestellt über die gesamte Fläche des Arrays.

Nun wurden die Messungen an den selben Arrays bezüglich ihres Rauschverhaltens untersucht. Die Auswertung des Rauschens über die jeweiligen Arrays erfolgte durch Mittelwertbildung über alle Messpunkte. Dadurch sind die Daten der 384er Arrays aufgrund der höheren Anzahl an Messpunkten zwar statistisch sicherer, die Mittelwerte selbst lassen sich aber dennoch vergleichen. Die Ergebnisse jedes Arrays sind in Abbildung 52 dargestellt. Durch lineare Regression der Basislinien der Einzelmessungen auf den Arrays erhält man Werte für das Kurzzeitrauschen zwischen 20 und 190 pm als Standardabweichung vom Mittelwert der linearen Regression. Dabei konnten für die Auswertung der Basislinien jeweils nur 10 bis 20 Messpunkte herangezogen werden. Entsprechend wird das Rauschen über einen längeren Zeitraum entsprechend \sqrt{n} besser erwartet. In der Abbildung 55 ist das so berechnete mittlere Rauschen gegen die ausgewertete Pixelzahl aufgetragen. Man beobachtet einen Zusammenhang zwischen dem mittleren Rauschen und der Pixelzahl der dem erwarteten \sqrt{n} Verhalten entspricht, das man statistisch erwartet.

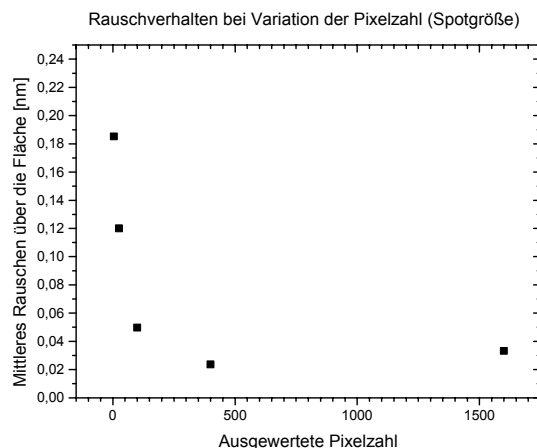


Abbildung 53 Rauschverhalten in Abhängigkeit von der ausgewerteten Pixelzahl.

Eine weitere Auswertemethode erlaubt es festzustellen, ob das beobachtete Rauschen ausschließlich von der beobachteten Pixelzahl im Experiment abhängt. Ist dies der Fall, dann ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen der reziproken Quadratwurzel der Pixelanzahl und der Abweichung vom Mittelwert einer Gauß-Verteilung. Gleiches wurde auch im Falle des RfS-Mikrotiterplattenaufbaus von Birkert [Birkert 2001] überprüft und festgestellt und sollte hier für den RfS-Mikroarray-Aufbau ebenfalls experimentell nachgewiesen werden. Dafür wurden die oben gezeigten Messungen jeweils durch eine Anpassung an eine Gauß-Verteilung ausgewertet und deren Mittelwerte in folgendem Diagramm (Abbildung 54) entsprechend aufgetragen dargestellt.

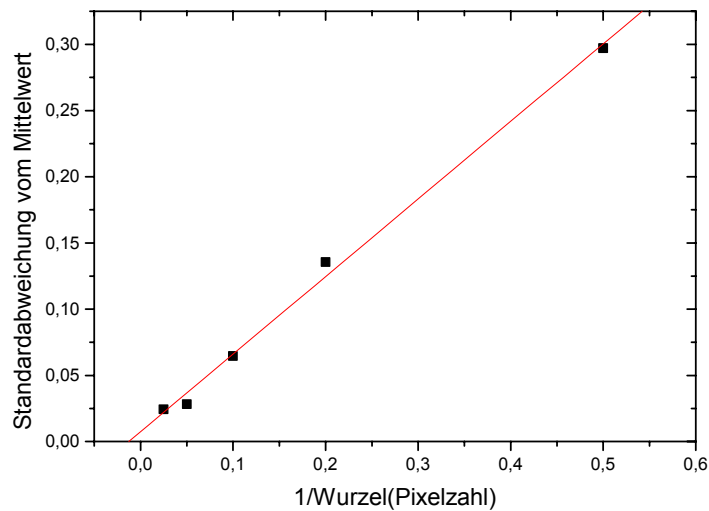


Abbildung 54 Linearer Zusammenhang zwischen den Standardabweichungen vom Mittelwert einer Gauß-Verteilung und der reziproken Quadratwurzel der Pixelzahl.

Der Zusammenhang der berechneten Mittelwerte einer Gauß-Verteilung und der reziproken Quadratwurzel der ausgewerteten Pixelzahl kann in diesem Experiment als bestätigt angesehen werden. Das Kurzzeitrauschen des Systems hängt damit nur von der ausgewerteten Pixelzahl ab.

4.2.4.2 Schlussfolgerungen

In diesem Abschnitt sollte die Eignung des neuen RIFs-Mikroarray-Aufbaus für die Messung biomolekularer Wechselwirkungen gezeigt werden. Hierfür wurde ein sehr gut charakterisiertes Antikörper-System eingesetzt und flächig immobilisierte Antikörper verwendet. Dies ermöglichte die Variation der ausgewerteten Pixelzahlen bzw. der ausgewerteten Messpunktgrößen. Somit konnten die relevanten Parameter für die Charakterisierung des Detektionssystems unbeeinflusst von möglichen (bio-)chemischen Unwägbarkeiten untersucht werden.

Der Mikroarray-Aufbau erfüllt die Erwartungen an seine Leistungsfähigkeit gut. Es können auf einer Transducerfläche zeitaufgelöste markierungsfreie RIFs-Messungen an bis zu 384 Messpunkten simultan durchgeführt werden. Das beobachtete Kurzzeitrauschen betrug dabei maximal 190 pm, der beste Wert von 20 pm wurde bei der Spotgröße 20x20 Pixel erreicht. Die Rauschwerte unterliegen einer normalen Statistik; dies drückt sich durch die Wurzel(n) Abhängigkeit des Rauschens von der Pixelzahl aus. Die Tatsache, dass das Rauschen ausschließlich von der Pixelzahl abhängt, ließ sich durch die Auftragung der Abweichungen

vom Mittelwert einer Gauß-Verteilung gegen die reziproke Quadratwurzel der Pixelzahl bestätigen.

Die gemessenen mittleren maximalen Beladungen, nach jeweiliger Regenerierung des Transducers, waren unabhängig von der ausgewerteten Pixelzahl. Die erwartete Empfindlichkeit von etwa 50% verglichen mit dem Einkanalaufbau, wird dabei über die gemessenen Gleichgewichtsbeladungen bestätigt.

Der Mikroarray-Aufbau zeigt nach dieser Charakterisierung die geeigneten Eigenschaften, um Oligonukleotid-Hybridisierungen nachweisen zu können. Diese Experimente werden im folgenden Kapitel näher besprochen.

4.2.5 *Parallele Hybridisierungsmessungen*

4.2.5.1 *RfS-Demonstrator – Multiplex Hybridisierung*

Bei dem genannten und im Methodenteil beschriebenen „Demonstrator Null“ handelt es sich um ein Gerät, das in einem Projekt zum markierungsfreien Hochdurchsatz-Screening (mHTS) entwickelt wurde⁵. Man kann auf der Fläche einer Viertel Mikrotiterplatte in 64 Wells mit einem Volumen von ca. 50 µL simultan messen [Rothmund 1999]. Die damit durchgeführten Messungen in dieser Arbeit dienten dem grundsätzlichen Nachweis der Fähigkeit zur simultanen Detektion von Hybridisierungen und damit dem Nachweis einer potentiellen Eignung zum Einsatz in einem Gensensor. Auch die mögliche Nachweisgrenze eines solchen Gerätes sollte anhand des Demonstrators evaluiert werden. Er stellt ein gutes Modell für die spätere Umsetzung der Messungen auf Mikroarrays dar. Die Möglichkeit in Kavitäten zu messen erlaubt es außerdem, simultan verschiedene Konzentrationen einzusetzen und so die Möglichkeit zur relativen Quantifizierbarkeit innerhalb eines Experiments zu untersuchen.

Die Immobilisierung der Oligonukleotide für die Experimente mit dem Demonstrator wurde durch "spotten" mit einer µl-Pipette von Hand durchgeführt. Es wurden an jedem "Spot" drei Mal ein Mikroliter einer Lösung mit einer Konzentration von 2 mg/ml Oligonukleotid auf den beheizten Transducer aufgetropft. Zunächst wurden Einzelmessungen mit Oligonukleotidkonzentrationen von 14,8 bis 3700 nmol/L durchgeführt um die prinzipiellen Grenzen des Systems zu erfassen. Die Messungen erfolgten durch Pipettieren der komplementären DNA in die Kavitäten des Demonstrators.

