

Oberflächenplasmonenresonanz-basierte DNA-Chips
und Nucleobasen-Sequenzentwurf

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden

von

Diplom-Chemiker ALFRED KICK

geboren am 15. Oktober 1981 in Schabo

Eingereicht am 28. März 2013

Die Dissertation wurde in der Zeit von Jan. 2008 bis Febr. 2012 an der Professur für Physikalische Chemie, Mess- und Sensortechnik und von März 2012 bis März 2013 am Kurt-Schwabe-Institut für Mess- und Sensortechnik e. V. Meinsberg angefertigt.

1. Gutachter:

Prof. Dr. Michael Mertig, Technische Universität Dresden

2. Gutachter:

Prof. Dr. Patrick Wagner, Universiteit Hasselt

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	vii
Einleitung	1
I DNA-Mikroarrays	5
1 Grundlagen	7
1.1 DNA-Biosensoren	7
1.2 Forschungsbedarf an SPR-Sensoren	10
1.3 SPR-basierte Mikroarrays	10
1.4 TAG/Anti-TAG-System	15
1.5 Oberflächenplasmonenresonanz	17
1.6 Funktionalisierung auf Goldsubstraten	20
1.6.1 Thiole auf Goldoberflächen	20
1.6.2 Immobilisierung der DNA-Sonden	24
1.7 Röntgenphotoelektronenspektroskopie	27
1.8 Mikrokontaktdrucke	27
1.9 Flüssigkeitsmorphologien auf Oberflächen	28
1.10 DNA-Hybridisierung in freier Lösung	30
1.11 DNA-Hybridisierung auf Mikroarrays	34
1.12 Mikrofluidik	37
2 Material und Methoden	39
2.1 XPS-Untersuchungen zur Sondendichte	39
2.2 SPR-Chip und SPR-Spektrometer	40
2.3 Mikrofluidik	41
2.4 Synthese der PCR-Produkte	41

2.5	Linearität und Empfindlichkeit des SPR-Sensors	42
2.6	Vorversuche: DNA-Mikroarrays auf SPR-Chips	42
2.6.1	Blocken und unspezifische Adsorption	42
2.6.2	Aufbau der DNA-Mikroarrays auf SPR-Chips	42
2.6.3	Hybridisierung 17 verschiedener Anti-TAGs	45
2.7	Optimierung der Immobilisierung	45
2.8	Einfluss der Konzentration, Länge und Struktur der PCR-Produkte .	48
2.8.1	Immobilisierung der Anti-TAG- und Kontrollsonden	48
2.8.2	Hybridisierungsparameter	49
2.8.3	Auswertung der SPR-Signale	49
2.9	Fluoreszenzmikroskopie	49
2.10	Strukturierung durch μ CP	50
2.10.1	Herstellung des Masters	50
2.10.2	Herstellung der PDMS-Stempel	50
2.10.3	Mikrokontaktdrucken	51
2.10.4	Beschichtung hydrophiler Oberfläche mit Sonden-DNA . . .	52
2.11	Phosphorothioat-DNA-Sonden	52
3	Ergebnisse und Diskussion	55
3.1	XPS-Untersuchungen zur Sondendichte	55
3.2	Linearität und Empfindlichkeit des SPR-Sensors	57
3.3	Vorversuche: DNA-Mikroarrays auf SPR-Chips	59
3.3.1	Blocken und unspezifische Adsorption	59
3.3.2	Glycerin als Additiv zur Immobilisierungslösung	61
3.3.3	Einfluss der TAG/Anti-TAG-Sequenzen auf SPR-Signale . . .	61
3.4	Optimierung der Immobilisierungslösung	63
3.5	Einfluss der PCR-Produktkonzentration auf SPR-Signale	65
3.6	Einfluss der PCR-Produktlänge auf SPR-Signale	69
3.7	Einfluss der Haarnadelstrukturen auf SPR-Signale	72
3.8	Spezifität des TAG/Anti-TAG-Systems	72
3.9	Hybridisierungskinetik und Massentransport	75
3.10	Strukturierung der Sensoroberflächen durch μ CP	78
3.11	Phosphorothioat-DNA-Sonden	82
3.12	SPR-Chips zur Mutationsanalyse der akuten myeloischen Leukämie	85
4	Zusammenfassung und Ausblick	89

II	Nucleobasen-Sequenzentwurf	91
5	Ein erschöpfender Algorithmus	93
5.1	Bisherige Software und Algorithmen	94
5.2	Kriterien und Optionen des EGNAS-Algorithmus	95
5.3	Intrastrang-Eigenschaften	97
5.3.1	Haarnadelstrukturen und Selbstkomplementarität	97
5.3.2	Gleiten	97
5.3.3	Kontrolle der Intra- und Interstrang-Eigenschaften	98
5.3.4	Wechselwirkungen mit Nachbarsequenzen	98
5.4	Ablauf des erschöpfenden Algorithmus	100
6	Softwarevergleich und Leistungstests	103
6.1	Programmierung und Computersystem	103
6.2	Criton-Regeln und Intrastrang-Eigenschaften	103
6.3	Einfluss des GC-Gehaltes und der GC-Enden auf die Satzgröße . . .	104
6.4	Satzgröße in Abhängigkeit von der Sequenz- und Criton-Länge . . .	106
6.5	Schwankung der Sequenzgröße	107
6.6	Gleiten und dessen Einfluss auf die Satzgröße	109
6.7	Steuerung der Intrastrang-Eigenschaften	110
6.8	Rechnungen mit einbezogenen Sequenzen	113
6.9	Abwägen der Intra- und Interstrang-Eigenschaften	115
6.10	Rechenzeit	118
7	TAG-Primer-Paarung	119
8	TAGs und Anti-TAGs für DNA-Origami	123
8.1	TAGs für ein dreiecksförmiges DNA-Origami	124
8.2	TAGs für Sechs-Helixbündel-Nanoröhren	125
9	Zusammenfassung und Ausblick	129

Fazit	131
Anhang	133
A Verwendung der EGNAS-Software	133
A.1 Ausführen des Programms	133
A.2 Sequenzentwurf-Kriterien und Optionen	133
A.3 Konfigurationsdatei	134
A.4 Ausgabe der Ergebnisse	135
Literaturverzeichnis	137
Abbildungsverzeichnis	157
Tabellenverzeichnis	161
Eigene wissenschaftliche Veröffentlichungen	163
Danksagung	167
Erklärung	169

Abkürzungsverzeichnis

AML	akute myeloische Leukämie
ATR	abgeschwächte Totalreflexion, engl. <i>attenuated total reflection</i>
bp	Basenpaar
CCD	ladungsgekoppeltes Bauelement, engl. <i>charge-coupled device</i>
dA	2'-Desoxyadenosin
ddCTP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddUTP	Didesoxyuridintriphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure, engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
dT	2'-Desoxythymidin
EGNAS	Nucleinbasen-Sequenzentwurf-Algorithmus, engl. <i>exhaustive generation of nucleic acid sequences</i>
IUPAC	engl. <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
MCH	6-Mercapto-1-hexanol
MCU	11-Mercapto-1-undecanol
μCP	Mikrokontaktdrucken, engl. <i>microcontact printing</i>
ODN	Oligodesoxynucleotid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, engl. <i>polymerase chain reaction</i>
poly(dA)	Homopolynucleotid mit dA-Bausteinen
poly(dT)	Homopolynucleotid mit dT-Bausteinen
PT	Phosphorothioat
RNA	Ribonucleinsäure, engl. <i>ribonucleic acid</i>
SAM	Selbstorganisierende Monoschicht, engl. <i>self assembled monolayer</i>
SBE	Einzelbasenverlängerung, engl. <i>single-base extension</i>
SNP	Einzelbasenpolymorphie, engl. <i>single-nucleotide polymorphism</i>
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz, engl. <i>surface plasmon resonance</i>
XPS	Röntgenphotoelektronenspektroskopie, engl. <i>X-ray photoemission spectroscopy</i>

Einleitung

Biosensoren zur sequenzspezifischen Detektion der Nucleinsäuren, insbesondere der Desoxyribonucleinsäure (DNA⁽¹⁾), werden als DNA-Chips bezeichnet. Diese Sensoren besitzen eine hohe Anzahl unterschiedlicher Sondenorte mit einzelsträngiger DNA definierter Sequenzen. Informationen über Sequenzen und Gehalt der Nucleinsäuren in einem Genom sind in der Molekularbiologie sehr hilfreich und notwendig. Die Anwendungsfelder, in denen DNA-Chips eingesetzt werden können, erstrecken sich von der medizinischen Diagnostik über die Lebensmittelindustrie bis zur Forensik. Daraus ergeben sich bestimmte Anforderungen an die Analytik mittels der DNA-Chips. Einerseits soll die schnelle und parallele Durchführung vieler Nachweise mit einem geringen Probenvolumen einen hohen Durchsatz ermöglichen. Andererseits sind eine einfache Bedienbarkeit und der Einsatz der Sensoren vor Ort wünschenswert.

Zur Analyse genomischer Nucleinsäuresequenzen aus biologischen Proben werden Zellen entnommen, aus denen das genetische Material isoliert wird. Mittels molekularbiologischer Methoden können anschließend bestimmte Abschnitte eines Genoms vervielfältigt und auf unterschiedliche Weise markiert werden. Die Vervielfältigung erfolgt sehr häufig durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR⁽²⁾). Da die einfache PCR doppelsträngige DNA ergibt, werden unterschiedliche Techniken zur Schaffung einzelsträngiger DNA-Abschnitte angewendet. Dementsprechend angepasste PCR-Produkte werden auf die Sensoroberfläche eines DNA-Chips gegeben. In diesem Fall beruht die molekulare Erkennung auf dem Prinzip komplementärer Basenpaarungen, der Hybridisierung, zwischen den Sonden und den PCR-Produkten. Zum Nachweis der Hybridisierung werden sehr häufig Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt. Die entsprechenden Fluoreszenzsignale werden ausgewertet und den Sondenorten bestimmter Sequenzen zugeordnet. DNA-Chips zur Untersuchung

⁽¹⁾ engl. *deoxyribonucleic acid*

⁽²⁾ engl. *polymerase chain reaction*

der Hybridisierung mittels Fluoreszenz haben den Vorteil einer hohen Dichte der Sondenorte (Spot-Dichte). Darüber hinaus kann die Fluoreszenz sehr empfindlich detektiert werden. Von Nachteil ist jedoch, dass DNA-Modifikationen mit Fluoreszenzfarbstoffen die Hybridisierung beeinflussen können. In der Regel sind nur die Fluoreszenzsignale vor und nach einer Hybridisierung erhältlich. Die Kinetik ist mit den etablierten Methoden ohne weiteren Aufwand meist nicht zugänglich. Zusätzlich entstehen Kosten für die Fluoreszenzfarbstoffe und für deren kovalente Anbindung an die DNA. Neue sensitive, spezifische und markierungsfreie Methoden sind daher von wachsendem Interesse. Aus diesem Grund behandelt die vorliegende Arbeit den Aufbau der DNA-Chips, welche auf Oberflächenplasmonenresonanz (SPR⁽³⁾) basieren. Die SPR wird an Metallen beobachtet, wenn Licht einer gegebenen Wellenlänge auf die Metalloberfläche in einem bestimmten Winkel trifft. Im Winkelspektrum der Intensität des reflektierten Lichts tritt ein Minimum beim Winkel der sogenannten Plasmonenresonanz auf. Eine Änderung des Brechungsindex im Medium der an das Metall grenzenden Schicht hat eine Verschiebung des SPR-Minimums zur Folge. Die Bindung bzw. Adsorption der Moleküle an der Metalloberfläche führen zur Änderung des Brechungsindex und können dadurch sehr sensitiv mittels eines SPR-Spektrometers verfolgt werden. Das Prinzip der SPR erfordert somit keine Markierungen der Analyten und ermöglicht Echtzeitmessungen biomolekularer Wechselwirkungen.

In der vorliegenden Arbeit wird die Entwicklung einer Plattformtechnologie zur Detektion genetischer Eigenschaften mittels SPR beschrieben. Diese genetischen Eigenschaften können Mutationen im menschlichen Erbgut oder Variationen im Genom unterschiedlicher Mikroorganismen sein. Wenn die gesuchten Sequenzen bekannt sind, werden PCR-Primer⁽⁴⁾ eingesetzt, an welche eine TAG-Sequenz gebunden ist. Ein TAG ist ein DNA-Abschnitt, welcher als Einzelstrangüberhang eines doppelsträngigen PCR-Produkts mit einer einzelsträngigen DNA-Sonde hybridisieren kann. Diese Sonde enthält die zum TAG komplementäre Anti-TAG-Sequenz und ist auf dem DNA-Chip immobilisiert. Wenn in der PCR ein Produkt gebildet wird, kann dieses anhand des entsprechenden TAGs nachgewiesen werden, anderenfalls werden die Primer-TAG-Paare aus dem Reaktionsgemisch bei der Reinigung entfernt. Demzufolge kann jedem TAG eine genetische Eigenschaft zugeordnet werden. Ein TAG/Anti-TAG-System entkoppelt somit die Detektion

⁽³⁾ engl. *surface plasmon resonance*

⁽⁴⁾ engl. *primer*, einzelsträngige Nucleinsäuren als Startmoleküle in der PCR

auf dem Mikroarray von den spezifischen Hybridisierungen zwischen den Primern und dem genetischen Material in der PCR.

Die beschriebene SPR-Plattformtechnologie beinhaltet ein neuartiges SPR-Spektrometer, welches ein Array streifenförmiger Bereiche der Sensoroberfläche ausliest. Daher sind die optimalen Spots parallele Streifen mit homogener Sondendichte, entlang derer die SPR-Signale gemittelt werden. Die Aufgabe besteht also darin, die Sondenlösungen in Linien auf die Sensoroberfläche zu bringen.

Dabei sind die chemischen und physikalischen Bedingungen zur Kontrolle der Sondendichte zu beachten, was in Teil I der vorliegenden Dissertation behandelt wird. Es werden DNA-Sonden mit Thiolmodifikationen oder mit Phosphorothioatgruppen verwendet, um DNA-Mikroarrays auf Goldoberflächen der SPR-Chips aufzubauen. Eine wichtige Rolle spielt dabei das Blocken der Sensoroberfläche gegen unspezifische Adsorptionen, da diese eine sequenzspezifische Detektion verhindern können.

Weiterhin sind die Hybridisierungsbedingungen entscheidend für den erfolgreichen Einsatz der DNA-Chips. Die Sequenzabhängigkeit der Hybridisierung muss berücksichtigt werden und kann durch einen gezielten Entwurf der TAG- und Anti-TAG-Sequenzen beeinflusst werden. Rückfaltungen der Sonden müssen verhindert werden, da diese die Hybridisierungseffizienz deutlich senken. Die TAG- und Anti-TAG-Sequenzen können wirkungsvoll durch ein rechnergestütztes Verfahren konzipiert werden. Daher wird in Teil II ein Nucleobasen-Sequenzentwurf-Algorithmus vorgestellt. Dieser Algorithmus wird in einem Computerprogramm zur Generierung optimierter, einzigartiger Sequenzen verwendet. Wesentliche Anforderungen an das Programm sind zum einen die Vermeidung komplementärer Subsequenzen bestimmter Längen innerhalb ein und derselben Sondensequenz, zum anderen müssen die Sequenzen möglichst einzigartig sein, damit keine Kreuzhybridisierungen auftreten.

Teil I

DNA-Mikroarrays

Kapitel 1

Grundlagen

In diesem Kapitel werden die grundlegenden Prinzipien der DNA-Biosensoren betrachtet. Es wird auf den Stand der Forschung und die Entwicklung auf dem Gebiet der DNA-Biosensoren, die auf der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie basieren, eingegangen. Insbesondere wird der Aufbau der DNA-Mikroarrays auf Goldoberflächen beschrieben, was eine Voraussetzung für die Nutzung der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie zum markierungsfreien Nachweis biomolekularer Wechselwirkungen darstellt. Es werden Methoden und Strategien zur Beschichtung der Goldsubstrate vorgestellt. Außerdem werden Möglichkeiten für die schnelle und spezifische Detektion der DNA-Hybridisierungen gezeigt.