⁵ BMBF Librarian II, 1999-2001

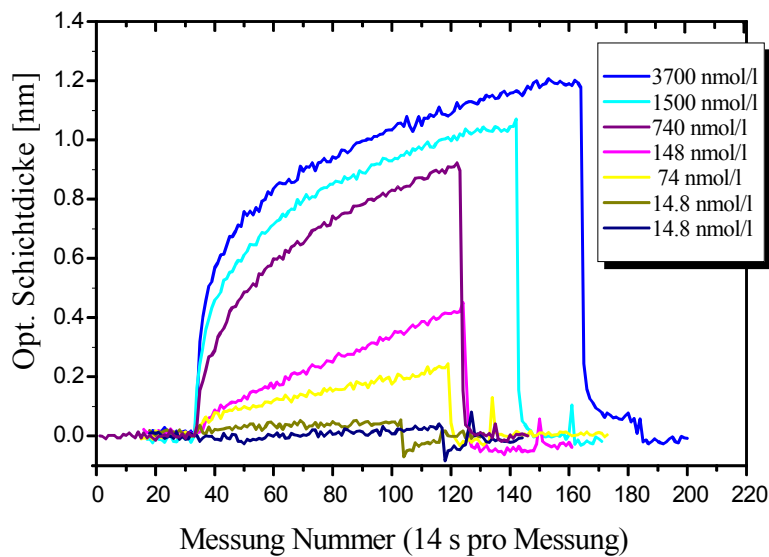


Abbildung 55 Hybridisierungsmessungen am Demonstrator Null - zeitaufgelöste Messungen

Die Experimente zeigen ein deutliches Signal bis zu Konzentrationen von etwa 20 nmol/L und eine eindeutige und reproduzierbare Konzentrationsabhängigkeit der gemessenen Beladung. Nun wurde ein Experiment zur Multiplex-Hybridisierung am Demonstrator durchgeführt, das die Reproduzierbarkeit der Hybridisierungsmessungen zeigen sollte. Hier soll angemerkt werden, dass nun, im Gegensatz zu den Experimenten mit Antikörpern in Kapitel 4.2.4.1, auch die chemische Abweichung von Messpunkt zu Messpunkt bei der Reproduzierbarkeit eine Rolle spielt, da in jeder Kavität nach oben genanntem Schema einzeln immobilisiert wurde. In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse dieses konzentrationsabhängigen Hybridisierungsexperiments am parallelen RfS-Demonstrator dargestellt. Die sieben eingesetzten Konzentrationen waren 0,1/ 0,5/ 1/ 2,5/ 5/ 10 und 20 $\mu\text{g/ml}$. Eine Messung wurde zur Ermittlung unspezifischer Wechselwirkungen mit Ovalbumin durchgeführt. Jede Messung wurde zehnmal wiederholt, die Ermittlung der jeweiligen Standardabweichung beruht also auf einer Zehnfachmessung.

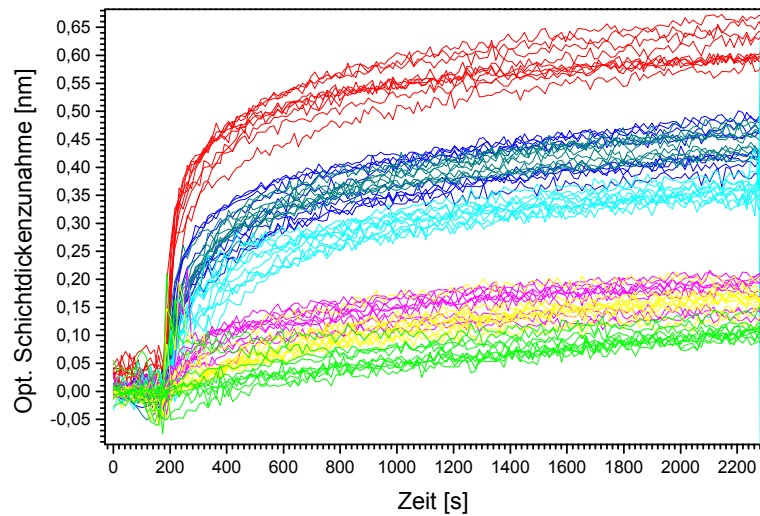


Abbildung 56 Multiplex-Hybridisierung am „Demonstrator Null“ – Messungen bei sieben verschiedenen Konzentrationen und einer Messung mit Ovalbumin; jeweils Zehnfachmessungen.

Zur Auftragung der Ergebnisse in Abbildung 56 wurden die Bindungskurven auf den Einspritzzeitpunkt und dort auf Null normiert um die unterschiedlichen Zeitpunkte der manuellen Pipettierung auszugleichen. Trotzdem erhält man für höhere Konzentrationen eine teilweise große Standardabweichungen von bis zu 15% am Ende der Messung. Dies wird allerdings im Wesentlichen auf das Versuchsdesign zurückgeführt, bei dem jede Konzentration in ihrer jeweils eigenen Kavität und mit 10 aufeinanderfolgenden Regenerationen gemessen wurde. Dies führte zu unterschiedlichen Abnutzungen der Oberflächen und trägt einen großen Teil zu den gemessenen Abweichungen bei.

Zieht man das Modell der dreifachen Standardabweichung einer Nullmessung heran, um die Nachweisgrenze des Demonstrators für Hybridisierungsmessungen zu bestimmen, so kann eine Unterscheidungsschwelle von Oligonukleotiden auf diesem System von 1:1,1 festgestellt werden. Die absolute Nachweisgrenze des liegt dabei bei etwa 100 ng/ml, oder, abgeleitet aus dem gemessenen, mittleren Kurzzeitrauschen des Systems von 20 pm, bei etwa 120 pg/mm² oder 20 fmol/ mm² (ausgehend von der Tatsache, dass auf dem parallelen System bei einem Einstrahlwinkel von 45° etwas 50% der Empfindlichkeit des Einkanal-systems erreicht wird [Rothmund, 1999], und 1 pm Schichtdickenänderung nach [Hänel, 2003] also einer Deposition von 2 pg/mm² entspricht). Letzten Endes ist nur erstere Betrachtung für die spätere Praxis von Bedeutung, da nicht die oberflächengebundene Konzentration, sondern die Konzentration der eingesetzten Probe von einem Gensensor bestimmt werden soll. Dabei

verspricht ein später einzuführendes Durchflusssystem eine wesentlich bessere Empfindlichkeit des parallelen RfS-Aufbaus, durch die dadurch veränderte Diffusion der Reaktanden an die Oberfläche. Die entsprechende Beobachtung konnte schon in Voruntersuchungen am Einkanalssystem ([Haake, 2000], [Wegner 2000]) gemacht werden und wurde in dieser Arbeit in Kapitel 4.2.2.2 besprochen.

Zur Auswertung einer solchen parallelen Hybridisierungsmessung (und damit zur Kalibrierung eines potentiellen Sensors) lassen sich nun mehrere Kurvenparameter heranziehen, die hier modellhaft verglichen werden sollen. Erstens lassen sich die Anfangssteigungen der Assoziationskurven auswerten und gegen die Konzentration auftragen, wie es in Abbildung 57 dargestellt ist. Die Methode ist nicht von einer Kurvennormierung abhängig und kann direkt nach der Messung auch automatisiert durchgeführt werden.

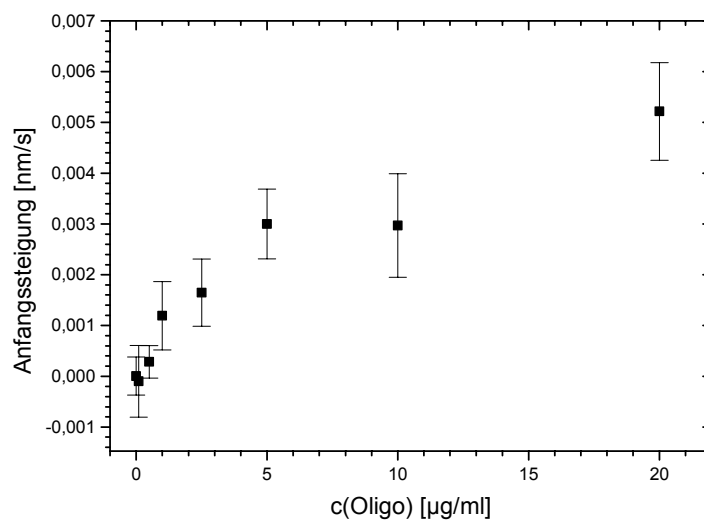


Abbildung 57 Auswertung der Anfangssteigungen einer parallelen Hybridisierungsmessungen. (Anmerkung: Die Konzentration "10 $\mu\text{g/mL}$ " ist vermutlich fehlerhaft pipettiert worden.)

Während im Einkanalssystem das Auswerten der Anfangssteigungen gängig ist, scheint sich im vorliegenden Fall der dynamische Bereich und die Kalibrierengenauigkeit gegenüber der Endpunktmessung nicht zu verbessern. Allerdings benötigt man für die Auswertung der Anfangssteigungen nur sehr kurze Zeit. Dies kann bei einer automatisierten Orientierungsmessung eines Sensors von Wichtigkeit sein.

Weiterhin lassen sich bei normierten Messungen (wie zuvor beschrieben) auch die absoluten Signale der Assoziationskurven nach einer vorgegebenen Reaktionszeit auftragen. Dies ist in Abbildung 58 dargestellt.

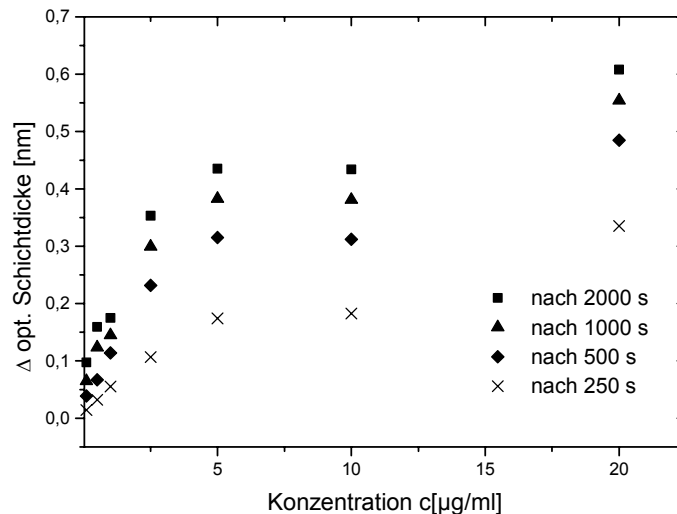


Abbildung 58 Optische Schichtdickenzunahme bei verschiedenen Konzentrationen. Auswertung und Vergleich der Bindungssignale nach verschiedenen Zeiten nach dem Beginn der Assoziationsphase.