1.1 DNA-Biosensoren

Nach der Definition der IUPAC⁽⁵⁾ ist ein chemischer Sensor eine Anordnung, welche chemische Information in ein analytisches Signal umwandelt [1]. Diese Information kann die Konzentration eines spezifischen Bestandteils oder die Zusammensetzung einer Probe sein. Eine essentielle Komponente chemischer Sensoren ist das chemische Erkennungssystem. Ein entsprechendes Erkennungselement ermöglicht eine stoffspezifische Wechselwirkung, welche die Stofferkennung erlaubt. Das dadurch erzeugte Signal muss durch einen Transducer⁽⁶⁾ an eine in der Regel elektronische Vorrichtung weitergeleitet werden. Elektronische Vorrichtungen können zum Beispiel Messverstärker oder Analog-Digital-Wandler sein.

Biosensoren sind eine Untergruppe der Chemosensoren, bei denen das Erkennungs-

⁽⁵⁾ engl. *International Union of Pure and Applied Chemistry*

⁽⁶⁾ engl. *transducer*, Signalwandler

system auf biochemischen Mechanismen beruht. Die Nutzung biomolekularer Erkennungselemente hat den Vorteil einer hohen Spezifität. Es werden insbesondere Enzyme, Antikörper, Proteine oder Nucleinsäuren genutzt. Im Vergleich zu Chemosensoren sind Biosensoren sehr selektiv für die zu messenden Analyten. Jedoch ist ihre Lebensdauer oft durch Stabilitätsprobleme der biologischen Bestandteile eingeschränkt.

Biosensoren können nach der Art des Transducers oder nach der Art des biologischen Erkennungsmechanismus klassifiziert werden. Die Klassifikation nach Art des Transducers beinhaltet elektrochemische, elektrische, optische, magnetische, massensensitive und thermische Messgrößen. Wenn das Erkennungselement, die Sonde, im Vordergrund steht, unterscheidet man zwischen Biosensoren mit biokatalytischen Erkennungselementen⁽⁷⁾ oder mit Erkennungselementen auf Grundlage der Bioaffinitäten⁽⁸⁾.

Mikroarrays sind flache Trägermaterialien mit einer hohen Anzahl unterschiedlicher Sondenorte pro Flächeneinheit. Auf den Sondenorten, die auch als Spots bezeichnet werden, sind Biomoleküle gebunden, welche für spezifische bzw. selektive Wechselwirkungen mit den Analytmolekülen verantwortlich sind. Je mehr Sondenorte mit unterschiedlichen molekularen Erkennungselementen auf der Sensoroberfläche angeordnet sind, umso mehr Informationen über die untersuchte Probe sind zugänglich. Man spricht auch von der Informationsdichte oder der Komplexität eines Chips. Die Sondenorte werden im definierten Abstand, dem sogenannten Pitch, zueinander angeordnet. Der typische Pitch liegt in der Größenordnung von 50 bis 500 μm . Eine weitere Schlüsselgröße ist die Oberflächenkonzentration der Sonden, die Sondendichte. Die Sondendichte verhält sich also reziprok zum Sondenabstand. In Abbildung 1.1 ist das Schema eines Mikroarray mit den charakteristischen Größen gezeigt. Weil die Mikroarrays meist die Größe von wenigen Quadratzentimetern besitzen, ist auch die zur Analyse benötigte Menge der biologischen Probe gering. Damit ist eine schnelle, einfache und kostengünstige Detektion biomolekularer Wechselwirkungen möglich.

DNA-Mikroarrays beinhalten immobilisierte DNA-Sonden. Die ersten Mikroarrays wurden durch photolithographische Verfahren hergestellt. Dieses Verfahren nutzt man zur Herstellung der Computerchips. Daher werden DNA-Mikroarrays auch als DNA-Chips bezeichnet [2, 3]. Die Immobilisierung der Sonden ist ein kriti-

⁽⁷⁾ Gewebe, ganze Zellen; Zellorganelle oder deren Bestandteile; Enzyme

⁽⁸⁾ Antigen-Antikörper-Wechselwirkung, Rezeptor/Antagonist/Agonist, Aptamere und komplementäre Nucleinsäuren

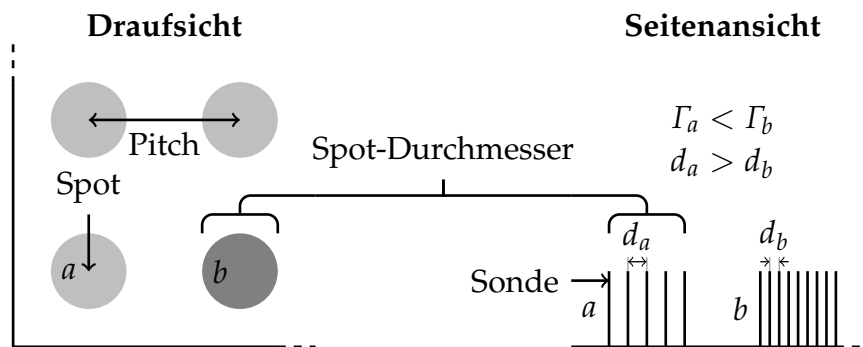


Abbildung 1.1: Charakteristische Größen eines Mikroarrays. Die Sondenorte (Spots) sind im definierten Abstand (Pitch) von einander angeordnet. Die Sonden innerhalb der Spots a bzw. b befinden sich im Abstand von d_a bzw. d_b . Die entsprechenden Oberflächenkonzentrationen der Sonden, Γ_a bzw. Γ_b , verhalten sich reziprok zu den Sondenabständen.

scher Punkt der DNA-Sensoren. Unterschiedliche Techniken zur kovalenten und nichtkovalenten Anbindung sind bekannt. Oligonucleotide werden häufig kovalent oder über Thiol-Metall-Wechselwirkung (Chemisorption) an die Sensoroberfläche gebunden. Dafür ist entscheidend, dass eine geeignete Sondendicke und gute Zugänglichkeit für die Hybridisierung gegeben sind. Außerdem muss die unspezifische Adsorption nichtkomplementärer DNA unterdrückt werden. Die Detektion der Hybridisierung kann mit unterschiedlichen physikalischen Messmethoden analysiert werden. Darunter sind optische, elektrochemische und gravimetrische Methoden. Zu diesen Themen bieten SEASSOLAS *et al.* in ihrem Übersichtsartikel eine Zusammenfassung über die Entwicklung der DNA-Biosensoren und Mikroarrays bis zum Jahr 2007 [4].

Aufgrund ihrer Eignung zur parallelen Bearbeitung vieler sequenzbezogener Fragestellungen werden DNA-Chips zur Genotypisierung [5] und zur Untersuchung der Genexpression [6] eingesetzt. Entsprechende Mikroarrays können mehrere hunderttausend Sondenorte enthalten. Das ist mittels Photolithographie möglich. Dabei werden die Sonden auf dem Chip *in situ* synthetisiert [7].

DNA-Mikroarrays können auch für andere Anwendungen genutzt werden. Eine schnelle Detektion bestimmter Mikroorganismen, Viren und genetischer Mutationen kann auf speziell entworfenen Sonden-Arrays vorgenommen werden. Dafür ist die Auswahl der bekannten und spezifischen Sequenzen entscheidend. Synthetische Oligonucleotide mit den geeigneten Sequenzen können dann immobilisiert werden. Von der Hybridisierung der Ziel-DNA oder -RNA kann beispielsweise auf Mikroorganismen, Viren oder genetische bzw. mutationsbedingte Erkrankungen

geschlossen werden.

Die Hybridisierungen auf Mikroarrays werden zumeist durch die Messung der Fluoreszenz detektiert. Damit sind Kosten für die Fluorophore und deren kovalente Anbindung an die DNA verbunden. Jedoch beeinflussen diese Modifikationen der DNA die Hybridisierung, wobei die Stabilität der sich bildenden DNA-Doppelstränge erhöht werden kann [8]. Trotz hoher Spot-Dichten und der hohen Sensitivität der Fluoreszenzdetektion, sind meist nur Signale am Ende einer Hybridisierung zugänglich und nicht ihre Kinetik. Die Methode der Oberflächenplasmonenresonanz (SPR⁽³⁾) bietet eine markierungsfreie Alternative zur Fluoreszenz [9]. Darauf basierend werden Biosensoren zur Detektion der Nucleinsäuren entwickelt, wodurch bakterielle Pathogene in Lebensmitteln nachgewiesen werden können [10].

1.2 Forschungsbedarf an SPR-Sensoren

In Abbildung 1.2 ist die Entwicklung der Anzahl an wissenschaftlichen Publikationen der Jahre 1990 bis 2012 zum Thema SPR dargestellt. Im Jahr 2012 wurden etwa 3500 Arbeiten publiziert, die sich direkt oder indirekt mit der SPR beschäftigen. Mit bisher mehr als 29000 Veröffentlichungen⁽⁹⁾ zeigt sich ein zunehmendes Interesse an dieser physikalischen Messmethode. Aus Abbildung 1.3 wird ersichtlich, dass nur in etwa 11 % (3152 Treffer) dieser Literaturstellen Nucleinsäuren⁽¹⁰⁾ erwähnt werden. Es besteht ein steigender Bedarf an markierungsfreien Detektionsmöglichkeiten und demnach auch an SPR-Sensoren für die biochemische Forschung, aber auch auf den Gebieten der Biophysik und der Nanotechnologie (Abbildung 1.4).

1.3 SPR-basierte Mikroarrays

Die SPR ist eine hoch sensitive Methode für die markierungsfreie Detektion biomolekularer Wechselwirkungen [11]. Sie ist ein optisches Phänomen, das an Metallen auftritt, wenn Licht einer gegebenen Wellenlänge auf die Metalloberfläche im bestimmten Winkel trifft. In der vorliegenden Arbeit ist es eine 50 nm dicke Goldschicht auf einem TOPAS[®]-Chip mit integrierter Optik. Die Intensität des reflektierten Lichts zeigt ein Minimum beim Winkel der Plasmonenresonanz. Dieser Winkel hängt vom Brechungsindex des Mediums innerhalb einer etwa 200 nm

⁽⁹⁾ Einträge in Web of Science[®], <http://www.isiknowledge.com>, 29060 Treffer, 18. März 2013

⁽¹⁰⁾ DNA, RNA, Oligo- und Polynucleotide

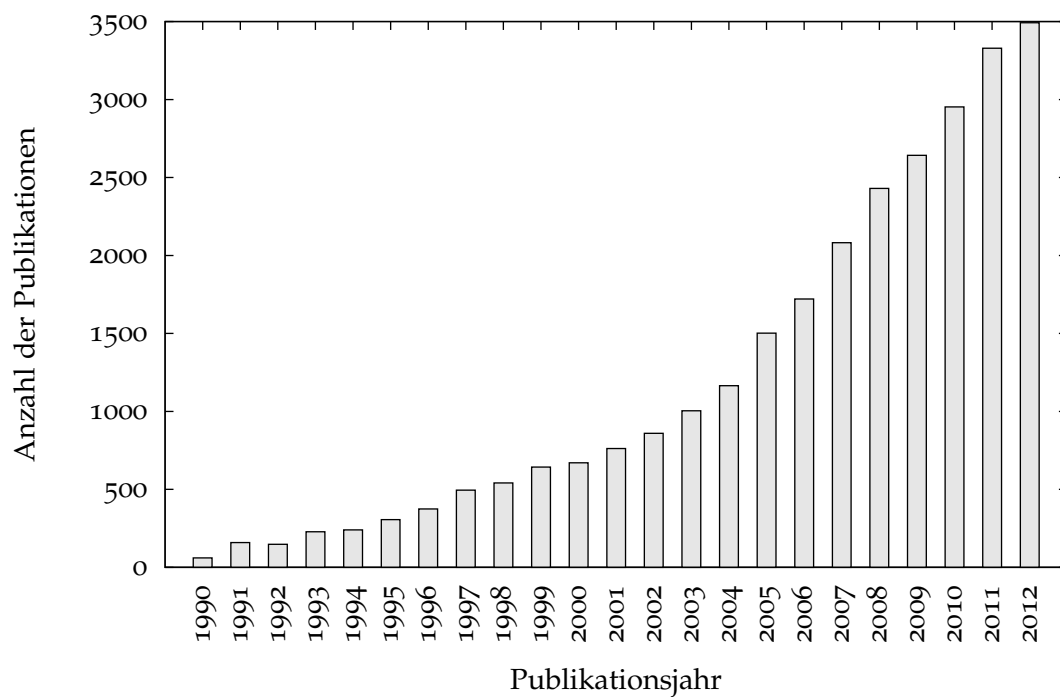


Abbildung 1.2: Anzahl der Publikationen zum Thema **SPR** in den Jahren 1990 bis 2012, mit dem Stand vom 18. März 2013 in der Datenbank Web of Science[®]. Suchoptionen: Topic=(“surface plasmon*“). Insgesamt 29060 Treffer.

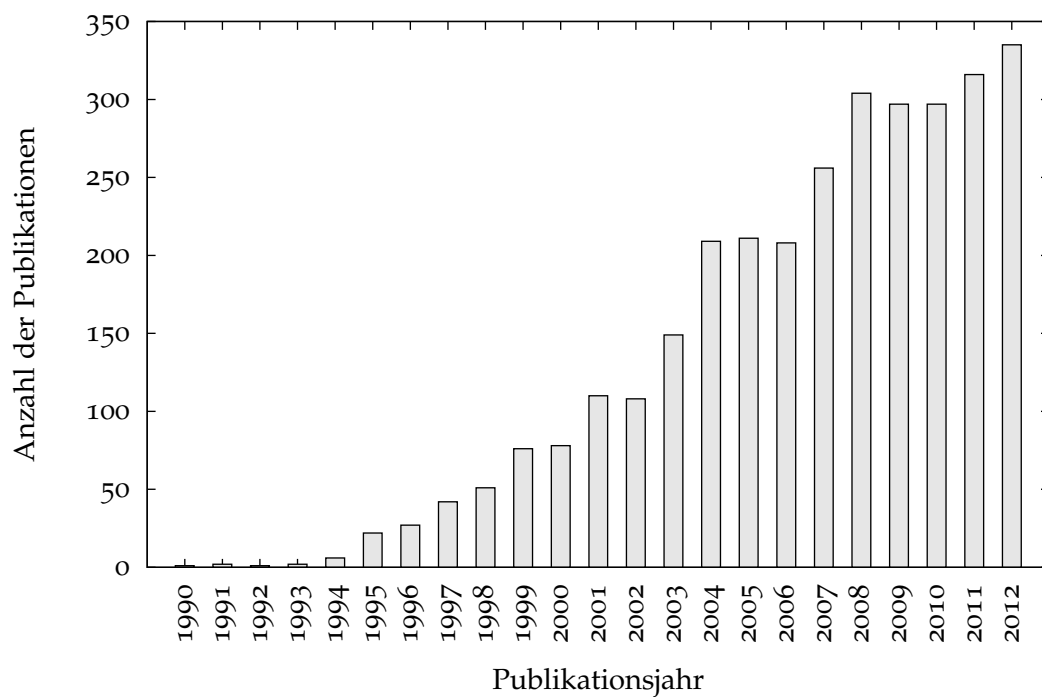


Abbildung 1.3: Anzahl der Publikationen zum Thema **SPR und Nucleinsäuren** in den Jahren 1990 bis 2012, mit dem Stand vom 18. März 2013 in der Datenbank Web of Science®. Suchoptionen: Topic=((DNA OR RNA OR *poly*nucleotid* OR *oligo*nucleotid* OR "*nucleic* acid*" OR *aptamer*) AND "surface plasmon*"). Insgesamt 3152 Treffer.

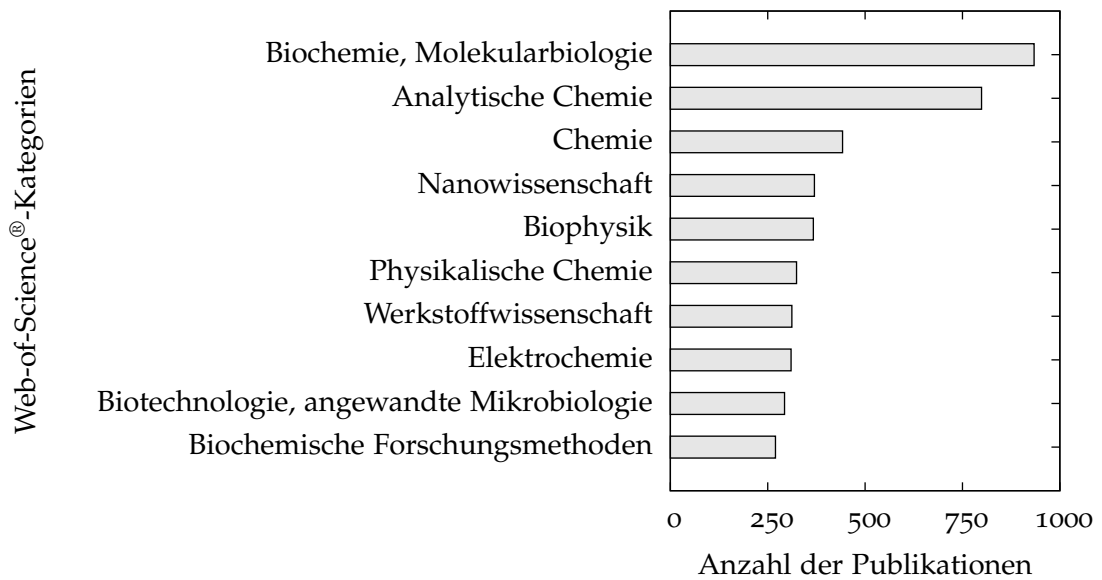


Abbildung 1.4: Anzahl der Publikationen zum Thema **SPR und Nucleinsäuren**, geordnet nach Web-of-Science®-Kategorien. Einträge vom 18. März 2013, Suchoptionen wie in Abbildung 1.3.

dicken Grenzschicht am Metall ab. Eine Änderung des Brechungsindex hat eine Verschiebung des SPR-Minimums zur Folge. Daher können nicht nur Adsorptionen und die Bindung der Moleküle die SPR-Messung beeinflussen, sondern auch Schwankungen der Temperatur und der Zusammensetzung im angrenzenden Medium der Sensoroberfläche. In der vorliegenden Arbeit wird ein SPR-Spektrometer als quantitativer Adsorptionssensor verwendet. Andere chipbasierte Systeme, die das sogenannte SPR-Imaging (SPRi) nutzen, sind in ihrem Einsatz für die Quantifizierung eingeschränkt. Der Grund dafür ist die Nichtlinearität des SPR-Signals, was dadurch zustande kommt, dass bei einem festen Winkel die Intensität des reflektierten Lichts gemessen wird [12]. Ein linearer Zusammenhang zwischen Intensität und der Adsorption gilt näherungsweise nur in einem eingeschränkten Winkelbereich um einen Wendepunkt im SPR-Spektrum. Für die Messungen in der vorliegenden Arbeit wurde jedoch das winkelabhängige SPR-Spektrum ausgewertet und die Verschiebung des SPR-Minimums aufgezeichnet, um eine bessere Quantifizierung zu ermöglichen.

Es gibt Untersuchungen über DNA-Arrays mittels SPRi, bei denen die Immobilisierung der Sonden in mikrofluidischen Kanälen durchgeführt wird [13]. Diese Methode sehr aufwändig, wenn eine hohe Anzahl an Sondenorten pro Chip gefordert sind. In der vorliegenden Arbeit wird daher ein Mikropipettiersystem verwendet, welches die Sondenlösungen tropfenweise abgibt und die Sensoroberfläche nicht berührt. DNA-Mikroarrays auf Gold sind noch wenig untersucht. In der Literatur existiert bisher ein Bericht zu einer Methode, bei der Stahlnadeln zum Aufbau der DNA-Arrays verwendet werden, wobei thiolmodifizierte Sonden-DNA durch ein Kontaktverfahren direkt auf Gold für SPRi-Untersuchungen aufgebracht wird [14].

Das SPR-Spektrometer, welches in der vorliegenden Dissertation verwendet wird, erlaubt eine Referenzierung der Signale auf ein und demselben Chip. Dadurch können spezifische Bindungsereignisse von der unspezifischen Adsorption sowie von Schwankungen der Temperatur und der Lösungszusammensetzung unterschieden werden. Die dazugehörigen SPR-Chips werden in Kombination mit einer Mikrofluidik eingesetzt [15]. Die Mikrofluidik trägt wesentlich zur schnellen Detektion der DNA-Hybridisierungen bei und benötigt nur kleine Mengen der Ziel-DNA. Es wird gezeigt, dass solche Nachweise innerhalb weniger Minuten, in einem Volumen kleiner als 100 μl , erfolgen können.

1.4 TAG/Anti-TAG-System

In der vorliegenden Arbeit soll die Plattformtechnologie zur Detektion zuvor spezifisch vervielfältigter DNA eingesetzt werden [16]. Diese Vervielfältigung erfolgt durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR⁽²⁾). Die PCR ist eine sehr gut beschriebene und etablierte Methode der Molekularbiologie [17, 18]. Deshalb soll hier nicht näher auf ihre Mechanismen eingegangen werden.

In der einfachen PCR entsteht doppelsträngige DNA. Um deren Hybridisierung mit den Sonden zu ermöglichen, müssen einzelsträngige DNA-Abschnitte der PCR-Produkte geschaffen werden. Dazu existieren unterschiedliche Techniken. Eine Möglichkeit besteht darin, die wässrige Lösung der Nucleinsäuren bis zu 100 °C zu erhitzen und anschließend rasch auf Eis abzukühlen [19]. Dadurch trennen sich die Nucleinsäurestränge bei hohen Temperaturen und können bei schneller Temperatursenkung nicht wieder fehlerfrei stabile Basenpaarungen eingehen. Teile der Nucleinsäuren bleiben einzelsträngig und können auf DNA-Chips mit den Sonden hybridisieren. Andere Techniken nutzen eine Biotin-Streptavidin-Reinigung, um den einen Strang an einem magnetischen Partikel zu immobilisieren und den anderen Strang durch denaturierende Zusätze abzutrennen [20]. Außerdem werden Methoden beschrieben, bei denen eine sogenannte asymmetrische PCR durchgeführt wird. Dabei können bereits während der PCR einzelsträngige DNA-Stränge synthetisiert werden [21].

In der vorliegenden Arbeit werden die PCR-Produkte den Sonden auf dem Mikroarray durch ein TAG/Anti-TAG-System zugeordnet. In der PCR werden Primer⁽⁴⁾ verwendet, deren Sequenzen komplementär zu den spezifisch nachzuweisenden Eigenschaften im genetischen Material sind. Eine Primer-Sequenz ist an eine einzigartige TAG-Sequenz gebunden. Der Primer und sein TAG sind über einen Hexaethylenglycolblock verknüpft. Unterschiedliche Sequenzen des zweiten Primers führen in der PCR zu Produkte verschiedener Längen. Diese PCR-Produkte besitzen einen einzelsträngigen Überhang mit der TAG-Sequenz, welche komplementär zur Anti-TAG-Sequenz einer immobilisierten Sonde des DNA-Mikroarrays auf dem SPR-Chip ist (Abbildung 1.5). Die Detektion der Hybridisierung zwischen einem TAG und seinem Anti-TAG ist von der spezifischen Hybridisierung der Primer mit dem genetischen Material in der PCR entkoppelt. Wenn ein PCR-Produkt gebildet wird, kann der entsprechende TAG nachgewiesen werden. Dabei sind die TAG- und Anti-TAG-Sequenzen prinzipiell frei wählbar. Es dürfen jedoch keine

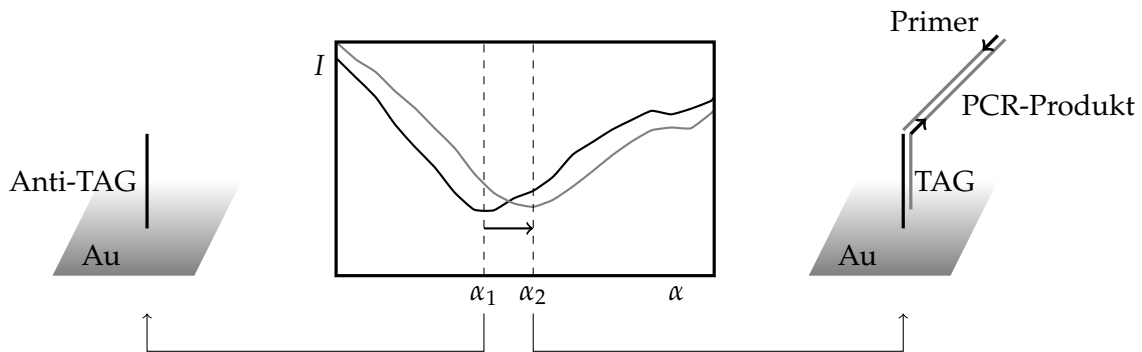


Abbildung 1.5: Prinzip der Detektion der PCR-Produkte mittels SPR bei der Hybridisierung mit immobilisierten DNA-Sonden. Das TAG/Anti-TAG-Sequenzen dienen als molekulare Adressierung zwischen den PCR-Produkten und den Sonden. Das PCR-Produkt resultiert aus einer PCR mit zwei Primern, von denen einer die TAG-Sequenz trägt. Die TAG-Sequenz ist komplementär zur Anti-TAG-Sequenz der Sonde. Bei der Hybridisierung der PCR-Produkte findet eine Verschiebung des Minimums im Winkelspektrum der vom Gold reflektierten Intensität, $I(\alpha)$, statt.

störenden Wechselwirkungen der TAG-Sequenzen mit dem genetischen Material in der PCR auftreten. Weitere Sequenzeigenschaften für eine optimale Detektion werden in Kapitel 3.7 beschrieben. Ein möglicher Algorithmus und die Entwicklung einer Software zur Generierung theoretisch optimierter Sequenzen werden in Teil II vorgestellt.

Das SPR-Spektrometer erlaubt die simultane Detektion der Hybridisierung auf allen Spots. Daher können unterschiedliche PCR-Produkte mit einzigartigen TAG-Sequenzen in ein und derselben Lösung innerhalb weniger Minuten identifiziert werden. Durch die Verwendung mehrerer Primer-Paare ist eine Multiplex-PCR denkbar, bei der unterschiedliche PCR-Produkte ähnlicher Länge nachgewiesen werden können. Dies ist möglich, weil im Gegensatz zu üblichen Elektrophorese-Methoden nicht nach Größe getrennt wird, sondern eine Adressierung der PCR-Produkte auf dem Mikroarray durch das TAG/Anti-TAG-System erfolgt.

Die Länge der PCR-Produkte ist oft sehr variabel, daher ist es wichtig eine für die PCR geeignete Länge zu finden, welche in guter Ausbeute synthetisiert werden kann und eine hohe Sensitivität gewährleistet. Daher werden PCR-Produkte der Länge von 60, 100 oder 300 Basenpaaren (bp) getestet. Weiterhin sind die SPR-Signale und die Hybridisierungskinetik von der PCR-Produktkonzentration abhängig. Es werden Hybridisierungen auf DNA-Mikroarrays untersucht, die bis zu 180 Sondenorte verschiedener Anti-TAG-Sequenzen enthalten. Außerdem kann der Ein-

fluss möglicher Haarnadelstrukturen der Sonden auf die Hybridisierungseffizienz parallel im Vergleich zu anderen Sonden untersucht werden. Haarnadelstrukturen beeinflussen die Hybridisierungskinetik und die Signalhöhe. Eine Anti-TAG-Sequenz wird daher so gewählt, dass eine 8 Nucleotide lange Schleifen- und eine 5 Nucleotide lange Armsequenz möglich sind. Die zwei Armsequenzen sind komplementär zu einander und bilden eine 5 bp lange Stammsequenz. Die entsprechende DNA-Sonde ist somit in der Lage, eine Haarnadelstruktur auszubilden. Eine andere Sonde ohne Haarnadelstrukturen wird vergleichend zur Untersuchung der Hybridisierungseigenschaften immobilisiert. Haarnadelstrukturen senken deutlich die SPR-Signale und die Bindungsrate während der Hybridisierung.

Die Sondendichte ist entscheidend für die Sensitivität der DNA-Biosensoren. Eine sehr stabile Oberflächenchemie auf Gold beruht auf der Schwefel-Gold-Wechselwirkung. Daher sollen thiolmodifizierte DNA-Sonden und solche mit Phosphorothioatgruppen direkt auf Gold oder über eine reaktive Beschichtung des Substrats immobilisiert werden. Außerdem ist die unspezifische Adsorption auf der Sensoroberfläche zu verhindern.

In der vorliegenden Arbeit wird eine Methode zur Immobilisierung der Sonden-DNA entwickelt, mit der eine hohe Anzahl der Sondenorte pro Chip erreichbar ist. Hierfür wird ein Mikropipettiersystem eingesetzt. Dabei spielt die Morphologie der Flüssigkeitstropfen im Pico- und Nanoliterbereich eine grundlegende Rolle. Es soll eine Möglichkeit gefunden werden, die es gestattet streifenförmige, hydrophile Oberflächenbereiche, durch das Absetzen von 50- μ l-Tropfen homogen zu beschichten.

1.5 Oberflächenplasmonenresonanz

Die erste Beobachtung der Oberflächenplasmonen wurde 1902 von WOOD aufgezeichnet [22]. Er stellte Anomalien im Spektrum des Lichts fest, welches an einem metallischen Gitter gebeugt wurde. FANO gelang 1941 der Nachweis, dass diese Anomalien mit der Anregung der elektromagnetischen Oberflächenwellen des Metallgitters zusammenhängen [23]. Die Anregung der Oberflächenplasmonen führt zu einem Abfall der Reflektivität bei der abgeschwächten Totalreflexion (ATR⁽¹¹⁾). Diesen Zusammenhang beschrieb OTTO 1968 in Silberschichten [24]. KRETSCHMANN und RAETHER nutzten eine andere Anordnung zur Anregung der Oberflächenplas-

⁽¹¹⁾ engl. *attenuated total reflection*

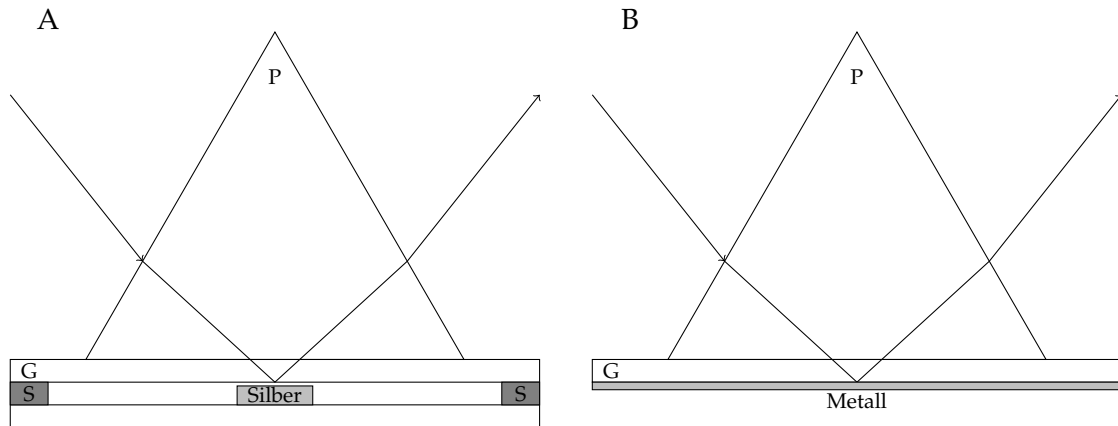


Abbildung 1.6: SPR-Anordnungen nach OTTO (A) sowie nach KRETSCHMANN und RAETHER (B). Ein optisches Prisma (P) wird auf eine Glasplatte (G) mit geeignetem Brechungsindex aufgesetzt. Nach OTTO (A) ist die Ag-Schicht durch Abstandshalter (S) von der Glasplatte getrennt.

monen durch die ATR [25, 26]. In Abbildung 1.6 sind die SPR-Anordnungen nach OTTO sowie KRETSCHMANN und RAETHER dargestellt. Die komplexen Permittivität des Dielektrikums, ϵ_d , und des Metalls, ϵ_m , können durch folgende Beziehung ausgedrückt werden:

$$\epsilon_j = \epsilon'_j + i\epsilon''_j. \quad (1.1)$$

Der Index j ist entweder d für das Dielektrikum oder m für das Metall. Damit sind ϵ'_j und ϵ''_j die Real- bzw. Imaginärteile der ϵ_j . Die imaginäre Einheit ist $i = \sqrt{-1}$. Die Analyse der Maxwell-Gleichungen mit den geeigneten Randbedingungen zeigt, dass nur eine Mode erlaubt wird. Diese transversale magnetische Mode (TM) entspricht dem Oberflächenplasmon. Der dazugehörige Intensitätsvektor des magnetischen Felds liegt in der Ebene der Metall-Dielektrikum-Grenzfläche und ist senkrecht zur Ausbreitungsrichtung. Im kartesischen Koordinatensystem kann der Vektor der magnetischen Intensität, \vec{H} , mit

$$\vec{H}_j = \begin{pmatrix} 0 \\ H_y \\ 0 \end{pmatrix}_j = \begin{pmatrix} 0 \\ 1 \\ 0 \end{pmatrix} A e^{-\sqrt{\beta^2 - (\frac{\omega}{c})^2 \epsilon_j} z + i(\beta x - \omega t)} \quad (1.2)$$

ausgedrückt werden. Hier steht ω für die Kreisfrequenz des Lichts, t für die Zeit und β für die Propagationskonstante. Das Metall liegt in der x - y -Ebene und die Ausbreitungsrichtung der Oberflächenplasmonen erfolgt entlang der x -Achse. Der

Index j ist entweder d für das Dielektrikum oder m für das Metall.