Es zeigt sich, dass die Information in den zeitaufgelösten Bindungskurven (Konzentration) im Prinzip schon wenige Messungen nach Beginn der Assoziationsphase vorhanden ist und damit sehr schnelle Hybridisierungsmessungen ermöglicht kann. Auch im Hinblick auf schnelle Durchflussmessungen kann dies ein großer Vorteil sein, da damit auch mit sehr wenig Probenmenge bereits ausreichend Information über die Konzentration einer Probe erhalten werden kann.

Zur Überprüfung der Qualität der Auswertung von Hybridisierungsmessungen wurde bei den ausgewerteten Zeiten nach Beginn der Assoziation (250, 500, 1000 und 2000 s) die Standardabweichung vom Mittelwert der zehn Messungen berechnet. Nach zunehmender Zeit wird die Information demgemäß statistisch sicherer, die Standardabweichung nimmt ab. Die wird durch die Darstellung der Ergebnisse in Tabelle 5 verdeutlicht. Zumindest bis zum Zeitpunkt 1000 s nimmt die statistische Sicherheit der Daten kontinuierlich zu (die Standardabweichung nimmt ab). Später werden die Daten wieder "unsicherer". Die Signale der "Nullmessung" verändern ihre statistische Sicherheit während der Messung erwartungsgemäß nicht.

Tabelle 5 Standardabweichungen der Zehnfachmessung bei verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der Assoziationsphase für verschiedene Konzentrationen. Bis 1000 s erkennt man eine signifikante Abnahme der Standardabweichungen, danach wird die Messung nicht mehr besser, teilweise sogar schlechter.

Zeit [s]	250	500	1000	2000
Konzentration [µg/ml]				
20	0,037	0,024	0,030	0,030
10	0,041	0,042	0,032	0,035
5	0,039	0,020	0,016	0,021
2,5	0,030	0,025	0,018	0,016
1	0,034	0,016	0,022	0,029
0,5	0,049	0,015	0,022	0,024
0,1	0,039	0,024	0,025	0,016
0	0,011	0,013	0,019	0,017

4.2.5.2 Hybridisierungsmessung am RfS-Mikroarray-Aufbau

Nachdem die Charakterisierung des RfS-Mikroarray-Aufbaus gezeigt hatte, dass die Grundvoraussetzungen für eine Messung von Oligonukleotid-Hybridisierung erfüllt sind, konnte das Experiment durchgeführt werden. Basierend auf den Erfahrungen am „Demonstrator Null“ und den Antikörpermessungen am Mikroarray-RfS Aufbau, wurde der Versuch mit flächig und manuell auf die aktivierte Chipoberfläche immobilisierten aminofunktionalisierten Oligonukleotiden durchgeführt. Anschließend wurde in der Küvette online mit 1 ml einer komplementären Oligonukleotidlösung mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen (10 µg/mL und 15 µg/mL) hybridisiert. Die Bindung wurde online und zeitaufgelöst an 96 Spots à 20x20 Pixel mit der Software „Screening“ beobachtet. Die gebundenen Oligonukleotide wurden regeneriert und der Versuch wurde mit der zweiten Konzentration wiederholt. Abbildung 59 zeigt die 96 Hybridisierungsereignisse, wie diese von der Software „Screening“ dargestellt werden.

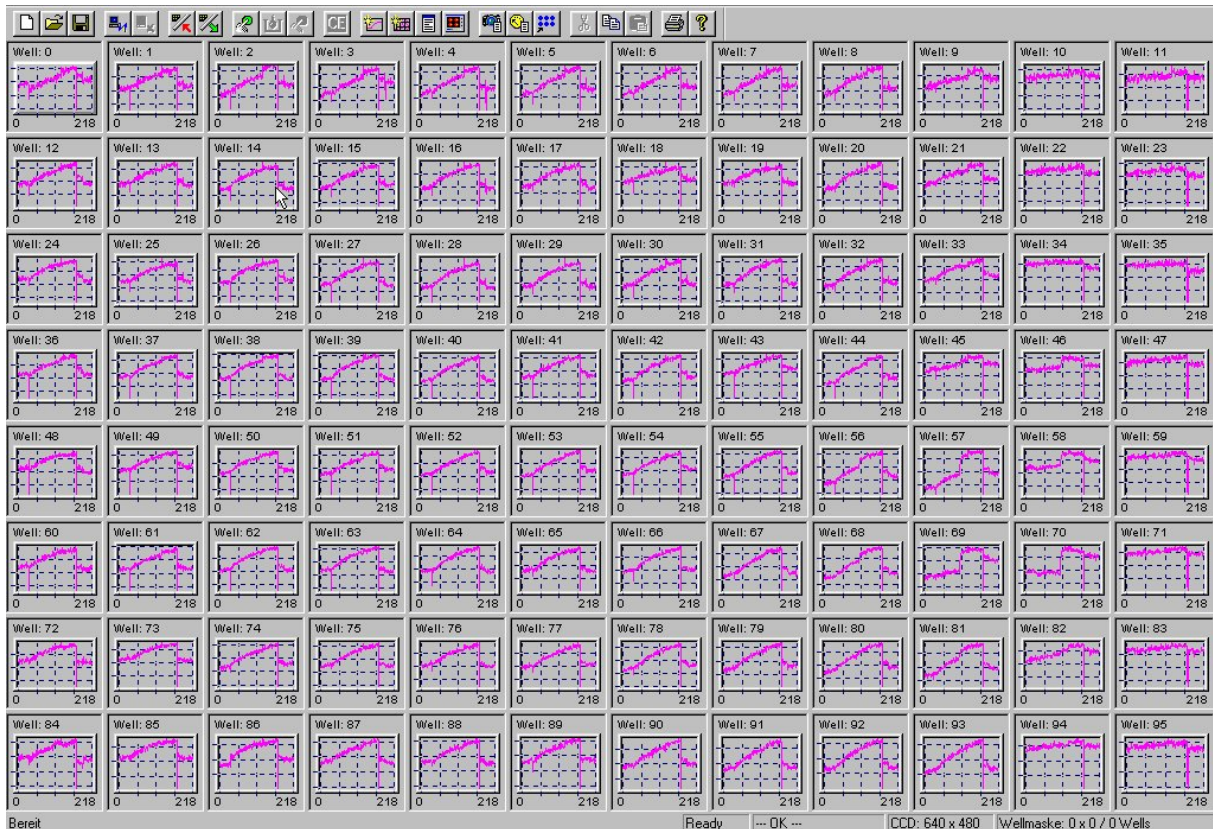


Abbildung 59 Parallele Hybridisierungsmessungen an 96 Messpunkten gleichzeitig aufgenommen. Das Bild ist direkt der Software „Screening“ entnommen, die Skalierungen der Diagramme sind teils unterschiedlich.

Es wurde ebenfalls online mit HCl, pH 1,7 regeneriert und das Hybridisierungsexperiment konnte mit einer höheren Konzentration an Oligonukleotid wiederholt werden. Die Hybridisierungskurven zeigen deutlich die Möglichkeit der simultanen, zeitaufgelösten und auf demselben Chip wiederholten Messung an 96 Spots der Größe 20x20 Pixel. Die auftretenden Inhomogenitäten der Beladung sind auf die unzureichende Genauigkeit der manuellen Immobilisierung zurückzuführen. Die prinzipielle Leistungsfähigkeit des miniaturisierten RfS-Aufbaus bezüglich Homogenität und Reproduzierbarkeit ist davon unberührt.

Da die Darstellung aller 96 Bindungskurven mit teilweise unterschiedlicher Skalierung keine genaue Betrachtung zulässt, ist in Abbildung 60 eine Bindungskurve herausgegriffen. Deutlich erkennt man die Assoziationsphase und die Regeneration bis zur Basislinie. Das Rauschen entspricht hier etwa dem Kurzzeitrauschen, welches auch schon bei den Antikörpermessungen bei gleicher Pixelzahl bestimmt wurde.

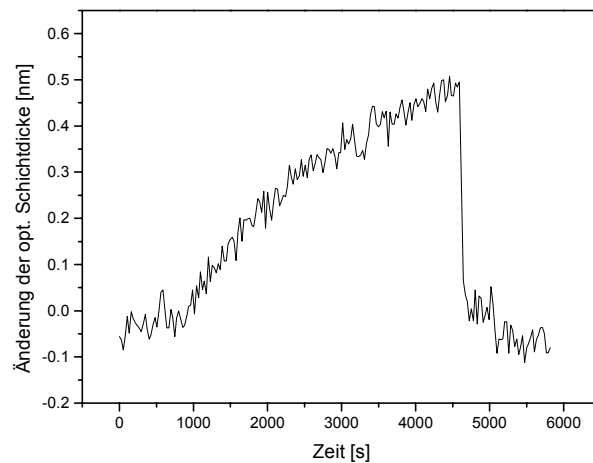


Abbildung 60 Eine Beispielkurve aus den 96 parallelen Hybridisierungskurven. In der zeitaufgelösten Messung erkennt man die Basislinie, die Assoziation und die Regeneration der Mikroarrayoberfläche.

Stellt man die Daten aus den Experimenten wie in Abbildung 61 dar, können die Homogenität und Reproduzierbarkeit des Experiments betrachtet werden.