Die Propagationskonstante der Oberflächenplasmonen an der Grenzfläche zwischen dem Metall und dem Dielektrikum kann beschrieben werden durch:

$$\beta_{SP} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_d \epsilon_m}{\epsilon_d + \epsilon_m}} = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\frac{\epsilon_d \epsilon_m}{\epsilon_d + \epsilon_m}}. \quad (1.3)$$

In diesen Gleichungen ist c die Geschwindigkeit des Lichts im Vakuum und λ seine Wellenlänge. Wenn keine Verluste auftreten ($\epsilon_m'' = \epsilon_d'' = 0$) stellt Gleichung (1.3) nur dann eine geführte Mode dar, wenn für die Permittivitäten $\epsilon_m' < -\epsilon_d'$ gilt. Weil die Permittivitäten dielektrischer Stoffe meist positiv sind, muss der Realteil der Permittivität des Metalls negativ sein. Dies wird zum Beispiel von Gold, Silber und Aluminium im sichtbaren und infraroten Bereich erfüllt.

Eine Lichtwelle kann an ein Oberflächenplasmon an der Grenzfläche zwischen dem Metall und dem Dielektrikum koppeln, wenn die zu ihr parallelen Komponenten des Wellenvektors des Lichts zur Propagationskonstante des Oberflächenplasmons passen:

$$\frac{2\pi}{\lambda} n_p \sin(\theta) = \text{Re}\{\beta_{SP}\}. \quad (1.4)$$

Der Realteil der Propagationskonstante wird hier mit $\text{Re}\{\beta_{SP}\}$ bezeichnet und der Einfallswinkels mit θ . Die Brechzahl des Prismas sei n_p .

Weil die Propagationskonstante des Oberflächenplasmons an der Metall-Dielektrikum-Grenzfläche größer als die Wellenzahl der Lichtwelle im Dielektrikum ist, können die Oberflächenplasmonen nicht direkt durch Licht angeregt werden, welches auf eine glatte Metalloberfläche fällt. Jedoch kann der Wellenvektor des Lichts durch die ATR oder Beugung vergrößert werden. Dies kann mittels optischer Prismen, Wellenleiter oder Gitter erfolgen. Am häufigsten werden dazu Prismen im KRETSCHMANN-Aufbau verwendet. Dabei fällt das Licht durch ein Prisma einer hohen Brechzahl und wird an einem Metallfilm gegenüber der Grundfläche des Prismas totalreflektiert. Dabei entsteht eine evaneszente Welle, die sich durch einen dünnen Metallfilm fortpflanzt. Die Propagationskonstante kann durch Kontrolle des Einfallswinkels θ angepasst werden, damit Gleichung 1.4 erfüllt wird und die evaneszente Welle an das Oberflächenplasmon koppelt.

Ein modifizierter KRETSCHMANN-Aufbau wird auch in der vorliegenden Arbeit verwendet. Als Lichtquelle dient eine LED, die Licht mit einer Wellenlänge von etwa 810 nm bei einer spektralen Halbwertsbreite von 30 nm liefert. Dieses Licht wird zunächst kollimiert und polarisiert. Dann wird es durch eine zylindrische

Linse auf die Goldoberfläche geworfen und dort reflektiert. Eine zylindrische, optische Detektionseinheit projiziert das eindimensionale Array auf die Spalten eines CCD-Chips einer Kamera. Die Winkelauflösung entlang der Reihen des CCD-Chips wird durch eine andere integrierte, zylindrische Linse im SPR-Chip erhalten. Die Brennweite dieser Linse entspricht dem Abstand zwischen der Goldoberfläche und dem CCD-Chip. Das reflektierte Licht wird somit winkelabhängig auf entsprechende Pixel einer CCD-Chip-Reihe geworfen (Abbildung 1.7) [27]. Bei einem bestimmten Winkel tritt die Plasmonenresonanz auf und das Winkelspektrum des reflektierten Lichts weist ein Minimum auf, welches den Pixeln auf dem CCD-Chip zugeordnet werden kann. Ein mathematischer Algorithmus der Gerätesoftware bestimmt die entsprechenden Pixel und das SPR-Signal kann als Verschiebung des Minimums in Pixel angegeben werden.

1.6 Funktionalisierung auf Goldsubstraten

1.6.1 Thiole auf Goldoberflächen

Seit der Entdeckung in den 1980er-Jahren, dass organische Disulfide und Alkanthiole auf Gold selbstorganisierende Monoschichten ($\text{SAM}^{(12)}$) bilden können [28–30], wurden zahlreiche Untersuchungen der Eigenschaften und Mechanismen der SAM-Strukturbildung aus Organoschwefelverbindungen auf Gold, aber auch anderen Substraten durchgeführt und in Übersichtsartikeln beschrieben [31–34]. Außer Gold können auch Metalle wie Silber, Kupfer [35, 36], Palladium, Platin [37, 38] oder Nickel [39] für den SAM-Aufbau verwendet werden. Auch auf Halbleitern wie Galliumarsenid [40, 41] und Indiumphosphid [42, 43] ist die Beschichtung mit Thiolen möglich.

Alkanthiole adsorbieren als SAM sowohl durch Physisorption aufgrund von van-der-Waals-Wechselwirkungen als auch durch Chemisorption beruhend auf der Schwefel-Gold-Bindung. Nuzzo *et al.* berichteten über eine Adsorptionsenergie von 117 kJ/mol (28 kcal/mol) des Dimethyldisulfids auf Gold [29]. Auf der Grundlage der Bindungsenergien zu S–H, H₂ und S–Au (87, 104 bzw. 40 kcal/mol) [44, 45], ergibt sich mit -5 kcal/mol eine exotherme Adsorption der Alkanthiole auf Gold.

⁽¹²⁾ engl. *self-assembled monolayer*

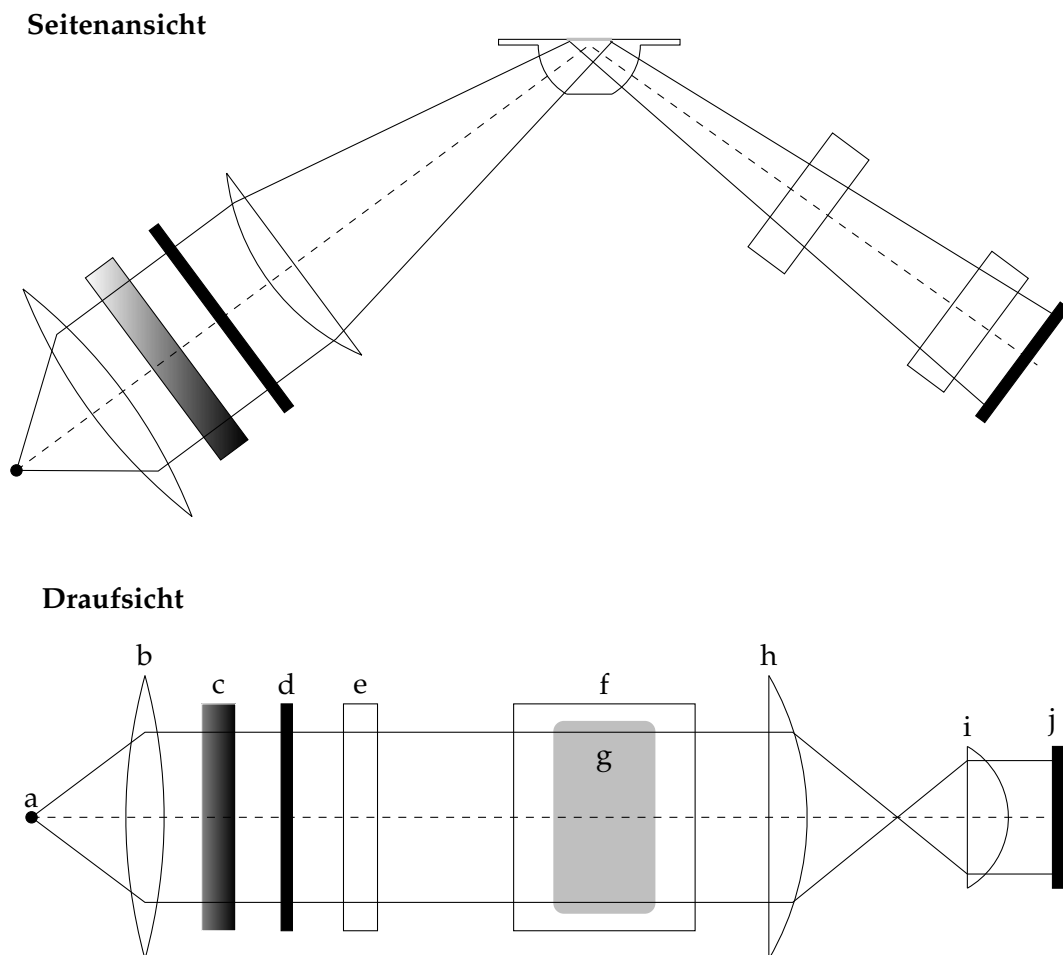
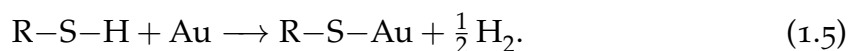


Abbildung 1.7: Aufbau des in der vorliegenden Arbeit verwendeten SPR-Sensors. Prinzip mit einer LED. Seitenansicht und Draufsicht angepasst nach HOFFMANN und DANZ [27]. In der Draufsicht sind die Lichteinfall- und Lichtausfallseite in coaxialer Ausrichtung hochgeschwenkt. a - LED; b - Kollimatorlinse; c - Wellenlängenfilter; d - Polarisationsfilter; e, h, i - Zylinderlinsen; f - SPR-Chip; g - Goldfilm; j - CCD-Chip.

Diese Energie bezieht sich auf die folgende Reaktionsgleichung:



In dieser Gleichung steht R für den Kohlenwasserstoff-Rest eines Thiols. SCHLENOFF berechnete einen Wert von $-5,5 \text{ kcal/mol}$ mit Hilfe elektrochemischer Daten [46]. LAVRICH et al. untersuchten die Adsorption der Alkanthiole und Alkylsulfide mittels thermischer Desorptionsspektroskopie [47]. Sie fanden eine Enthalpie der Chemisorption von 126 kJ/mol (30 kcal/mol) unabhängig von der Kettenlänge der Alkanthiole. Zusätzlich wurde die Enthalpie der Physisorption zu $6,1 \text{ kJ/mol}$ ($1,46 \text{ kcal/mol}$) pro Methylengruppe einer Alkanthiolkette bestimmt. Dies gilt unter der Annahme, dass die Moleküle parallel zur Metalloberfläche liegen, denn die Desorptionsenergien steigen linear mit der Anzahl der Methylengruppen (CH_2 -Gruppen) pro Molekül sowohl bei Alkanthiolen als auch bei Alkanen. Durch den Vergleich der Adsorptionsdaten für Alkanthiole und Alkane auf der Goldoberfläche $\text{Au}(111)$ konnten LAVRICH et al. für die SH-Gruppe einen Beitrag von $33,5 \text{ kJ/mol}$ bzw. $24,1 \text{ kJ/mol}$ allein für den Schwefel dieser Gruppe bestimmen. Damit konnte für die Physisorption der Alkanthiole die folgende Gleichung aufgestellt werden:

$$\Delta H_{\text{Au}}^{\text{desorp}} = 6,1 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} N_{\text{CH}_2} + 43,5 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}. \quad (1.6)$$

Dabei ist N_{CH_2} die Anzahl der Methylengruppen pro Molekül. Gleichung (1.6) erlaubt eine gute Vorhersage der Desorptionsenergie aus dem Zustand der Physisorption ($\Delta H_{\text{Au}}^{\text{desorp}}$) der Alkanthiole auf Gold mit einem Fehler, der kleiner als 10 % im Vergleich zu experimentellen Daten ist. Man erkennt auch, dass bei langkettigen Thiolen ab $N_{\text{CH}_2} = 14$ die Desorptionsenthalpie (129 kJ/mol) größer als die Enthalpie der Chemisorption (126 kJ/mol) wird. Dies bedeutet, dass beispielsweise Hexadecanthiol ($N_{\text{CH}_2} = 16$) an der Goldoberfläche bei Temperaturen adsorbiert vorliegen kann, bei denen die S–Au-Bindung bereits gespalten ist und kürzerkettige Thiole desorbieren.

SAM aus Thiolen können aus der Gasphase und aus Lösungen mit verschiedenen Lösungsmitteln abgeschieden werden. Es sind Konzentrationen von etwa $10 \mu\text{M}$ bis 10 mM der Thiole, Dithiole und Dialkyldisulfide üblich. Die Adsorptionszeiten variieren zwischen einigen Stunden bis zu 24 h und hängen von den verwendeten Molekülen bzw. ihrer Kettenlänge und ihren Endgruppen ab.

Der Prozess der Ausbildung dieser SAM beginnt mit der Physisorption der Thiole

auf Gold. Anschließend kommt es zur Chemisorption der Schwefelgruppe, was einige Minuten beansprucht [48]. Dabei wird das Wasserstoffatom abgespalten. Die am häufigsten akzeptierte Hypothese ist, dass sich anschließend molekularer Wasserstoff, H_2 , bildet. Eine Ausnahme ist Methanthiol, welches bei Temperaturen unter 220 K auf Au(111) ohne Spaltung der S–H-Bindung adsorbiert [49]. Jedoch kann an den Defektstellen der Goldoberfläche eine Chemisorption beobachtet werden. An diesen Stellen wird die Desorption erst ab einer Temperatur von 300 K beobachtet und die Desorption geringer Mengen des Dimethyldisulfids findet bei 410 K statt. Was darauf hindeutet, dass sich die S–H-Bindung an den Defektstellen spaltet und die Dimerisierung zu Dimethyldisulfid an der Goldoberfläche ermöglicht wird.

An solchen Defektstellen beginnt die Physisorption der Thiole parallel zur Oberfläche. Wenn die Oberfläche auf diese Weise belegt ist, ordnen sich die Moleküle in einer aufrechten Position auf der Oberfläche an. Die Schwefelgruppe bindet an das Gold und die Kohlenwasserstoffketten zeigen von der Oberfläche weg und lagern sich zusammen, um eine SAM zu bilden bis die Oberfläche gesättigt ist.

Für die Struktur der SAM auf wohl definierten Goldoberflächen können unter anderem auch Neigungswinkel der Kohlenwasserstoffketten gegenüber der Oberfläche festgestellt werden. Diese Winkel werden durch Kettenlänge und unterschiedliche Endgruppen (z.B. $-CH_3$, $-OH$, $-COOH$) beeinflusst [32].

Eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der SAM spielen demnach nicht nur die starke Bindung zwischen dem Substrat und der Schwefelgruppe, sondern auch die van-der-Waals-Kräfte der Kohlenwasserstoffkette, die Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken der Endgruppen. Diese Endgruppen haben den entscheidenden Einfluss auf die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Oberfläche. Es können unterschiedliche funktionelle Gruppen zur kovalenten Anbindung weiterer Moleküle eingeführt werden. Durch die richtige Wahl der Endgruppen können außerdem hydrophile und hydrophobe Oberflächen mit bestimmten Benetzungs- und Adsorptionseigenschaften geschaffen werden. Die Adsorption der Alkanthiole mit gleichen Endgruppen auf Kupfer, Silber oder Gold ergeben SAM mit ähnlichen Benetzungseigenschaften, trotz unterschiedlicher Kettenlängen [50].

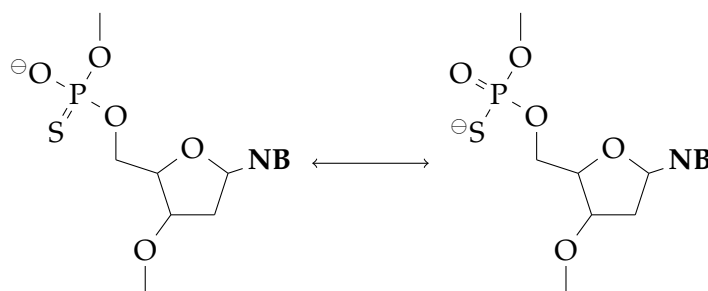


Abbildung 1.8: Mesomere Grenzstrukturen eines Phosphorothioatbausteins der PT-DNA. NB steht für eine Nucleobase.

1.6.2 Immobilisierung der DNA-Sonden

Thiol-DNA-Sonden Für den Aufbau der DNA-Mikroarrays auf Goldoberflächen werden in der vorliegenden Arbeit thiolmodifizierte Oligodesoxyribonucleotide (ODN-SH) verwendet. Diese wechselwirken mit Goldoberflächen nicht nur über die Schwefel-Gold-Bindung, sondern adsorbieren auch über ihre Nucleobasen [51–58]. Um diese Adsorption zu vermeiden, wird die freie Goldoberfläche mit Mercaptoalkoholen behandelt. So bildet sich eine SAM, die zusätzlich die sterische Zugänglichkeit der Ziel-DNA zur Sonden-DNA während der Hybridisierung verbessert [59–64]. Vergleicht man die Immobilisierung thiolmodifizierter DNA-Sonden mit der Immobilisierung nichtmodifizierter ODN in Abhängigkeit von ihrer Länge, so stellt man fest, dass die Thiolgruppe die Adsorption der Sonden stark erhöht. Für kürzere Sonden ist dieser Effekt deutlicher ausgeprägt als für längere DNA-Einzelstränge. Bis zu einer Länge von 24 Basen sinkt die Sondendichte mit steigender Länge nur wenig. Die Sonden können sich dicht auf der Oberfläche in einer SAM packen. Sind die Sonden jedoch länger als 24 Basen, sinkt die Anzahl der Sonden pro Flächeneinheit beträchtlich. Es muss daher eine geringere Ordnung der langen Sonden ausgebildet sein [65].

Phosphorothioat-DNA-Sonden Phosphorothioat-DNA (PT-DNA) besteht aus Nucleinsäurebausteinen, bei denen ein nichtverbrückendes Sauerstoffatom einer Phosphatgruppe durch ein Schwefelatom ersetzt ist [66, 67]. Die Struktur dieser Analoga der Desoxyribonucleotide ist in Abbildung 1.8 gezeigt. Phosphorothioate sind stabiler gegenüber dem enzymatischen Abbau, bilden keine Disulfidbrücken und die Phosphorothioatgruppe kann in beliebiger Position innerhalb des molekularen Rückgrats während der Synthese eingebaut werden. PT-DNA ist kostengüns-

tiger verglichen mit entsprechend thiolmodifizierter DNA.

Es wird die direkte Wechselwirkung thiolmodifizierter DNA und der PT-DNA mit der Goldoberfläche untersucht. Es kann gezeigt werden, dass PT-DNA eine geringere Affinität zur Goldoberfläche hat als thiolmodifizierte DNA. Trotzdem sind DNA-Hybridisierungen mit PT-DNA, welche auf diese Weise immobilisierter ist, nachweisbar, obwohl die Signale deutlich geringer im Vergleich zu Thiol-DNA-Mikroarrays sind. In der Literatur existieren dagegen widersprüchliche Berichte zur unmittelbaren Immobilisierung der PT-DNA auf Goldoberflächen. Folglich wird in der vorliegenden Arbeit ein Beitrag zur Klärung dieser Widersprüche geleistet. Der Einfluss der Sondenstruktur auf die Detektionssignale wird gezeigt. Berichte, in denen Adenin eine stärkere Adsorption auf Gold aufweist als Thymin, stimmen mit den SPR-Messungen zur Hybridisierung überein. So wird in der vorliegenden Dissertation gezeigt, dass Sonden, welche acht aufeinanderfolgende Adeninbasen enthalten, zu höheren SPR-Signalen bei der Hybridisierung führen als Sonden mit acht aufeinanderfolgenden Thyminbasen. Den entscheidenden Einfluss auf die Signale hat jedoch die Größe der Sondenmoleküle. Je größer der rechnerisch geschätzte Gyrationradius ist, desto geringer sind die theoretischen Sondendichten und die gemessenen Signale.

Die Immobilisierung der PT-DNA kann durch eine Beschichtung mit Iodalkylgruppen verbessert werden. Dazu wird eine selbstorganisierende Monoschicht des 11-Mercapto-1-undecanols (MCU) mit 3-(Iodpropyl)trimethoxysilan behandelt. Ein ähnlicher Schichtaufbau ist in der Literatur beschrieben. Dort werden Kupfer und Eisen zunächst mit MCU beschichtet. Anschließend werden Trichlorsilane auf MCU/Kupfer-Schichten [68, 69] oder Ethoxysilane auf MCU/Eisen-Schichten aufgebracht [70]. Die so erhaltenen Metalloberflächen haben eine höhere Beständigkeit gegenüber der Korrosion. Der Schwefel der Thiol- und Phosphorothioatgruppen ist nucleophil und substituiert das Iod der silanisierten Oberfläche. Die dazugehörige Reaktionsgleichung ist in Abbildung 1.10 gezeigt. Die Hybridisierungssignale auf solchen Sensoroberflächen zeigen keine signifikante Abhängigkeit von der Größe der Sondenmoleküle. Dies deutet darauf hin, dass die Ausbildung einer kovalenten Bindung zur Oberfläche eine größere Rolle spielt als die physikalische Adsorption der DNA.

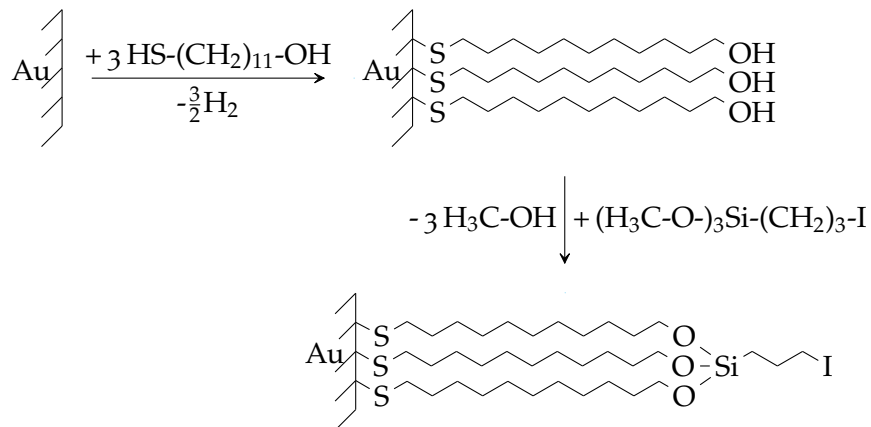


Abbildung 1.9: Reaktionen bei der Beschichtung von Goldsubstraten mit einer MCU-SAM und bei der anschließenden Silanisierung mit 3-(Iodpropyl)trimethoxysilan.

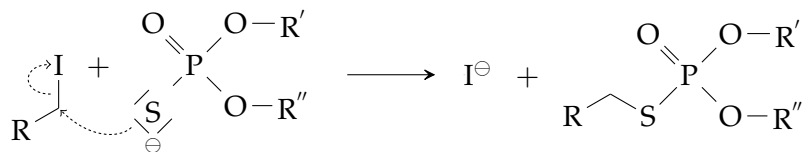


Abbildung 1.10: Nucleophile Substitution am Iodoalkyl-Rest durch eine Phosphorothioatgruppe. R, R' und R'' stehen für organische Molekülreste.

1.7 Röntgenphotoelektronenspektroskopie

Die Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS⁽¹³⁾) ist eine Methode zur Bestimmung der Bindungsenergie, E_B , der Elektronen in der Elektronenhülle der Atome. Dabei werden durch Röntgenstrahlung, also durch ionisierende Photonen, Rumpfelektronen aus dem Material entfernt. Die kinetische Energie, der herausgeschlagenen Elektronen, E_{kin} , wird gemessen. Weil die Energie der verwendeten Photonen, $h\nu$, bekannt ist, kann daraus die zur Ionisierung nötige Energie berechnet werden und man erhält:

$$E_B = h\nu - E_{kin}. \quad (1.7)$$

Hier ist h das plancksche Wirkungsquantum und ν die Frequenz der Strahlung. Die Bindungsenergien der Rumpfelektronen geben Aufschluss über die Art der Atome, ihre chemische Umgebung und über das Mengenverhältnis der Elemente in der untersuchten Schicht. Für die Beschreibung organischer SAM auf Gold sind die Bindungsenergien der Elektronen in Kohlenstoff, Schwefel und Stickstoff von Interesse [59, 71, 72]. Je nach chemischer Umgebung sind es bei Kohlenstoff die $1s$ -Elektronen mit $E_{B,C1s} \approx 285$ eV, bei Stickstoff mit $E_{B,N1s} \approx 400$ eV und bei Schwefel die $2p$ -Elektronen mit $E_{B,S2p} \approx 163$ eV. Die XPS wird in dieser Arbeit verwendet, um die Zusammensetzung der SAM auf zu untersuchen. Dabei wird die Abhängigkeit der DNA-Sondendichte von der Salzkonzentration gezeigt (siehe Kapitel 3.1).

1.8 Mikrokontaktdrucken

Das Mikrokontaktdrucken (μ CP⁽¹⁴⁾) ist eine vielseitig anwendbare Methode zur Oberflächenstrukturierung. [73–76]. Beim μ CP wird ein Stempel bestehend aus einem Elastomer verwendet, welches in der Regel Polydimethylsiloxan (PDMS) ist. Durch das Abgießen auf einem geeigneten Formstück, dem sogenannten Master, können viele Kopien eines Stempels hergestellt werden. Der Stempel ist dann ein negatives Abbild des Masters. Zur Herstellung eines Masters kann die Photolithographie verwendet werden (Kapitel 2.10.1). Der Stempel wird mit einer Lösung der SAM-ausbildenden Substanz beladen. Für die Strukturierung der Goldoberfläche werden Thiole verwendet. Der Stempel wird in der Regel für weniger als eine

⁽¹³⁾ engl. *X-ray photoemission spectroscopy*

⁽¹⁴⁾ engl. *microcontact printing*

Minute in Kontakt mit der Oberfläche gebracht, um die gewünschte Substanz zu übertragen. In weiteren Schritten können weitere Thiole mit unterschiedlichen Benetzungseigenschaften und funktionellen Gruppen eingesetzt werden, um die verbleibenden Bereiche zu beschichten. Andererseits kann die frei gebliebene Goldoberfläche beispielsweise durch chemisches Ätzen entfernt werden. Dabei schützen die zuvor strukturiert übertragenen SAM die Goldoberfläche vor dem Angriff durch das Ätzmittel [73].

1.9 Flüssigkeitsmorphologien auf Oberflächen

Beim Aufbau der Mikroarrays aus kleinen Flüssigkeitstropfen in der Größenordnung von Pikolitern bis zu wenigen Mikrolitern ist eine genaue und sichere Positionierung der Spots von entscheidender Bedeutung. Daher ist nicht nur die Positioniergenauigkeit des Mikropipettiersystems wichtig, sondern auch die Steuerung der Dynamik der Flüssigkeiten auf der Sensoroberfläche. Dies kann durch Additive in den entsprechenden Lösungen erreicht werden, wodurch die Oberflächenspannung und Viskosität der Flüssigkeiten angepasst werden können. Weiterhin können die Benetzungseigenschaften der Sensoroberfläche verändert werden, um die freien Oberflächenenergien zu verändern bzw. die Kontaktdurchmesser der Tropfen zu kontrollieren.

YOUNG beschrieb bereits 1805 den Zustand der Flüssigkeiten auf festen Oberflächen [77]. Dieser Zustand kann mit der Young-Gleichung beschrieben werden:

$$\frac{\gamma_{SG} - \gamma_{SF}}{\gamma_{FG}} = \cos \theta. \quad (1.8)$$

Dabei ist γ_{SG} die Grenzflächenspannung zwischen Substrat und Gasphase, γ_{SF} die zwischen Substrat und Flüssigkeit und γ_{FG} die zwischen Flüssigkeit und Gasphase. Der Kontaktwinkel θ ergibt sich als Konsequenz aus dem Gleichgewichtszustand, bei dem sich alle Kräfte aufheben (Abbildung 1.11).

In einer Arbeit von CHAUDHURY und WHITESIDES ist beschrieben, wie ein Gradient der freien Oberflächenenergie dazu führt, dass ein Wassertropfen (etwa 1 μ l) nach dem Absetzen auf dem 15° zur Horizontalen schräg gestellten Substrat sich entgegen der Schwerkraft zur hydrophilen Seite bewegt. Der Gradient wurde geschaffen, indem eine Lösung des Decyltrichlorsilans ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{SiCl}_3$) in der Nähe der Seite eines Silicium-Substrats abgesetzt wurde. Dadurch fand eine Diffusion des

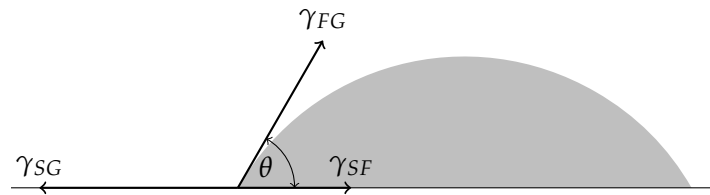


Abbildung 1.11: Kontaktwinkel θ eines Tropfens auf einer Oberfläche.

Silans in der Gasphase statt und die Hydrophobie der Substratoberfläche nahm mit steigendem Abstand zur Silanlösung ab [78]. Die Bewegung der Tropfen findet in Richtung niedrigerer Oberflächenenergien statt. Die treibende Kraft ergibt sich aus unterschiedlichen Grenzflächenspannungen ein und desselben Tropfens auf dem Substrat. Der durch den chemischen Gradienten auf der Oberfläche entstehenden Kraft wirken Reibungskräfte entgegen, die auf der Viskosität der Flüssigkeiten beruhen und die Bewegung der Tropfen beeinflussen [79].