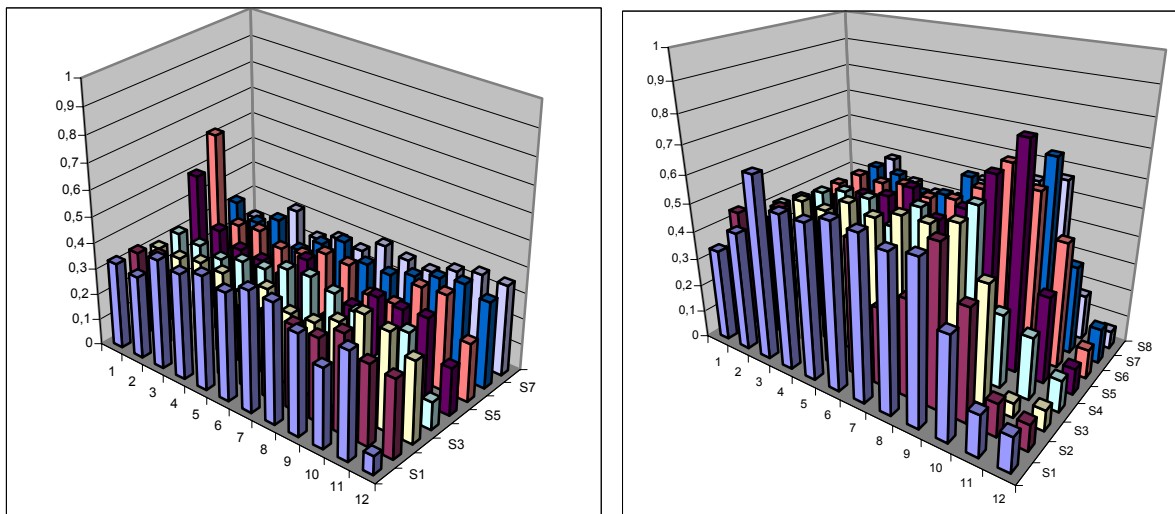


Abbildung 61 Arraydarstellung der Hybridisierung an 96 Spots auf dem Mikroarray mit zwei Konzentrationen

Die Auswertung der konzentrationsabhängigen Experimente ergab die Ergebnisse aus obiger Abbildung. Man erkennt auf dem linken Array (niedrige Konzentration), dass die Hybridisierung über das Array hinweg teilweise inhomogen ist. Zieht man auch die zweite Messung nach Regeneration und erneuter Hybridisierung in die Betrachtung mit ein, so erkennt man, dass einzelne Spots kein höheres Signal zeigen, also vorher bereits in Sättigung

waren. Trotzdem ist dort Regeneration und erneutes Hybridisieren möglich. Die unzureichende Oberflächenbeladung an einzelnen Messpunkten wird auf die Inhomogenität der manuellen Immobilisierung zurückgeführt. Besser immobilisierte Spots zeigen im übrigen eine Konzentrationsabhängigkeit. Allerdings muss die genaue Quantifizierbarkeit noch durch weitere Experimente belegt werden. Aus Voruntersuchungen zeigt sich, dass eine Optimierung, vor allem bezüglich der in dieser Arbeit beschriebenen Oberflächenchemie, leicht möglich ist.

4.2.5.3 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Die Experimente zur Hybridisierung an Mikroarray Oberflächen ergaben insgesamt eine Eignung sowohl des eingesetzten Demonstrators, als auch des neu entwickelten Mikroarray-RfS Aufbaus bezüglich der zeitaufgelösten Beobachtung einer Hybridisierungsreaktion. Die eingesetzten Oberflächen zeigten spezifische und konzentrationsabhängige Effekte und konnten nach Regeneration erneut für Hybridisierungsmessungen verwendet werden. Am „Demonstrator Null“ wurde durch Zehnfachmessungen auch eine sehr gute Reproduzierbarkeit von Messpunkt zu Messpunkt festgestellt. Zeitabhängige Messungen erlaubten die Untersuchung der Auswertequalität nach unterschiedlichen Zeiten der Hybridisierung. bereits nach 250 Sekunden kann das Signal signifikant und konzentrationsabhängig ausgewertet werden. Die Qualität der Messungen steigt bis 1000 Sekunden (Standardabweichung nimmt ab), danach ist keine Verbesserung mehr sichtbar. Zukünftige Messungen im Durchfluss am parallelen System werden hier nochmals einen weiteren Zeit- und Qualitätsvorteil erbringen, wie dieses bereits am Einzelmessplatz nachgewiesen werden konnte.

Der modifizierte Mikroarray-RfS Aufbau erfüllte die Anforderungen, die in dieser Arbeit an ihn gestellt wurden auch bezüglich der Hybridisierungsmessungen. Weiterführende Reihenmessungen werden hier Aufschluss über erreichbare Nachweisgrenzen ergeben. In dieser Arbeit können diese nur aus dem erzielten Rauschen abgeschätzt werden und betragen etwa 100 pg/mm^2 an hybridisierter DNA. Grundsätzlich konnte damit die Miniaturisierung der Probenträger für die RfS-Detektion an Mikroarrays erfolgreich abgeschlossen werden und steht nach weiteren Modifikationen dem Gensensorik Projekt für Anwendungen zur Verfügung.

5 Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Reflektometrische Interferenzspektroskopie den Anforderungen genügt, die an ein Sensorsystem gestellt werden. Hierzu wurden sowohl Einkanal Messungen zur Affinitätsbestimmung durchgeführt, als auch verschiedene parallele Detektionssysteme zur Charakterisierung von Hybridisierungen an Oberflächen verwendet. Die Oberflächenchemie wurde in einem weiten Bereich optimiert und auf die Problemstellung angepasst. Schließlich wurden technische Änderungen an RIfS-Systemen entwickelt, die erstens temperaturabhängige Messungen ermöglichen und zweitens, die markierungsfreien Messungen von Hybridisierungsvorgängen auf Mikroarrays ermöglichen. Zusammenfassend erweist sich die RIfS als optische Detektionsmethode diesen Anforderungen als gewachsen. Die Ziele dieser Arbeit konnten somit erreicht werden.

Im Einzelnen wurden im Verlaufe dieser Arbeit folgende Ergebnisse erzielt:

Ein optischer Detektor wurde zur RIfS-Mikroarray System umgerüstet und optisch charakterisiert. Eine gekühlte CCD-Kamera, neue Wellenlängenbereiche und entsprechende Softwareanpassung ermöglichten es, die Versuche dieser Arbeit an dem Aufbau unter reproduzierbaren Bedingungen durchzuführen und zu dokumentieren. Entsprechend angepasste Probenträgerdesigns ermöglichten Messungen an maximal 96 bzw. 384 Punkten und die Variabilität der Messpunktgrößen. Dadurch konnte der Aufbau grundsätzlich charakterisiert werden.

Die weitere Voraussetzung für erfolgreiche Hybridisierungsmessungen war die Entwicklung der Oberflächenchemie für den Einsatz auf Mikroarrays. Hier konnten Erfolge auf dem Gebiet der Immobilisierung von DNA und PNA Oligonukleotiden erzielt und diese ausführlich charakterisiert werden. Es wurde auch eine Langzeituntersuchung der Stabilität von Biosensoroberflächen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Oberflächen bis zu 300 mal für Hybridisierungsexperimente einsetzen lassen. Ein Kostenfaktor für wiederholte Sensormessungen, nämlich der Ersatz des eingesetzten Arrays, könnte sich dadurch erheblich minimieren lassen. Schließlich zeigte sich bei den Experimenten auch der positive Effekt von beheizten Oberflächen für die Immobilisierung von Oligonukleotiden. Die Konzentrationseffekte und die beschleunigte Reaktion der Aminogruppe mit dem oberflächengebundenen Aktivester wird dafür verantwortlich gemacht. Inzwischen ist diese Methode zu einer Standardmethode für die Immobilisierung auf RIfS-Transducern geworden.

Die parallel dazu in Bremen entwickelte Oberflächenchemie zur Immobilisierung wurde im übrigen als kompatibel zur RIfS-Detektionsmethode erkannt.

Während der Durchführung der Arbeit ergab sich die Notwendigkeit der temperaturabhängigen Messungen von Hybridisierungen im Gensensorik Projekt. Hierfür wurde eine Temperaturmesszelle für den Einkanal-Aufbau entwickelt und getestet. Im Rahmen dieser Arbeit sind keine Daten hierzu angefallen, da diese weiteren Untersuchungen von einem Diplomanden durchgeführt wurden [Wegner 2001].

Wurde der Mikroarray-RIfS-Aufbau zunächst nur technisch und optisch charakterisiert standen danach die Eignungstests für biomolekulare Wechselwirkungsanalytik an. Als geeignetes Modellsystem für eine solche wurde ein Antikörper verwendet, welcher spezifisch an ein kleines Molekül bindet, das an der Oberfläche immobilisiert wurde. Die Immobilisierung auf dem Mikroarray-Probenräger erfolgte hierbei flächig. So konnten der Einfluss von Auswertemasken und Kamerapixeln auf die Qualität der Messungen ermittelt werden. Es konnte ein mittleres Rauschen von bis zu 20 pm auf diesem System erreicht werden. Dies entspricht der Grundanforderung zur Detektion von Hybridisierungsereignissen an der Oberfläche, welche erwartungsgemäß eine optische Schichtdickenänderung von maximal 750 pm bis 1 nm verursachen. Die Qualität der Messung auf der Detektionsseite wurde als sehr gut erkannt. Veränderungen der ausgewerteten Pixelzahl ergaben, wie von der Theorie erwartet, keine signifikanten Einflüsse auf die gemessene optische Schichtdicke. Dabei waren Bindungsmessungen an minimal 2x2 Pixel der CCD-Kamera noch möglich, was die Zahl der untersuchbaren Messpunkte auf der verfügbaren Detektionsfläche theoretisch und ohne Abstand zwischen den Punkten auf ca. 100.000 erhöht. Allerdings sind in diesem Bereich die Rauschwerte von etwa 400 pm nicht mehr ausreichend für Hybridisierungsmessungen.