Die Organisation kleiner Tropfen kann sehr gut auf hydrophil bzw. hydrophob strukturierten Substraten durchgeführt werden. Dadurch können Sondenorte auf Mikroarrays durch scharfe Abgrenzungen sicher angeordnet und getrennt werden. Das gezielte Benetzen und Befüllen hydrophiler Bereiche mit wässrigen Lösungen ist dafür entscheidend. KUMAR und WHITESIDES untersuchten die Kondensationsmuster auf Goldoberflächen die durch μ CP strukturiert wurden [75]. Es wurden Streumuster eines Laserlichtstrahls an der Oberfläche gemessen, während Wasser auf der strukturierten Oberfläche kondensierte. Auf solchen Substraten beginnt die Kondensation mit der Abscheidung kleiner, unterschiedlich großer Tropfen auf den hydrophilen Bereichen. Danach bilden sich gleichförmige Tropfen auf allen hydrophilen Oberflächen. Wird eine bestimmte Größe der Tropfen überschritten, kommt es zur Überbrückung zwischen benachbarten Tropfen. Die fortschreitende Kondensation bewirkt die Bedeckung der gesamten Substratoberfläche mit einem Flüssigkeitsfilm. Das Volumen der Tropfen, die aufgenommen werden können, wird durch die Form und Größe der hydrophilen Oberflächenbereiche bestimmt. Die Oberflächenstruktur der Substrate und das Volumen der Flüssigkeiten müssen berücksichtigt werden, wenn die Lage der Flüssigkeiten kontrolliert werden soll. Zusätzlich kann dadurch die Morphologie der Flüssigkeiten beeinflusst werden [80–82]. Entlang streifenförmiger hydrophiler Oberflächenbereiche, die durch hydrophobe Streifen abgegrenzt werden, kommt es zum Zusammenfließen (Koaleszenz) der Tropfen bis die Flüssigkeitsgrenzen entlang der Streifenkanten verlaufen.

Werden die Bereiche weiter mit Flüssigkeit gefüllt kommt es zur Aufwölbung der Flüssigkeit bis zur Überbrückung zwischen zwei hydrophilen Streifenbereichen. Ein Mikropipettiersystem kann verwendet werden, um die beschriebenen Bereiche tropfenweise zu füllen. Dazu werden Flüssigkeitstropfen zunächst separat auf die Oberfläche abgesetzt. Durch weitere Tropfen kann das Flüssigkeitsvolumen auf dem Substrat erhöht werden. Trifft ein Tropfen auf die Grenze zwischen zwei Streifen, bewegt er sich auf den hydrophilen Bereich zu. Liegt der Tropfen jedoch auf mehreren Bereichen nach seinem Auftreffen auf die Oberfläche, kann er in mehrere kleinere Tropfen zerfallen, welche sich auf die hydrophilen Streifen verteilen. Wenn das Volumen des Tropfens groß genug ist bzw. der hydrophobe Streifen schmal ist, kann es zur Überbrückung des hydrophoben Bereichs führen. Solche Tropfendynamik wurde durch CHANG *et al.* rechnerisch simuliert [83]. Die anisotrope Tropfenform auf chemisch strukturierten Oberflächen mit hydrophoben und hydrophilen Mustern konnten ebenfalls rechnerisch simuliert werden [84]. Eine Bewegung der Tropfen kann auch erreicht werden, wenn zwei verschiedene Streifenmuster benachbart angeordnet werden. Es kommt zu einer Verschiebung der Tropfen in Richtung desjenigen Bereiches, bei dem der hydrophile Flächenanteil größer ist [85, 86]. Dieses Phänomen kann dazu genutzt werden, um die Positionierung der Tropfen zu verbessern, indem die Tropfen auf die gewünschten Orte gelenkt werden. Somit werden mögliche Abweichungen des Mikropipettiersystems korrigiert [87].

1.10 DNA-Hybridisierung in freier Lösung

Die Desoxyribonucleinsäure (DNA⁽¹⁾) besteht aus aufeinanderfolgenden Nucleotiden, die über Phosphodiesterbindungen verbunden sind. Ein Nucleotid der DNA besteht aus der Desoxyribose, an welcher eine Nucleobase und ein Phosphat gebunden sind. Dabei bildet sich das Zucker-Phosphat-Rückgrat, in dem die Phosphatgruppe am 5'-Kohlenstoffatom und die Hydroxylgruppe am 3'-Kohlenstoffatom sind. Diese Nucleobasen sind die Purine Adenin (A) und Guanin (G), sowie die Pyrimidine Cytosin (C) und Thymin (T).

WATSON und CRICK klärten 1953 die Struktur der DNA auf [88]. Sie konnten zeigen, dass die DNA in Form einer Doppelhelix zweier antiparalleler Einzelstränge vorliegt. In wässrigen Lösungen ist die Doppelhelix 2 nm breit. Eine Windung ist etwa 3,6 nm lang und beinhaltet durchschnittlich 10,5 Basen. Die Basen sind im Inneren

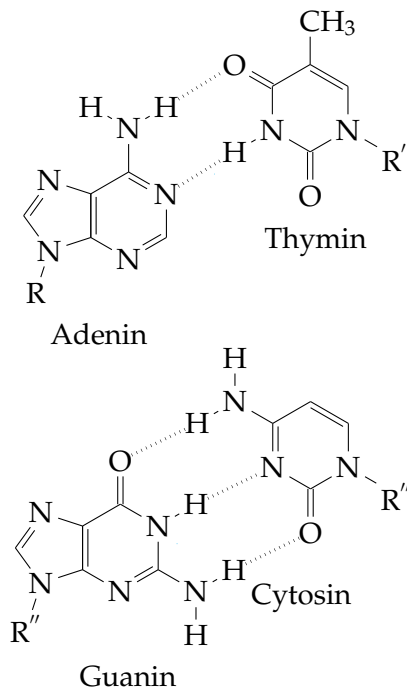


Abbildung 1.12: Wasserstoffbrücken der Paarungen Adenin-Thymin und Guanin-Cytosin. Im DNA-Doppelstrang sind die Nucleobasen an die Kohlenstoffatome in der 1'-Position der 2'-Desoxyribose gebunden (R, R', R'', R''').

der Doppelhelix übereinander gestapelt. Zwischen den benachbarten Strängen bilden sich dabei zwei Wasserstoffbrücken zwischen Adenin und Thymin sowie drei Wasserstoffbrücken zwischen Guanin und Cytosin aus (Abbildung 1.12). Die Gleichgewichtsreaktion in freier Lösung kann beschrieben werden durch:



Dabei ist S_1 die Sonde, Z_1 die Ziel-DNA und D_1 die Doppelhelix nach der Hybridisierung. Die dazugehörige thermodynamische Stabilität der hybridisierten DNA kann mit der molaren freien Enthalpie, ΔG_D° , beschrieben werden:

$$\Delta G_D^\circ = -RT \ln K_D^\circ \quad (1.10)$$

Hier bezeichnet R die Gaskonstante, T die absolute Temperatur und K_D° ist die Gleichgewichtskonstante der Hybridisierung in freier Lösung. Die Stabilität der DNA kann mit ihrem GC-Gehalt in Verbindung gebracht werden. MARMUR und DORY stellen in ihrer Arbeit fest, dass je höher der GC-Gehalt ist, desto größer ist

auch die Stabilität der DNA-Doppelhelix [89]. Zur Quantifizierung dieser Stabilität betrachten die Autoren die Schmelztemperatur der DNA. Als Schmelztemperatur der DNA, T_m , wird die Temperatur bezeichnet, bei der die Hälfte der Nucleobasen ungepaart vorliegen. Bei der Messung der UV-Absorption der DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm in wässriger Lösung entspricht dies der Temperatur bei der halben Änderung der relativen Absorption. Es kann ein näherungsweise linearer Zusammenhang zwischen T_m und dem GC-Gehalt beobachtet werden. Nach MARMUR und DOTY kann T_m bei einer Na^+ -Konzentration von 0,2 M mit folgender Gleichung abgeschätzt werden [90]:

$$T_m = (69,3 + 41x_{GC}) \text{ } ^\circ\text{C}. \quad (1.11)$$

Dabei bezeichnet x_{GC} den gemeinsamen Stoffmengenanteil des Guanins und Cytosins. Gleichung (1.11) ist auf natürlich vorkommende DNA aus Zellen und Viren anwendbar, welche Hunderte bis Millionen Basen lange Doppelstränge enthalten. Bei genauerer Untersuchung werden die Schmelztemperaturen kürzerer Oligonucleotide durch ihre Sequenz bestimmt. Wenn T_m als Funktion der DNA-Konzentration beschrieben wird, können die molaren Enthalpien, Entropien und ΔG_D° ermittelt werden. Die Stabilität der DNA wird nicht nur durch die Wasserstoffbrücken bestimmt, sondern zum großen Teil durch die Wechselwirkungen zwischen den direkt benachbarten Basen. Diese Wechselwirkungen zwischen den aromatischen π -Systemen der Nucleobasen sind hydrophober Natur. Die Beiträge der 10 unterschiedlichen Paare können als thermodynamische Parameter ermittelt werden. Die Berechnung der Größen G_D° bzw. K_D° kann dann nach dem „Modell nächster Nachbarn“ erfolgen [91, 92]:

$$\Delta G_D^\circ = \Delta G_{init} + \Delta G_{sym} + \Delta G_{5'-T} + \sum_{i=1}^{10} n_i \Delta G_i. \quad (1.12)$$

In dieser Gleichung steht n_i für die Anzahl eines bestimmten nächsten Nachbarn in einer Sequenz und ΔG_i ist der entsprechende Beitrag zu ΔG_D° . Die Parameter zur Berechnung des ΔG_D° nach SANTALUCIA *et al.* sind in Tabelle 1.1 dargestellt und sind aus 4 bis 16 bp langen Strängen ermittelt.

Tabelle 1.1: Parameter zur Berechnung der molaren freien Enthalpie der Hybridisierung bei 37 °C und 1 M NaCl, ΔG_i , nach SANTALUCIA *et al.* [92].

Nächste Nachbarn 5'→3'/3'→5'	ΔG_i [$\frac{kcal}{mol}$]
AA/TT	-1,02 ± 0,04
AT/TA	-0,73 ± 0,05
TA/AT	-0,60 ± 0,05
CA/GT	-1,38 ± 0,06
GT/CA	-1,43 ± 0,05
CT/GA	-1,16 ± 0,07
GA/CT	-1,46 ± 0,05
CG/GC	-2,09 ± 0,07
GC/CG	-2,28 ± 0,08
GG/CC	-1,77 ± 0,06
G/C ^a	1,82 ± 0,24
A/T ^b	2,8 ± 1
Symmetrie-Korrektur ^c	0,4
5'-T ^d	0,4

^a ΔG_{init} bei mindestens einem G-C-Paar

^b ΔG_{init} bei ausschließlich A-T-Paaren

^c ΔG_{sym} bei Selbstkomplementarität

^d $\Delta G_{5'-T}$ bei 5'-T- oder 3'-A-Enden

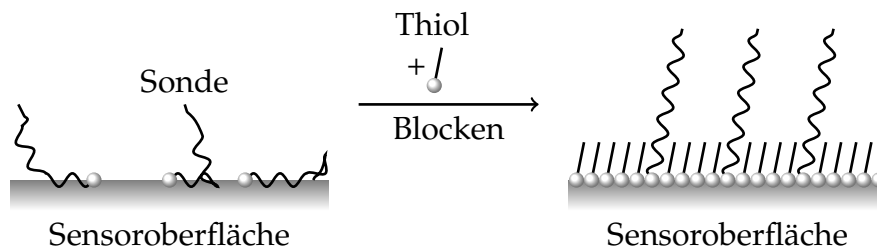


Abbildung 1.13: Das Prinzip des Blockens der freien Goldoberfläche bei der Herstellung eines DNA-Mikroarrays. Nach der Anbindung der Sonden-DNA werden die freien Bindungsstellen auf der Goldoberfläche durch Thiole geblockt und die Sonden werden aufgerichtet.

1.11 DNA-Hybridisierung auf Mikroarrays

Wenn die DNA-Hybridisierung an Oberflächen stattfindet, müssen im Vergleich zur freien Lösung zusätzliche Randbedingungen berücksichtigt werden [93]. Bei Untersuchungen der DNA-Hybridisierung mittels SPR wird ein diffusionslimitiertes Langmuir-Modell verwendet, um die Hybridisierung auf der Oberfläche zu beschreiben [94]. Die Zugänglichkeit der Sonden wird durch das Blocken der Sensoroberfläche mit einem Thiol (Mercaptohexanol) erreicht. Dadurch wurde die unspezifische Adsorption der Ziel-DNA minimiert und die Sonden aufgerichtet (Abbildung 1.13) [59, 60]. PETERSON *et al.* konnten ebenfalls auf einem SPR-Sensor zeigen, dass die Sondendichte ein entscheidender Faktor für die Signalhöhe und die Kinetik der Hybridisierung ist. Gleiche Sondendichten führen zu reproduzierbarer Kinetik und Hybridisierungseffizienz. Die Hybridisierungseffizienz ist das Verhältnis von hybridisierten Sonden zu den insgesamt immobilisierten Sonden. Eine geringe Sondendichte erlaubt eine schnelle Hybridisierung mit einer hohen Hybridisierungseffizienz. Eine sehr hohe Sondendichte bewirkt eine niedrigere Hybridisierungseffizienz [95].

Es gibt verschiedene Ansätze zur Beschreibung der Hybridisierung an Oberflächen. Nach einem Modell von CHAN *et al.* gibt es zwei unterschiedliche Mechanismen für die Hybridisierung zwischen der Ziel-DNA in der Lösung mit den komplementären Sonden auf einer Oberfläche [96]. Die Ziel-DNA kann direkt aus der Lösung hybridisieren oder nach unspezifischer Adsorption und anschließender Diffusion zur Sonde. Demnach kann diese Oberflächendiffusion die Hybridisierung deutlich beschleunigen. Es existiert eine optimale Sondendichte, bei der die Oberflächendiffusion stattfindet. Hohe Hybridisierungsraten können, im Vergleich zur maximal

möglichen Sondendichte, auch mit geringeren Sondendichten erreicht werden. Beim Planen der Experimente auf DNA-Chips ist die Betrachtung des Gleichgewichts, welches die Hybridisierung auf der Sensoroberfläche beschreibt, wichtig:



Dabei steht S_o für die Sonden an der Oberfläche, Z_l für die Ziel-DNA in freier Lösung und D_o für die hybridisierte Duplex-DNA an der Oberfläche. Dabei ist k_a die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation bzw. der Hybridisierung und k_d die der Dissoziation bzw. der Dehybridisierung. Wenn x_{eq} der Anteil der im Gleichgewicht hybridisierten Sonden ist, dann ergibt sich die Gleichgewichtskonzentration der hybridisierten Sonden an der Oberfläche, c_{D_o} , zu

$$c_{D_o} = x_{eq} c_{S_o}^{max} \quad (1.14)$$

und $c_{S_o}^{max}$ symbolisiert die maximale Konzentration freier Sonden an der Oberfläche. Für die verbleibende Konzentration der freien Sonden an der Oberfläche, c_{S_o} , gilt somit:

$$c_{S_o} = c_{S_o}^{max} - c_{D_o}. \quad (1.15)$$

Man kann nun die Gleichgewichtskonstante, K_D , bezogen auf die Reaktionsgleichung (1.13) ausdrücken:

$$c_Z K_D = \frac{c_{D_o}}{c_{S_o}} = \frac{c_{D_o}}{c_{S_o}^{max} - c_{D_o}} = \frac{x_{eq} c_{S_o}^{max}}{c_{S_o}^{max} - x_{eq} c_{S_o}^{max}}, \quad (1.16)$$

wobei c_Z die Konzentration der Ziel-DNA in freier Lösung ist. Dies ist eine Langmuir-Adsorptionsisotherme, die als einfacher Ansatz sehr häufig zur Beschreibung der Hybridisierungen an Oberflächen verwendet wird:

$$c_Z K_D = \frac{x_{eq}}{1 - x_{eq}} = \frac{k_a}{k_d}. \quad (1.17)$$

Es sind Modifikationen dieser Isotherme entwickelt worden, die kompetitive Hybridisierung in freier Lösung und auf der Oberfläche berücksichtigen. Unter anderem werden Interaktionen zwischen den Sonden, aber auch der Einfluss der Sequenzlängen betrachtet [97, 98]. Diese Modifikationen können Korrekturfaktoren beinhalten:

$$c_Z K_D f(x_{eq}) = c_Z K_D^\circ K_D' f(x_{eq}) = \frac{x_{eq}}{1 - x_{eq}}. \quad (1.18)$$

Mit $f(x_{eq})$, welches von der Sondendichte abhängt, können Wechselwirkungen zwischen den Sonden berücksichtigt werden. Eine Näherung für K_D ist K_D° , welche sich aus der Gleichung (1.10) ergibt und die Verhältnisse der Hybridisierung in freier Lösung beschreibt. Im Gegensatz zu K_D° ist K_D' in Gleichung (1.18) unabhängig von der Sondensequenz, wird jedoch durch die Länge der Ziel- und der Sondensequenz bestimmt. Die Hybridisierung auf Oberflächen ist in der Regel stark unterdrückt im Vergleich zur freien Lösung. Ausnahmen können jedoch auftreten, wenn die Bindung an die Oberfläche dadurch begünstigt wird, dass hohe lokale Sondendichten auftreten, die in der freien Lösung nicht zu finden sind. Dies tritt zum Beispiel auf, wenn Mikropartikel, welche mit DNA-Sonden beschichtet wurden, eingesetzt werden. STEVENS *et al.* verwendeten 22 Basen lange Oligonucleotide als Sonden bzw. Zielsequenzen. Beim Vergleich der Dissoziationskonstanten, der Rückreaktion der Hybridisierung, auf Partikeln und in der freien Lösung konnte beobachtet werden, dass bei höheren Temperaturen von über 60 °C die Hybridisierung auf den Partikeln bevorzugt war [99]. Das heißt, dass sehr hohe Sondendichten vorteilhaft sein können, wenn bei höheren Temperaturen hybridisiert wird.

Ein weiterer Einflussfaktor auf die Hybridisierung ist eine mögliche Faltung der DNA-Moleküle. DNA-Stränge können Sekundärstrukturen ausbilden, wenn intramolekulare Basenpaarungen durch komplementäre Sequenzabschnitte auftreten. Sekundärstrukturen verringern die Hybridisierungsgeschwindigkeit sowohl in freier Lösung als auch auf der Oberfläche. Bereits das Auftreten dreier intramolekularer Basenpaare halbiert die Geschwindigkeit der Hybridisierung. Auf Oberflächen sind die Geschwindigkeiten nochmals um den Faktor 20 bis 40 verlangsamt [100]. Hybridisierungen an Oberflächen können auch einen positiven Effekt auf die Spezifität haben. POULSEN *et al.* beschreiben, dass definierte Sequenzen an unterschiedlichen Stellen innerhalb der 60 Basen langen Sonden angeordnet werden können. Befindet sich die entsprechende Sequenz näher an der Sensoroberfläche, kann die Ziel-DNA, trotz geringerer Signalstärken, mit höherer Spezifität nachgewiesen werden [101].

Die DNA-Sequenz bestimmt auch die Schmelztemperatur der Doppelhelix (Abschnitt 1.10). Die Schmelztemperaturen der verschiedenen Sonden auf einem Chip sollten in einem möglichst engen Bereich liegen, damit die Hybridisierung auf

allen Sondenorten bei gleicher Temperatur mit gleicher Effizienz zwischen den komplementären DNA-Strängen stattfinden kann [102, 103]. Die Auswahl der Sondensequenzen hat daher einen großen Einfluss auf die Detektion der Hybridisierungen der Ziel-DNA.

Außerdem ist die Zusammensetzung der Hybridisierungslösung ein wichtiger Parameter. Kationen stabilisieren die DNA-Doppelhelix und erhöhen dadurch die Hybridisierungssignale [104]. Auf Oberflächen ist dieser Effekt besonders deutlich. Dabei sind zweiwertige Kationen effektiver als einwertige Kationen. Mit 15 mM Mg^{2+} wurden signifikant höhere Hybridisierungssignale beobachtet als mit 1 M Na^+ [105].

1.12 Mikrofluidik

Trotz der gehinderten Hybridisierung an Oberflächen, können Detektionen auf DNA-Mikroarrays durchgeführt werden. Überschichtet man jedoch einen Sensor mit einer Lösung, die den entsprechenden Analyt enthält, so findet die spezifische Anbindung nur sehr langsam statt. Der Transport des Analyten ist von der Diffusion abhängig.

Es wurden daher Möglichkeiten entwickelt, die es erlauben kleinste Flüssigkeitsmengen in Mikrokanälen zur Sensoroberfläche zu bringen. Die Höhe solcher Kanäle liegt im Bereich einiger 10 bis 100 μm . Daher können nur laminare Strömungen in den Kanälen beobachtet werden [106]. Jedoch kann der Transport eines Analyten in kleinen Mengen über die Oberfläche gepumpt werden, um die Konzentration der Ziel-Moleküle in der Nähe der Oberflächen konstant zu halten bzw. den Massentransport zu verbessern [107]. Durch das Erhöhen der Flussrate kann die Diffusionsschichtdicke verkleinert werden. Die Signale können durch das Verwenden kleiner Kanalhöhen und hoher Flussraten deutlich gesteigert werden [108]. Dadurch kann auch die Detektionszeit stark verkürzt werden.

Um einen schnellen Transport kleiner Probenmengen zur Sensoroberfläche zu gewährleisten, kann ein zweiter mikrofluidischer Fluss oberhalb der Oberfläche eingesetzt werden. Diese laminare Strömung des Lösungsmittels hält die Strömung mit dem Analyten in einer dünnen Schicht an der Oberfläche, erhöht die Flussrate und verringert die Detektionszeit [109].

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 XPS-Untersuchungen zur Sondendichte

Für die Untersuchung der Abhängigkeit der Sondendichte von der Magnesiumchloridkonzentration in der Immobilisierungslösung wurden Proben mit gemischten SAM aus Mercaptohexanol und thiolmodifizierten ODN vorbereitet. Silicium-Wafer wurden 5 min in Aceton im Ultraschallbad gereinigt, mit Ethanol gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Danach wurde eine 100 nm dicke Goldschicht auf eine 3 nm dicke Chromschicht aufgedampft. Sofort nach der Bedampfung wurden die 1 μ M ODN-Lösungen mit 0, 2, 20 und 120 mM MgCl_2 für 1,5 h auf die Goldoberflächen gegeben. Das bei diesen Experimenten verwendete ODN (Biozym Scientific GmbH) war thiolmodifiziert und hatte die folgende Sequenz: 5'-HS-(CH₂)₆-PO₄-TTTTTTTTTCATTCTTATCACAGGCTCAAACCAGTCC-3'. Anschließend wurden die Substrate mit entionisiertem Wasser gespült, im Stickstoffstrom getrocknet und mit einer wässrigen 1 mM Mercaptohexanol-Lösung für 1 h überschichtet. Weiterhin wurden die Substrate mit entionisiertem Wasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Die beschichteten Substrate wurden mittels XPS untersucht. Die XPS-Messungen und die dazugehörige Datenanalyse wurde von Dr. KURT KUMMER (Institut für Festkörperphysik, Technische Universität Dresden) durchgeführt. Die Messungen erfolgten am Berliner Elektronenspeicherring für Synchrotronstrahlung (BESSY) unter Nutzung des Strahlrohrs des Russisch-Deutschen Labors.

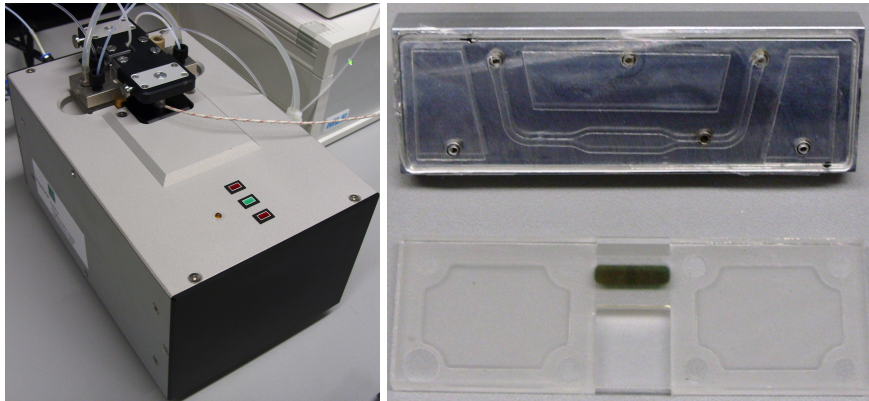


Abbildung 2.1: Links: SPR-Einheit, entwickelt von Fraunhofer IOF [27]. Rechts: Mikrofluidischer Kanal (PDMS, 120 μm hoch und 3 mm breit), TOPAS[®]-Chip (76 mm \times 26 mm \times 4 mm) mit integrierter Optik und Goldschicht.



Abbildung 2.2: Horizontale, optische Messkanäle und senkrechte, linienförmige Sondenorte auf der Goldoberfläche eines SPR-Chips.

2.2 SPR-Chip und SPR-Spektrometer

TOPAS[®]-Chips (76 mm \times 26 mm \times 4 mm) mit integrierter Optik und einer 50 nm dicken Goldschicht (Fläche: 3 mm \times 12 mm) werden für die Messungen verwendet (Abbildung 2.1, links) [27]. Die TOPAS[®]-Chips wurden durch KDS Radeberger Präzisions-Formen- und Werkzeugbau GmbH im Spritzgussverfahren hergestellt. Die Beschichtung mit Gold erfolgte durch das Fraunhofer-Institut für Angewandte Optik und Feinmechanik IOF, Jena. Der Goldfilm des SPR-Chips wird durch drei Leuchtdioden (LEDs, Wellenlänge: 810 nm) angestrahlt. Diese drei LEDs beleuchten drei unterschiedliche Bereiche (1 mm \times 10 mm) der Goldoberfläche, die im Weiteren als Messkanäle bezeichnet werden (Abbildung 2.2). Das SPR-Signal stellt eine Mittelung der Spektren über die Breite eines Messkanals dar. Das reflektierte Licht dieser Bereiche wird durch eine CCD⁽¹⁵⁾-Kamera detektiert, deren örtliche Auflösung 1280 Pixel beträgt. Ein Pixel der 1280 Reihen entspricht 7,3 μm . Die winkelabhängige Intensitätsverteilung wird innerhalb der 960 Spalten dargestellt. Ein

⁽¹⁵⁾ engl. *charge-coupled device*, ladungsgekoppeltes Bauelement

mathematischer Algorithmus (Centroid-Algorithmus) bestimmt die Winkelposition des Intensitätsminimums im SPR-Spektrum für alle 1280 Pixel der CCD-Kamera. Die Verschiebung der Minima innerhalb der Pixelspalten wird als SPR-Signal in Pixel angegeben.

2.3 Mikrofluidik

Eine Diffusionslimitierung der PCR-Produkte zur Sensoroberfläche kann durch Nutzung eines mikrofluidischen Kanals minimiert werden (Abbildung 2.1, rechts oben). Deshalb wird die Mikrofluidik mit einer Spritzenpumpe genutzt. Eine Anschlussplatte aus Aluminium wird auf einem Chip, mit Hilfe der Vakuuman-schlüsse befestigt. Die Anschlussplatte mit dem Mikrokanal wurden durch das Fraunhofer-Institut für Werkstoff- und Strahltechnik IWS und die GeSiM mbH entwickelt und bereitgestellt. In ihr befinden sich eine Polydimethylsiloxan (PDMS)-Flusszelle, ein Wärmetauscher und Vakuum- sowie fluidische Anschlüsse. Der Mikrokanal der Flusszelle ist 120 µm hoch und 3 mm breit. Die Temperatur wird durch ein Wasserbad (JULABO® F32-HD, Temperaturstabilität: $\pm 0,01$ K) reguliert und mit einem Thermoelement Typ-T gemessen. Die Flüssigkeiten werden mittels einer 500 µl Spritzenpumpe durch die Flusszelle und Polytetrafluorethylen-Schläuche gedrückt bzw. gezogen.

2.4 Synthese der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden von der Biotype Diagnostic GmbH zur Verfügung gestellt. Durch die Verwendung bestimmter Primer-Paare (Biomers) werden diese PCR-Produkte mit überhängenden ssDNA-TAGs synthetisiert. Einer der Primer ist 5'-modifiziert mit dem TAG getrennt durch einen Hexaethylenglycolblock (HEG): 5'-TAG-HEG-AGCCTGAATGGCGAATGG-3'. Für den zweiten Primer werden unterschiedliche Sequenzen benutzt, um die Synthese der PCR-Produkte mit definierter Länge zu ermöglichen (Tabelle 2.1). Als Templat diente der pUC19 Vektor (Invitrogen). Anschließend wurden die PCR-Produkte gereinigt (Reinigungskit, Qiagen) und mittels UV-Absorption quantifiziert (BioPhotometer, Eppendorf).

Tabelle 2.1: Primer-Sequenzen zur Synthese definierter PCR-Produkte. Der pUC19-Vektor dient als Templat.

Länge der PCR-Produkte	Primer-Sequenz (5' → 3')
60 bp	AATACCGCACAGATGCGTAAG
100 bp	CAGAGCAGATTGTACTGAGAGTG
300 bp	GACATTAACCTATAAACTAGGCGTATCA

2.5 Linearität und Empfindlichkeit des SPR-Sensors

Eine Konzentrationsreihe wässriger MgCl_2 -Lösungen von 0 bis 120 mM in 10 mM Intervallen wurde bei 25 °C über die Sensoroberfläche gepumpt und die Signaländerungen wurden nach dem Stoppen des Flusses jeweils über etwa 100 s (mindestens 30 Werte) aufgezeichnet und zuerst zeitlich und danach räumlich über alle 1280 Pixelreihen der CCD-Kamera gemittelt. Nach der Messung mit der höchsten Konzentration wurde wiederholt ohne MgCl_2 gemessen. Die Differenzen der Verschiebung der SPR-Minima wurden auf die erste Messung mit entionisiertem Wasser bezogen.

2.6 Vorversuche: DNA-Mikroarrays auf SPR-Chips

2.6.1 Blocken und unspezifische Adsorption

Nach dem Auftragen der Sondenlösungen wird das DNA-Mikroarray direkt mit einer ethanolischen Lösung des 11-Mercapto-1-undecanols (MCU) einer Konzentration von 10 mM für 1 h behandelt. Anschließend wird der SPR-Chip in das SPR-Spektrometer eingesetzt. Danach wird mit 0,1 M Na_2EDTA , 0,1 M NaOH und 10 mM MCH bei 40 °C gespült. Nach jedem dieser Spülschritte wird mit entionisiertem Wasser gespült.