Schließlich konnten parallele und zeitaufgelöste Hybridisierungsmessungen an zwei RIfS-Systemen gezeigt werden. Mit dem eingesetzten Demonstrator konnte in bis zu 64 getrennten Kavitäten gezeigt werden, dass sich die Hybridisierung nach ca. 250 bis maximal 1000 s Messzeit quantitativ auswerten lässt. Mit dem RIfS-Mikroarray-Aufbau waren aufeinanderfolgende, konzentrationsabhängige Hybridisierungsmessungen an bis zu 96 Messpunkten möglich. Die Homogenität und Reproduzierbarkeit dieser Messungen war zufriedenstellend.

Die Nachweisgrenzen von RIfS Einzelplatzsystemen sind mit denen von fluoreszenzbasierten DNA-Arrays vergleichbar und im unteren nanomolaren bis zum hohen pikomolaren Bereich angesiedelt. Dies zeigt, dass das Potential für diese Nachweisgrenzen im RIfS-System steckt.

Durch mechanische und konstruktive Verbesserungen kann der RfS-Mikroarray-Aufbau diese Grenzen ebenfalls erreichen, auch wenn die Realität heute noch etwa zwei Größenordnungen über diesen Werten liegt (im oberen nanomolaren Bereich). Auch von der Implementierung einer Fluidik kann man sich, auch anhand der Erfahrungen in dieser Arbeit, nochmals eine Steigerung der Nachweisgrenze erwarten (vgl. dazu auch [Haake 2000]).

Es können aufbauend auf diesen Ergebnissen weitere Optimierungsarbeiten, im Wesentlichen an der eingesetzten Oberfläche, dem Einsatz einer geeigneten Fluidik, aber auch an der technischen Umsetzung des RfS-Mikroarray-Laboraebaus vorgenommen werden. Zum Einsatz in einem Gensensor muss der Aufbau außerdem schwingungsfrei und in einem abgedunkelten Gehäuse untergebracht werden.

5.2 Ausblick

Bisher ist ein Einsatz von markierungsfreien, zeitaufgelösten Detektionsmethoden in diesen Gebieten der Hochdurchsatz-Molekularbiologie noch nicht möglich. Fraglich bleibt auch, ob die erforderliche Anzahl von Probenpositionen auf einem Biosensor-Mikroarray je die Dichte bisheriger Fluoreszenzbasierter Detektionsmethoden erreichen wird.

Als sinnvolle Ergänzung der Hochdurchsatzmethoden im Bereich von Arrays mit bis zu 2000 Sonden allerdings könnte die Technik Ihre besonderen Vorteile ausspielen. Insbesondere die Möglichkeit zur Quantifizierung der Probenkonzentrationen, sowie Zusatzinformationen durch kinetische und thermodynamische Daten sind Argumente für einen Einsatz.

Wesentlich sicherer als bei genomischen Assays erscheint der Durchbruch für markierungsfreie Mikroarrays allerdings bei den Herausforderungen der Proteinanalytik in der nahen Zukunft. Vielversprechende Ergebnisse zur funktionalen Proteinanalyse mit RfS finden sich bereits in [Piehler 2001] und [Birkert 2001]. Bisher ist das Problem der hochparallelen Interaktionsanalyse von Proteinen oder Proteinnetzwerken (als Fraktionen von Zelllysaten) noch ungelöst, eine unspezifische Markierung aus funktionserhaltenden Gründen unmöglich. Auch im Bereich therapeutisch oder diagnostisch einzusetzender Biomoleküle wie Antikörper oder antikörperähnliche Affinitätsbinder ist das Potenzial der markierungsfreien Mikroarrays offensichtlicher. Sobald es gilt in hohem Durchsatz Bindemoleküle unter gleichzeitiger Affinitätsbestimmung zu selektieren kann die Methode die Entwicklungsdauer solcher Moleküle beträchtlich beschleunigen. Im Falle der Untersuchung unbekannter Bindemoleküle oder -proteine wird auch eine Kopplung an gängige Proteinidentifizierungstechniken als hoch interessant angesehen.

Es ist zu erwarten, dass die in dieser Arbeit gezeigte Weiterentwicklung der alten markierungsfreien Detektionstechnik RfS, ebenso wie etwa SPR oder Gitterkopplertechniken, stärkeren Einzug in die Bioanalytik halten wird. Insbesondere der Schritt von der Untersuchung sehr klar definierter Oligonukleotide bzw. DNA-Fragmenten auf Mikroarrays hin zu Proteinuntersuchungen wird die Nachfrage nach markierungsfreien Techniken wachsen lassen. Die im Vergleich zu fluoreszenzbasierten Untersuchungen nachteilige da höhere Nachweisgrenze, sowie die Problematik der Spezifität kann durch hocheffektive Oberflächenchemie ausgeglichen werden. Die Anwendung auf Hochdurchsatz Proteinanalytik (sog. Proteomics) wird dabei noch durch eine mögliche Kopplung zu anderen Analysemethoden wie z.B. MALDI-MS [Mehlmann 2003] unterstützt. In Zukunft wird es möglich sein, Bindeproteine direkt aus Zellextrakten an die Oberfläche zu binden, kinetisch und thermodynamisch zu charakterisieren und sie in einem darauffolgenden Schritt mit Hilfe der MS/MS Technik zu sequenzieren und damit zu identifizieren. Damit können markierungsfreie Arrays zur Erkennung von Proteinen als diagnostische Marker oder für die Suche nach neuen Zielmolekülen für die Pharmaforschung zum besseren Verständnis von Krankheiten und deren Bekämpfung wertvolle Dienste leisten.

6 Literatur

- Abel A.P., Weller M., Duveneck G. L., Ehrat M., Widmer H. M., Fiber-Optic Evanescent Wave Biosensor for the Detection of Oligonucleotides, *Anal. Chem.*, 1996, **68**:2905-2912.
- Abrantes M., Magone M. T., Boyd L. F., Schuck P., Adaption of a Surface Plasmon Resonance Biosensor with Microfluidics for Use with Small Sample Volumes and Long Contact Times, *Anal. Chem.*, 2001, **73**:2828-2835.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. Molekularbiologie der Zelle, dritte Auflage, VCH, Weinheim (1995).
- Anderson R.C., Su X., Bogdan G., Fenton J., A Miniature Integrated Device for Automated Multistep Genetic Assays, *Nucl. Acids Res.*, 2000, **28(12)**:e60.
- Barié N., Rapp M., Sigrist H., Ache H.J., Covalent photolinker-mediated immobilization of an intermediate dextran layer to polymer-coated surfaces for biosensing applications, *Biosens. & Bioelectronics* **13** (1998), 855-860.
- Beier M., Hoheisel J., Production by Quantitative Photolithographic Synthesis of Individually Quality Checked DNA Microarrays, *Nucl. Acids Res.*, 2000, **28(4)**:e11.
- Beier M., Hoheisel J.D., Versatile Derivatisation of Solid Support Media for Covalent Bonding on DNA Microchips, *Nucl. Acids Res.*, 1999, **27(9)**:1970-1977.
- Bier F., Kleinjung F., Scheller F.W., Real time measurement of nucleic acid hybridization using evanescent wave sensors - step towards the genosensor, 1997, *Sens. & Act. B*, **38-39**:78-82.
- Benters R., Wöhrle D., Niemeyer C., Dendrimer-Activated Solid Supports for Nucleic Acid- and Protein-Microarrays, *ChemBioChem.*, 2001, **2**:686-694.
- Birkert O., Markierungsfreies Hochdurchsatzscreening mittels Reflektometrischer Interferenzspektroskopie, Dissertation Universität Tübingen 2001.
- Bisswanger H., *Enzymkinetik, Theorie und Methoden*, 2. Aufl., VCH, Weinheim (1994).

- Blake R. C., Pavlov A. R., Blake D. A., Automated Kinetic Exclusion Assays to Quantify Protein Binding Interactions in Homogenous Solution, *Anal. Biochem.*, 1999, **272**:123-134.
- Blohm DH, Guiseppi-Elie A, New developments in microarray technology, *Curr. Op. Biotech.*, 2001, **12**(1):41-47.
- Bongardt, P., Dissertation Universität Tübingen 1999.
- Brecht A., Burckardt R., Rickert J., Stemmler I., Schütz A., Fischer S., Friedrich T., Gauglitz G., and Göpel W., Transducer-Based Approaches for Parallel Binding Assays in HTS, *Journ. of Biomol. Screen.*, **1** (1996), 191-201.
- Brecht A., Gauglitz G., Optical probes and transducers, *Biosens.& Bioelectron.* **10** (1995), 923-936.
- Brecht, A., Gauglitz, G., Optimised layer system for immunosensors based on the RIFs transducer, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1994, **349**:360-366.
- 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.
- Bulyk M.L., Gentalen E., Lockhart D.J., Church G.M., Quantifying DNA-Protein Interactions by Double-Stranded DNA Arrays, *Nat. Biotech.*, 1999, **17**:573-577.
- Cass T., Ligler F.S., Immobilized Biomolecules in Analysis - A Practical Approach, The Practical Approach Series, Hames B.D. (Edt.), Oxford University Press, 1998.
- Chan S., Fauchet P.M., Li Y., Rothberg L., Miller B.L., Porous Silicon Microcavities for Biosensing Applications, *Phys. Stat. Sol. (a)*, 2000, **182**:541-546.
- Cras J.J., Rowe-Taitt C.A., Nivens D.A., Ligler F.S., Comparison of Chemical Cleaning Methods of Glass in Preparation of Silanization, *Biosens.&Bioelectron*, 1999, **14**:683-688.
- Crouch S. R., Scheeline A., Kirkor E. S., Kinetic Determination and Some Kinetic Aspects of Analytical Chemistry, *Anal. Chem.*, 2000, **72**:53R-70R.

- 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.
- Dubiley S., Kirillov E., Mirzabekov A., Polymorphism Analysis and Gene Detection by Minisequencing on an Array of Gel-Immobilized Primers, *Nucl. Acids Res.*, 1999, **27(18)**:e19.
- Eddowes M.J. Theoretical methods for analysing biosensor performance, in *Biosensors-A practical approach*, Cass A.E.G (Ed.) Oxford University Press (1990).
- Edwards D.A. Estimating rate constants in a convection-diffusion system with a boundary reaction, 1999, *J. Appl. Math.* **63**:89-112.
- Egholm M., Buchardt O., Christensen L., Behrens C., Freier S.M., Driver D.A., Berg R.H., Kim S.K., Norden B., Nielsen P.E., PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules, *Nature* 1993, **365**:566-68.
- Evans G.A., Designer Science and the "omic" revolution, *Nature Biotechnol.*, Commentary, 2000, **18**:127.
- Evans W.E., Relling M.V., Pharmacogenomics: Translating Functional Genomics into Rational Therapeutics, *Science*, 1999, **286**:487-491.
- Everhart D. S., Using Self-Assembling Monolayers for Sensors, *Chemtech*, 1999, **4**: 30-37.
- Gauglitz G., Brecht A., Kraus G., Nahm W., Chemical and biochemical sensors based on interferometry at thin (multi-)layers, *Sens. Actuators B* **11** (1993) 21-27.
- Gauglitz G., Opto-chemical and opto-immuno sensors, in: Baltes H., Göpel W., Hesse J. (Heraus.), *Sensors Update Band 1*, Verlag Chemie, Weinheim 1996, 1-35.
- Gauglitz G., Brecht A., Kraus G., Nahm W., Chemical and biochemical sensors based on interferometry at thin (multi-) layers, *Sens. Actuators B* **11** (1993), 21-27.

- Gauglitz G., Opto-chemical and opto-immuno sensors, *Sensors Update Band 1* (Baltes H., Göpel W., Hesse J., Eds.), VCH Weinheim (1996), 1-35.
- Genome Prospecting, **Genome Introduction**, Science 1999, **286**:443-491.
- Gilles P. N., Wu D. J., Foster C. B., Dillon P. J., Chanock S. J., Single Nucleotide Polymorphic Discrimination by an Electronic Dot Blot Assay on Semiconductor Microchips, *Nat. Biotech.*, 1999, **4**: 365-370.
- Glaser, R. W., Antigen-antibody binding and mass transport by convection and diffusion to a surface: A two-dimensional computer model of binding and dissociation kinetics, *Anal. Biochem.*, 1993, **213**:153-161.
- Glaser, R. W., Antigen-antibody binding and mass transport by convection and diffusion to a surface: A two-dimensional computer model of binding and dissociation kinetics, *Anal. Biochem.* **213** (1993) 153-161.
- Guedon P., Livache T., Martin F., Lesbre F., Roget A., Bidan G., Levy I., Characterization and Optimization of a Real Time Parallel, Label-Free, Polypyrrole-Based DNA Sensor by Surface-Plasmon Resonance Imaging, *Anal. Chem.*, 2000, **72**:6003-6009.
- Haake H.-M., Dissertation Universität Tübingen 2000.
- Haake H.-M., Schütz A., Gauglitz G. Label-free Detection of Biomolecular Interaction by Optical Sensors, 2000, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **366,6/7**:576-585.
- Hall D. , Use of Optical Biosensors for the Study of Mechanistically Concerted Surface Adsorption Processes, *Anal. Biochem.*, 2001, **288**, 109-125.
- Havercamp V., Ehrfeld W., Gebauer K., The Potential of Micromixers for Contacting of Disperse Liquid Phases, *Fres. J. Anal. Chem.*, 1999, **364**:617-624.
- Heller R. A., Schena M., Chai A., Shalon D., Bedilion T., Gilmore J., Woolley D.E., Daveis W. R., Discovery and Analysis of Inflammatory-Disease-Related Genes Using cDNA Microarrays, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**:2150-2155.
- Hermanson G.T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, San Diego (1996).

- Hermanson G.T., Mallia A.K., Smith P.K., *Immobilized affinity ligand techniques*, Academic Press, San Diego (1992).
- Hodgson J., Shrinking DNA-Diagnostics to Fill the Markets of the Future, *Nat. Biotech.*, 1998, 16:725-727.
- Hosokawa K., Fujii T., Endo I., Handling of Picoliter Liquid Samples in a Poly(dimethylsiloxane)-Based Microfluidic Device. *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 4781-4785.
- Huang E., Zhou F., Deng L., Studies of Surface Coverage and Orientation of DNA Molecules Immobilized onto Preformed Alkenethiol Self Assembled Monolayers, *Langmuir*, 2000, **16**:3272-3280.
- Jakeway S.C., deMello A.J., Russel E.L., Miniaturized Total Analysis System for Biological Analysis, *Fres. J. Anal. Chem.*, 2000, **366**:525-539.
- Janshoff A., Dancil K.-P., Steinem C., Greiner D., Lin V., Gurtner C., Motesharei K., Sailor M., Ghadiri M.R., macroporous p-Type Silicon Fabry Perot Layers. Fabrication, Characterization and Applications in Biosensing, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120(46)**:12108-12116.
- Jensen K.K., Orum H., Nielsen P.E., Norden B., Kinetics for Hybridization of Peptide Nucleic Acids (PNA) with DNA and RNA studied with the Biacore Technique, *Biochemistry*, 1997, **36**:5072-5077.
- Joss L.A., Morton T.A., Doyle M.L., Myszka D.G., Interpreting kinetic rate constants from optical biosensor data recorded over a decaying surface, 1998, *Anal. Biochem.*, **261**:203-210.
- Jung A., Markierungsfreie Untersuchung der Kinetik von Antigen-Antikörper Wechselwirkungen in homogener Phase, *Diplomarbeit* Universität Tübingen, Inst. Phys. Chem., 1998.
- Jung, A., Richard C., Weber A., A symbolic Numeric Environment for Analyzing Measurement Data in Multi-Model Settings, May 21, 1999, Wilhelm-Schickhard Institut für Informatik, Universität Tübingen, *WSI-99-9*.

- Jung A., Stemmler I., Brecht A., Gauglitz G., Covalent immobilisation strategy of DNA-microspots suitable for microarrays with label-free and time-resolved optical detection of hybridisation, 2001 *Fres. J. Anal. Chem.*, **371**:128-136.
- Karlsson, R., Fält A., Surface Plasmon Resonance Detection and Multispot Sensing for Direct Monitoring of Interactions Involving Low-Molecular-Weight Analytes and Determination of Low Affinities, 1995, *Anal. Biochem.* **228**:274-280.
- Karlsson, R., Ståhlberg R, Experimental design for kinetic analysis of protein-protein interactions with surface plasmon resonance biosensors, 1997, *J. Immunol. Meth.* **200**:121-133.
- Katerkamp A., Meusel M, BMBF-Projektbeschreibung "DNA-Chip", *Medizintechnik*.
- Kraus G., Gauglitz G., Application and comparison of algorithms for the evaluation of interferograms, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1992, **344**:153-157.
- Kröger K., Jung A., Reder S., Gauglitz G., A flexible immobilisation strategy based on PNA-surfaces for quantification of endocrine disruptors, *Anal. Chem. Acta.*, 2002, **469**, 37-48.
- Kröger K., Dissertation Universität Tübingen, 2003.
- Kukanskis K., Elkind J., Melendez J., Murphy T., Miller G., Garner H., Detection of DNA hybridization using the ISPR-1 Surface Plasmon Resonance Biosensor, *Anal. Biochem.* 1999, **274**:7-16.
- Kumar A., Larsson O., Parodi D., Liang Z., Silanized Nucleic Acids: a General Platform for DNA Immobilization, *Nucl. Acids Res.*, 2000, **28**:e71.
- Kumar A., Liang Z., Chemical Nanoprinting: a Novel Method for Fabricating DNA Microchips, *Nucl. Acids Res.*, 2001, **29**:e2.
- La Bean T. H., Yan H., Kopatsch J., Liu F., Winfree E., Reif J., Seeman N. C., Construction, Analysis, Ligation and Self-Assembly of DNA-Triple Crossover Complexes, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**:1848-1860.

- Lee H. J., Goodrich T. T., Corn R., SPR Imaging Measurements of 1-D and 2-D DNA Microarray Created from Microfluidic Channels on Gold Thin Films, *Anal. Chem.*, 2001, **73**:A-G (web publication).
- Lenigk R., Carles M., Ip N., Sucher N., Surface Characterization of a Silicon Chip-Based DNA Microarray, *Langmuir*, 2001, **17**:2497-2501.
- Lindroos K., Liljedahl U., Raitio M., Syvänen A.-C., Minisequencing on Oligonucleotide Microarrays: Comparison of Immobilisation Chemistries, *Nucl. Acids Res.*, 2001, **29(13)**:e69.
- Loakes D., Survey and Summary: The applications of universal DNA base analogues, *Nucl. Acids Res.*, 2001, **29**:2437-2447.
- Lockhart D. J., Winzeler E., Genomics, gene expression and DNA arrays, *Nature*, 2000, **405**:827-836.
- Lohse J., Dahl O., Nielsen P. E., Double duplex invasion by peptide nucleic acid: A general principle for sequence specific targeting of double stranded DNA, *PNAS*, 1999, **96**:11804-11808.
- Lottspeich F., Zorbas H., (Hrsg.), Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 1998.
- MacBeath G., Schreiber S., Printing Proteins as Microarrays for High Throughput Function Determination, *Science*, 2000, **289**:1761-1762.
- Markgren P.O., Hamalainen M., Danielson U.H. Screening of compounds interacting with HIV-1 proteinase using optical biosensor technology, *Anal. Biochem.* (1999) **265** 340-350.
- Marshall A., Hodgson J., DNA-Chips: An Array of Possibilities, *Nat. Biotech.*, 1998, **16**:27-31.
- Martin B.D., Gaber B.P., Patterson C.H., Turner D.C., Direct Protein Microarray Fabrication Using a Hydrogel 'Stamper', *Langmuir*, 1998, **14**:3971-3975.

- Matwveeva O., Felden B. Tsodikov A., Johnston J., Monia B.P., Atkins J.F., Gesteland R.F., Freier S.M., Prediction of Antisense Oligonucleotide Efficacy by In Vitro Methods, *Nat. Biotech.*, 1998, **16**:1374-1375.
- McKay I. A., Kirby L., Volyanik E. V., Kumar V., Wong P. W.Y., Bustin S. A., An Enzyme Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Agents which Interfere with the DNA Binding Activities of Transcription Factors - Exemplified by NF-IL6, *Anal. Biochem.*, 1998, **265**:28-34.
- Mehlmann, M., Dissertation Universität Tübingen 2003.
- Mills J.C., Gordon J.I., A new Approach for Filtering Noise from High-Density Oligonucleotide Microarray Datasets, *Nucl. Acids Res.*, 2001, **29(15)**:e72.
- Myszka D. G., Rich R., Implementing surface plasmon resonance biosensors in drug discovery, *Pharmaceutical Science and Technology Today* 2000, **3**:310-317.
- Myszka D.G., Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors, 1997, *Curr. Opin. Biotech.*, **8**: 50-57.
- 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, (Acc. Article) *Anal. Chem.*, 2001, **73**:1-7.
- Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O, Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide, *Science* 1991, **254**:1497-1500.
- Nielsson P., Persson B., Uhlén M., Nygren P.-A., Real Time Monitoring of DNA Manipulations Using Biosensor Technology, *Anal. Biochem.*, 1995, **224**:400-408.
- Niemeyer C. M., Adler M., Pignatoaro B., Lenhert S., Gao S., Chi L., Fuchs H., Blohm D., Self-assembly of DNA-streptavidin nanostructures and their use as reagents in immuno-PCR, *Nucl. Acids Res.*, 1999, **27**:4553-4561.
- Niemeyer C., Boldt L., Ceyhan B., Blohm D., DNA-directed Immobilization: Efficient, Reversible and Site-Selective Surface Binding of Proteins by Means of Covalent DNA-Streptavidin Conjugates, *Anal. Biochem.*, 1999, **268**, 54-63.

- O'Shannessy D. J., Determination of kinetic rate and equilibrium constants for macromolecular interactions: A critique of the surface plasmon resonance literature, *Curr. Opin. Biotechnol.* **5** (1994) 65-71.
- Ober, R. J., Ward, E. S., The Choice of Reference Cell in the Analysis of Kinetic Data Using BIAcore, *Anal. Biochem.* **271** (1999) 70-80.
- O'Brian T., Johnson L. H., Aldrich J. L., Allen S. G., Liang L.-T., Plummer A. L., Krak S. J., Boiarski A. A., The development of immunoassays to four biological threat agents in a bidiffractive grating biosensor, *Biosens.&Bioelectron.*, 2000, **14**:815-828.
- Piebler J., Brecht A., Gauglitz G., Zerlin M., Maul C., Thiericke R., Grabley S., Label-free monitoring of DNA-ligand interactions, *Anal. Biochem.*, **249** (1997), 94-102.
- Piebler J., Brecht A., Gauglitz G., Zerlin M., Maul C., Thiericke R., Grabley S., Label-free monitoring of DNA-ligand interactions, *Anal. Biochem.*, **249** (1997), 94-102.
- Piebler J., Brecht A., Valiokas R., Liedberg B., Gauglitz G., A High-Density Poly (ethylene glycol) Polymer Brush for Immobilisation on Glass-Typer Surfaces, *Biosens.&Bioelectron.*, 2000, **15**:473-481.
- Piebler J., Schreiber G., Fast Transient Cytokine-Receptor Interactions Monitored in Real Time by Reflectometric Interference Spectroscopy, *Anal. Biochem.*, 2001, **289**:173-186.
- Pierrung M. C., Davis J. D., Odenbaugh A. L., Novel Reagents for Immobilization of DNA on Glass Microchips for Primer Extension, *Langmuir*, 2000, **16**, 2185-2191.
- Pividori M., Merkoci A., Alegret S., Electrochemical Genosensor Design: Immobilisation of Oligonukleotides onto Transducer Surfaces and Detection Methods, *Biosens.&Bioelectron*, 2000, **15**:291-303.
- Quinn J. G., O'Neill S., Doyle A., McAtamney C., Diamond D., McCraith B., O'Kennedy R., Development and Application of Surface Plasmon Resonance-Based Biosensors for the Detection of Cell-Ligand Interactions, *Anal. Biochem.*, 2000, **281**:135-143.

- Radtkey R., Feng L., Muralhidar M., Duhon M., Canter D., DiPierro D., Fallon S., Tu E., McElfresh K., Nerenberg M., Sosnowski R., Rapid, high fidelity analysis of simple sequence repeats on an electronically active microchip, *Nucl. Acids Res.*, 2000, **28**:e17.
- Ramsey G., DNA-Chips: State-of-the-Art, *Nat. Biotech.*, 1998, 16:40-44.
- Rehman F. N., Audeh M., Abrams E. S., Hammond P.W., Kenney M., Boles T. C., Immobilization of acrylamide-modified oligonucleotides by co-polymerization, *Nucl. Acids Res.*, 1999, **27**:649-655.
- Reichert J., Csaki A., Köhler J.M., Fritzsche W., Chip Based Optical Detection of DNA Hybridization by Means of Nanobead Labeling, *Anal. Chem.*, 2000, **72**:6025-6029.
- Rex Dalton (ed.), DIY microarrayers promise DNA chips with everything, *Nature*, 2000, 403:234.
- Riccelli P., Merante F., Leung K., Bortolin S., Zastawny R., Janeczko R., Benight A., Hybridization of Single Stranded DNA Targets to Immobilized Complementary DAN Probes: Comparison of Hairpin versus Linear Capture Probes, *Nucl. Acids Res.*, 2001, **29(4)**:996-1004.
- Rothmund M., Dissertation Universität Tübingen, 1999.
- Rothmund M., Schütz A., Brecht A., Gauglitz G., Berthel G., Gräfe D., Label free binding assay with spectroscopic detection for pharmaceutical screening, *Fresenius J. Anal. Chem.* **359** (1997), 15-22.
- Sanders G. H. W., Manz A., Chip-based microsystems for genomic and proteomic analysis, *TRAC*, 2000, **19**:364-377.
- Sauer M., Optische Detektion von Bindungsvorgängen an mikrostrukturierten Probenträgern, Diplomarbeit, 1998.
- Sauer M., Brecht A., Charisse K., Stemmler I., Gauglitz G., Bayer E. Interaction of chemically modified antisense oligonucleotides with sense DNA: A label free interaction study, *Anal. Chem.*, 1999, **71**:2850-2857.

- Schasfoort R. B. M., Schlautmann S., Hendrikse J., van den Berg A., Field-Effect Flow Control for Microfabricated Fluidic Networks, *Science*, 1999, **286**:942-945.
- Schena M., DNA Microarrays - A Practical Approach, The Practical Approach Series, Hames B.D. (Edt.), Oxford University Press, 2000.
- Schena M., Genome analysis with gene expression microarrays, *Bioessays* **18** (1996), 427-431.
- Schmitt, H-M., Brecht, A.; Piehler, J.; Gauglitz, G., An integrated system for optical biomolecular interaction analysis. *Biosensors & Bioelectronics* 1997, **12(8)**: 809-816.
- Schneider H.-J., Sartorius J., An incremental, empirical approach to non-covalent interactions in and with DNA, *Physical Supramolecular Chemistry, Proceedings of the NATO Advanced Research Workshop, Miami, U.S.A., January 7-10, (1996).*, L. Echegoyen and A.E. Kaifer (eds.) S. 11-25.
- Schuck P., Kinetics of ligand binding to receptor immobilized in a polymer matrix, as detected with an evanescent wave biosensor: I. A computer simulation of the influence of mass transport, *Biophys. J.* **70** (1996) 1230-1249.
- Schuck P., Millar D. B., Kortt A. A., Determination of Binding Constants by Equilibrium Titration with Circulating Sample in an Surface Plasmon Resonance Biosensor, *Anal. Biochem.*, 1998, **265**:79-91.
- Schütz, Armin, Dissertation Universität Tübingen, 2000.
- Schuetz A. J., Winklmaier M., Weller M., Niessner R., Selection of hapten structures for indirect immunosensor arrays, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1999, **363**:625-631.
- Schwarz F.P., Robinson S., Butler J.M., Thermodynamic comparison of PNA/DNA and DNA/DNA hybridization reactions at ambient temperature, *Nucleic Acids Res.* 1999, **27 (24)**:4792-4800
- Shank-Retzlaff M. L., Sligar S. G. Analyte Gradient-Surface Plasmon Resonance: A One-Step Method for Determining Kinetic Rates and Macromolecular Binding Affinities, *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 4212-4220.

- Smith S. A., Brodsky A. M., Vahey P. G., Burgess L. W., Nanoparticle Characterization in Nanoliter Volumes by Grating Light Reflection Spectroscopy, *Anal. Chem.*, 2000, **72**:4428-4434.
- Stemmers F. J., Ferguson J. A., Walt D. R., Screening unlabeled DNA targets with randomly ordered fiber-optic gene arrays, *Nat. Biotech.*, 2000, **18**:91-96.
- Steiner G., Sablinkas V., Hübner A., Kuhne Ch., Salzer R., Surface Plasmon Resonance imaging of microstructured monolayers, *J. Mol. Struct.*, 1999, **509**:265-273.
- Stemmler I., Miniaturisierte Affinitätsanalytik - Ortsaufgelöste Oberflächenmodifikation, Assays und Detektion, Dissertation Universität Tübingen, 1999.
- Stomakhin A., Vasiliskov V., Timofeev E., Schulga D., Cotter R., Mirzabekov A., DNA Sequence Analysis by Hybridization with Oligonucleotide Microchips: MALDI Mass Spectrometry Identification of 5mers Contiguously Stacked to Microchip Oligonucleotides, *Nucl. Acids Res.*, 2000, **28(5)**:1193-1198.
- Strother T., Cai W., Zhao X., Hamers R. J., Smith L. M., Synthesis and Characterization of DNA-modified Silicon (111) surfaces, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**:1205-1209.
- Swinney K., Markov D., Bornhop D. J., Chip-Scale Universal Detection Based on Backscatter Interferometry, *Anal. Chem.*, 2000, **72** 2690-2695.
- Talary M.S., Burt J.P.H., Pethig R., Future Trends in Diagnosis Using Laboratory on a Chip Technologies, *Parasitology*, 1998, **117**:S191-203.
- Taton T., Mirkin C., Letsinger R., Scanometric DNA Array Detection with Nanoparticle Probes, *Science*, 2000, **289**:1757-1762.
- Thuong N.T., Helene C., *Angew. Chemie* 1993, **105**:697-723.
- The Genome International Sequencing Consortium, Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature* 2001, **409**:860-921 (15 February 2001)

- Tillib S.V., Strizhkov B., Mirzabekov A., Integration of Multiple PCR Amplifications and DNA Mutation Analyses by Using Oligonucleotide Microchips, *Anal. Biochem.*, 2001, **292**:155-160.
- Toyama S., Shoji A., Yoshida Y., Yamauchi S., Ikaryama Y., Surface design of SPR-based binding of antigen or antibody in the evanescent field using mixed polymer matrix, *Sens. Actuators. B*, 1998, **52**:65-71.
- Uhlmann E., Peyman A., Antisense oligonucleotides, structure and function, in *Molecular biology and biotechnology: a comprehensive desk reference*, ed. by Robert A. Meyers, New York, 1995.
- Van Akker E. B., Bos M., van der Linden W. E., Continuous, pulsed and stopped flow in a μ -flow injection system (numerical vs experiment), *ACA*, 1999, **378**:111-117.
- Venter Craig J. et. al., The Sequence of the Human Genome, *Science* 2001, **292**: 1838.
- Wang J., From DNA Biosensors to Gene Chips, *Nucl. Ac. Res.*, 2000, **28(16)**:3011-3016
- Wang Z.-X. A Novel Method for Determining Kinetic Parameters of Dissociating Enzyme Systems, *Anal. Biochem.*, 1998, **264**:8-21.
- Ward L. D., Winzor D., Relative Merits of optical Biosensors Based on Flow-Cell and Cuvette Designs, *Anal. Biochem.*, 2000, **285**:179-193.
- Wegner M., Diplomarbeit 2001, Einsatz von temperaturabhängigen RfS- Messungen zur Untersuchung der Hybridisierung von Oligonukleotiden.
- Yang M., Yau H., Chan H. L., Adsorption Kinetics and Ligand-Binding Properties of Thiol-Modified Double Stranded DNA on a Gold Surface, *Langmuir*, 1998, **14**:6121-6129.
- Yang R.-H., Wnag K.-M, Xiao D., Luo K., Yang X.-H., Flow Injection Renewable Drops Technique for Assay of Micro Amounts of DNA, *Analytica Chim. Acta*, 2001, **432**:135-141.
- Ye J.Y., Umemura K., Ishikawa M., Kuroda R., Atomic Force Microscopy of DNA Molecules Stretched by Spin-Coating Technique, *Anal. Biochem.*, 2000, **281**:21-25.

Zamenic P., Stephenson M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1978, **75**:280.

Zhao X., Nampalli S., Serino A. J., Kumar S., Immobilization of oligodesoxyribonucleotides with multiple anchors to microchips, *Nucl. Acids Res.*, 2001, **29**:955-959.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

ACA	Atrazincapronsäure = 4-Chloro-6-(isopropylamino)-1,3,5-triazin-2-(6'-amino)-capronsäure
AMD	Aminodextran
BIA	Biomolecular Interaction Analysis (Biomolekulare-Wechselwirkungsanalytik)
BSA	Bovine Serum-Albumin (Rinderserumalbumin)
cDNA	Complementary DNA (stabile, geklonte Kopien der instabilen mRNA)
DIC	1,3-Diisopropylcarbodiimid
DMF	Dimethylformamid
EDC	Ethyl(dimethylaminopropyl)carbodiimid-Hydrochlorid
FIA	Fließinjektionsanalyse
GC	Gaschromatographie
GOPTS	Glycidylxypropyltrimethoxysilan
HTS	High Throughput Screening
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
mRNA	Messenger RNA
NHS	N-Hydroxysuccinimid
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl. <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
PDMS	Polydimethylsiloxan
PMMA	Polymethylmetacrylat
PNA	Peptid-Nukleinsäure (engl. <i>Peptide Nucleic Acid</i>)
RfS	Reflektometrische Interferenzspektroskopie
SAM	engl. <i>Self Assembled Monolayer</i>
SIA	Sequential Injection Analysis
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz (engl. <i>Surface Plasmon Resonance</i>)

7.2 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren:

K. Albert, E. Bayer†, D. Christen, H. Eckstein, G. Gauglitz, J. Gelinek†, W. Göpel†, P. Grathwohl, G. Häfelinger, H. P. Hagenmaier, M. Hanack, V. Hoffmann, G. Jung, S. K. Kemmler-Sack†, B. Koppenhöfer, A. Kovar, D. Krug, E. Lindner, U. Nagel, W. Nakel, H. Pauschmann, G. Pausewang, H. Pommer, H. Oberhammer, D. Oelkrug, P.-C. Schmid, V. Schurig, F. F. Seelig, H. Stegmann, J. Strähle, W. Voelter, C. Ziegler.

7.3 Lebenslauf

Alexander Jung, Dipl.-Chem.

Litscherweg 4a

88662 Überlingen

alexandj@web.de

Persönliche Daten

Geburtstag 19. März 1968

Geburtsort Horb a.N.

Nationalität deutsch

Familienstand ledig

Ausbildung

1978 - 1987 Kepler Gymnasium in Freudenstadt

4. Mai 1987 Abitur (Note: 2,2)

1997 – 1989 Zivildienst
Körperbehindertenförderung Neckar Alb e.V.

1989 - Chemiestudium (Diplom) an der Eberhard-Karls Universität
Tübingen

1991 Vordiplomsprüfung Chemie

1993 - 1995 Freie Mitarbeit an Betriebsratsseminaren zum betrieblichen
Arbeits- und Gesundheitsschutz bei der IG Chemie

1997 – 1998 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Gauglitz, Institut für
Physikalische Chemie mit dem Titel "Markierungsfreie
Untersuchung der Kinetik von Antigen-Antikörper
Wechselwirkungen in homogener Phase." (Note: 1)

01/1998 Diplom-Chemiker (Note: 1,4)

02/1998 – 11/2001 Anfertigen der Dissertation mit dem Titel „Parallele, markierungs-
freie Detektion biomolekularer Wechselwirkungen an
Mikroarrays“ unter der Anleitung von Prof. Dr. G. Gauglitz.

1997 – 2001 Stipendiat und Kollegiat im DFG-Graduiertenkolleg "Quantitative
Analyse und Charakterisierung pharmazeutisch und biochemisch
relevanter Substanzen". Studentischer Sprecher des Kollegs von
1999 bis 2001.

seit 2002 „Project Scientist“ bei der Firma Applied Biosystems, in
Überlingen in der Arbeitsgruppe von Dr. Michael Steinwand.

Publikationen

A. Jung, C. Richard, A. Weber, *A symbolic Numeric Environment for Analyzing Measurement Data in Multi-Model Settings*, May 21, 1999, Wilhelm-Schickhard Institut für Informatik, Universität Tübingen, WSI-99-9.

A. Jung, I. Stemmler, A. Brecht, G. Gauglitz, *Covalent immobilisation strategy of DNA-microspots suitable for microarrays with label-free and time-resolved optical detection of hybridisation*, 2001 *Fres. J. Anal. Chem.*, 371:128-136.

A. Jung, K. Kröger, C. Hänel, O. Birkert, G. Gauglitz, Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, *Markierungsfreie Online-Detektion der Hybridisierung auf einem DNA-Chip : Detektionsmethode für den Gensensor*, URL: <http://w210.ub.uni-tuebingen.de/dbt/volltexte/2001/400/>.

A. Jung, *DNA chip technology*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2002) 372:41-42

K. Kröger, A. Jung, C. Barzen, G. Gauglitz, *Versatile biosensor surface based on peptide nucleic acid with label free and total internal reflection fluorescence detection for quantification of endocrine disruptors*, *Analytica Chimica Acta* (2002), 469:37-48.

Überlingen, 19. Dezember 2003