2.6.2 Aufbau der DNA-Mikroarrays auf SPR-Chips

Der Aufbau der Mikroarray erfolgt mittels eines Mikropipettiersystems auf zwei Arten. Zum einen das Auftragen der Lösungen direkt auf eine unbehandelte Goldoberfläche, zum anderen auf eine zuvor, mittels Mikrokontaktdruck (siehe Abschnitt 2.10), hydrophil/hydrophob strukturierte Goldoberfläche. Um linienförmige Spots auf einer homogenen Goldoberfläche zu erhalten, werden die Tropfen

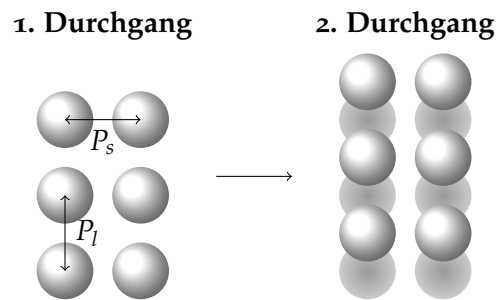


Abbildung 2.3: Aufbau linienförmiger Sondenorte durch die Tropfenabgabe in zwei Durchgängen. Der Pitch innerhalb einer Linie, P_l , wird in beiden Durchgängen verwendet. Nach dem Verdunsten im ersten Durchgang werden die Tropfen im zweiten Durchgang in die Zwischenräume abgegeben, indem ein Versatz um den halben Pitch entlang der Linie erfolgt. Der Pitch zwischen den Sondenorten, P_s , wird etwa doppelt so groß wie P_l gewählt.

in zwei Durchgängen abgesetzt. Nach dem Verdunsten, das innerhalb einer Zeit von weniger als einer Minute abgeschlossen ist, wird im zweiten Durchgang die Sondenlösung zwischen die Tropfenpositionen des ersten Durchgangs aufgetragen (Abbildung 2.3). Die Sequenzen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten DNA-Sonden sind in Tabelle 2.2 aufgelistet. Außerdem sind dort komplementäre Teilsequenzen hervorgehoben, welche die Ausbildung von Haarnadelstrukturen ermöglichen. Für den Aufbau der Mikroarrays wurden die SPR-Chips zunächst mit Ethanol (reinst, Merck) und entionisiertem Wasser gespült. Danach wurden die Chips im Stickstoffstrom getrocknet. Die Immobilisierungslösungen wurden mittels des Mikropipettiersystems Nano Plotter 2.1 (GeSiM mbH) in Linien auf die Goldoberfläche aufgetragen (Abbildung 2.4). Diese Lösungen enthielten $10 \mu\text{M}$ Sonden-DNA, 20 mM MgCl_2 und 5% Glycerin in wässriger Lösung. Es werden Tropfen mit einem Volumen von etwa 50 pl im Abstand von $72 \mu\text{m}$ abgesetzt. Im zweiten Durchgang wird um $36 \mu\text{m}$ entlang der Linien versetzt. Somit beträgt der Pitch innerhalb einer Linie $36 \mu\text{m}$ und der Pitch zwischen den Linien $140 \mu\text{m}$. Es wurden Arrays aus 60 parallelen Linien auf die Goldoberflächen aufgetragen. Dabei reichte jede Linie über alle drei Messkanäle, so dass insgesamt 180 Spots ausgewertet wurden. Die relative Luftfeuchte wurde während des Aufbaus des Arrays auf 80% bei $23 \text{ }^\circ\text{C}$ gehalten. Bei den Experimenten zur Optimierung der Glycerinkonzentration wurde der Pitch innerhalb der Linien auf $50 \mu\text{m}$ gesetzt und der Pitch zwischen den Linien auf $100 \mu\text{m}$. Die Glycerinkonzentration wurden von 0% bis 5% variiert. Nach dem Auftragen der Immobilisierungslösungen werden die Goldoberflächen mit entionisiertem Wasser gespült und 30 min mit einer 1 mM

Tabelle 2.2: TAG- und Kontroll-Sequenzen. Haarnadelstrukturen sind unterstrichen.

Name	Sequenz (5'→3')
TAG1	ATTGCGTGC <u>ACTT</u> GCTTCGGTAGGA
TAG2	TCGGTATGAGATGCCGCCAATTCGA
TAG3	GAACGGACGTCGGTTAGCAACAACA
TAG4	ATGCGT <u>TACGT</u> GTTGGAGGACGTAAC
TAG5	<u>TGCACT</u> ATGACTGAATGTGCGGTGT
TAG6	GCCGCTTCGACCGTATCTGGATAAT
TAG7	TATTCGGTTGAGCCATGTCGACTGT
TAG8	AACACAATCGAACACATCAGTCGGC
TAG9	TTGACGAGGAATGCGGTAGACTAGG
TAG10	CCGTGCGAATACAGAGCTTACGATG
TAG11	CGCGTTCTATAATCGGATCTGCGAC
TAG12	AATGGTACTCAACAT <u>ACGCCGT</u> AGC
TAG13	GGTGTCTAGCCGTACATCGATCAAG
TAG14	CCAAGTAGTTAACAACGCGAGCATG
TAG15	AGCATCACGAGAGT <u>AGGATCT</u> ACCT
TAG16	GGCAACACACTCTAGCGATAATTGG
TAG17	CGAGACCTTATTCTGGAGAGCCTAT
TAG18	GAGCGTCCGTGTTGTGTAGTGATAA
TAG19	AACAGAAGACACCGAGCATAGATAC
TAG20	GCGTAGAGTTTATTTAGGTGGACAA
TAG21	ATCTCATCTGTAGCGTAGGTGTAGC
TAG22	AACGGAAAGCAGTAATCGGTCTAAC
Kontrolle 1	<u>ACCGTGAATGGTTGCAGTCCAACCA</u> TTTTTTTT-(CH ₂) ₃ -SH
Kontrolle 2	CTTATCTAACGTCGTTACTCTGGCC TTTTTTTT-(CH ₂) ₃ -SH
Kontrolle 3	CTATCTAGCATGCCTATCAGCGTTG TTTTTTTT-(CH ₂) ₃ -SH
Kontrolle 4	TAGGTGGTACGTCTATTCCTGGTCC TTTTTTTT-(CH ₂) ₃ -SH

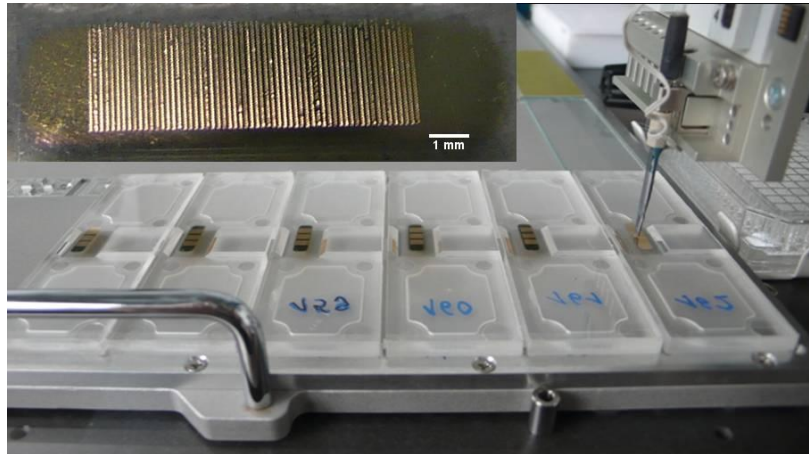


Abbildung 2.4: Aufbau der Mikroarrays mittels Nano Plotter 2.1 (GeSiM mbH). Oben links: Rückstände nach dem Auftragen der Immobilisierungslösungen.

Lösung des Mercaptohexanols in 100 mM Tris und 10 mM EDTA bei pH = 10 geblockt. Abschließend werden die DNA-Mikroarrays mit entionisiertem Wasser gespült, im Stickstoffstrom getrocknet und bei 4 °C gelagert.

Die Anti-TAG-Sequenzen der thiolmodifizierten Sonden sind komplementär zu den 17 TAG-Sequenzen der PCR-Produkte. Diese 3'-Modifikation enthält acht aufeinanderfolgende Thyminbasen. Zusätzlich werden drei nichtkomplementäre Kontrollsequenzen verwendet (Tabelle 2.2).

2.6.3 Hybridisierung 17 verschiedener Anti-TAGs

Der Mikrokanal wurde mit einer wässrigen Lösung von 120 mM $MgCl_2$ gespült. Danach wurden 90 μ l der Hybridisierungslösung bestehend aus 5 ng/ μ l PCR-Produkt in 120 mM $MgCl_2$ über die Sensoroberfläche 10 min lang vor und zurück gepumpt. Die Flussrate betrug etwa 6 μ l/s. Die Hybridisierungstemperatur wurde auf 40 °C eingestellt. Nach der Hybridisierung wurden das System mit 500 μ l der 120 mM $MgCl_2$ -Lösung gespült. Diese Prozedur wurde in aufsteigender Reihenfolge von TAG1 bis TAG17 durchgeführt.

2.7 Optimierung der Immobilisierung

Für die Optimierung der Immobilisierung der Sonden werden zwei verschiedene Anti-TAG-Sequenzen gewählt (Tabelle 2.3). Unterschiedliche Zusammensetzun-

Tabelle 2.3: Verwendete Anti-TAG-Sequenzen bei der Optimierung der Immobilisierungsparameter.

Name	Sequenz 5'→3'-TTTTTTTT-(CH ₂) ₃ -SH
Anti-TAG16	CCAATTATCGCTAGAGTGTGTTGCC
Anti-TAG17	ATAGGCTCTCCAGAATAAGGTCTCG

gen der Sondenlösungen werden getestet. Es werden die Sondenkonzentration ($c(\text{Sonde})$) und die MgCl_2 -Konzentration ($c(\text{MgCl}_2)$) variiert. DMSO und Glycerin werden als Additive getestet (Tabelle 2.4). Die Goldoberfläche wird mit Ethanol (reinst, Merck) und entionisiertem Wasser gespült und im N_2 -Strom getrocknet. Mittels Nano Plotter 2.1 (GeSiM mbH) wurden etwa 50- μl -Tropfen bei 80 % relativer Luftfeuchte und 23 °C) aufgetragen. Diese Lösungen wurden linienförmig und parallel im Abstand von 180 μm aufgetragen. Innerhalb der Linien wurden die Tropfen im Abstand von 50 μm abgesetzt. Nach dem Auftragen der Sondenlösungen wurden die Chips mit entionisiertem Wasser gespült und die Goldoberfläche mindestens 30 min mit 1 mM Mercaptohexanol (MCH, Sigma) behandelt. Abschließend wurden die Chips mit entionisiertem Wasser gespült, im N_2 -Strom getrocknet und bei 4 °C gelagert. Nachdem die Flusszelle mit dem Chip verbunden und in das SPR-Spektrometer eingesetzt ist, wird mit 120 mM MgCl_2 gespült. Danach wird 90 μl entsprechender PCR-Produkte (5 ng/ μl) auf die Goldoberfläche gezogen und 15 min (für Optimierungsversuche mit TAG13 oder TAG14) bzw. 6 min lang über das DNA-Mikroarray vor und zurück gepumpt (30 $\mu\text{l}/\text{s}$, 40 °C). Danach wird erneut gespült. Die Bindung der PCR-Produkte und ihre Verteilung auf der Goldoberfläche wird durch Anfärbung des DNA-Mikroarrays mit YOYO[®]-1-iodid (Invitrogen, Y3601) (0,1 μM in 10 mM Tris, 1 mM Na_2EDTA , pH = 7) und anschließender Untersuchung mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M, Carl Zeiss) sichtbar gemacht.

Tabelle 2.4: Spots des Mikroarray auf dem SPR-Chip zur Optimierung der Immobilisierungslösungen. Die Sondenkonzentration und MgCl_2 -Konzentration werden variiert. DMSO und Glycerin wurden als Additive getestet. Wenn nicht anders angegeben wird Glycerin als Additiv eingesetzt. Die Sonden werden entsprechend der aufsteigenden Spot-Nr. von links nach rechts immobilisiert. Die Sonden tragen eine Anti-TAG16- (Kontrolle) oder Anti-TAG17-Sequenz.

Spot-Nr. ^a	Sondenkonzentration [μM]	MgCl_2 -Konzentration [mM]
1; 16; 31	10	20
2; 17; 32	10	20 ^b
3; 18; 33	10	20 ^c
4; 19; 34	10	20 ^d
5; 20; 35	0,625	20
6; 21; 36	1,25	20
7; 22; 37	2,5	20
8; 23; 38	5	20
9; 24; 39	20	20
10; 25; 40	40	20
11; 26; 41	10	0
12; 27; 42	10	10
13; 28; 43	10	40
14; 29; 44	10	80
15; 30; 45	10	0 ^d

^a Sondenlösungen entweder als einzelne Tropfen mit einfachem Pitch bzw. als möglichst zusammenhängende Linie mit halbem Pitch aufgetragen. Sondenorte aus 30 bzw. 60 Tropfen über alle drei Messkanäle im Abstand von 100 bzw. 50 μm . Abstand der Sondenorte: 180 μm , Spots 1 bis 15 mit einfachem Pitch, alle anderen mit halbem Pitch.

^b Anti-TAG16 als Kontrolle

^c 5% DMSO statt 5% Glycerin

^d weder Glycerin noch DMSO

Tabelle 2.5: Sondensequenzen zur Untersuchung des Einflusses der Konzentration, Länge und Struktur der PCR-Produkte. Die unterstrichenen Basen im Anti-TAG₄ ermöglichen eine Haarnadelstruktur mit einer 8 Basen langen Schleife und 5 bp langen Armsequenzen.

Name	Sequenz (5'→3'-TTTTTTTT-(CH ₂) ₃ -SH)
Anti-TAG ₄	GTTACGTCCTCCAACACGTACGCAT
Anti-TAG ₁₇	ATAGGCTCTCCAGAATAAGGTCTCG
Kontrolle 3	CTATCTAGCATGCCTATCAGCGTTG

2.8 Einfluss der Konzentration, Länge und Struktur der PCR-Produkte

2.8.1 Immobilisierung der Anti-TAG- und Kontrollsonden

Thiolmodifizierte Sonden-DNA (biomers.net) mit Anti-TAG-Sequenzen wurde mit einer Konzentration von 10 µM in einer wässrigen 20 mM MgCl₂-Lösung (J. T. Baker) verwendet. Es wurden die zuvor optimierten Immobilisierungsparameter gewählt [16]. Es wurden Sonden mit drei verschiedenen Sequenzen verwendet: Anti-TAG₄, Anti-TAG₁₇ und eine nichtkomplementäre Kontrollsequenz (Kontrolle 3). Bei Anti-TAG₄ ist die Ausbildung einer Haarnadelstruktur möglich (Tabelle 2.5). Die Goldoberfläche der SPR-Chips wurde durch Spülen mit Ethanol (reinst, Merck) und entionisiertem Wasser gereinigt. Danach wurden die Chips im Stickstoffstrom getrocknet. Die Sondenlösungen wurden linienförmig auf die Goldoberfläche aufgetragen. Dazu wurde das Mikropipettiersystem Nano Plotter 2.1 (GeSiM mbH) verwendet. Die Tropfen mit einem Volumen von etwa 50 µl wurden mit einem Pitch von 36 µm abgesetzt. Der Pitch zwischen der Linien (Spots) betrug 200 µm. Es wurden 90 Spots pro Chip erzeugt. Für alle drei Messkanäle wurden die Sonden in der folgenden Reihenfolge von links nach rechts mit 10-facher Wiederholung aufgetragen: Anti-TAG₄, Anti-TAG₁₇, Kontrolle 3. Die relative Luftfeuchte beim Aufbau des Arrays betrug 80 % bei 23 °C. Nach dem Auftragen der Sondenlösungen wurde die Goldoberfläche mit entionisiertem Wasser gespült und 30 min mit einer wässrigen Mercaptohexanol-Lösung (MCH, Sigma) der Konzentration von 1 mM geblockt. Abschließend wurden die DNA-Mikroarrays mit entionisiertem Wasser gespült, im Stickstoffstrom getrocknet und bei 4 °C gelagert.

2.8.2 Hybridisierungsparameter

Bei der Untersuchung des Einflusses der PCR-Produktlänge auf die SPR-Signale wurde eine Konzentration von 5 ng/ μ l gewählt. Zwischen den Hybridisierungen wurden Dehybridisierungen durchgeführt, indem in folgender Reihenfolge mit 500 μ l wässriger Lösungen gespült wurde: entionisiertes Wasser, 0,1 M Na₂EDTA (Sigma), entionisiertes Wasser, 0,1 M NaOH, entionisiertes Wasser und 120 mM MgCl₂. Zur Bestimmung der Abhängigkeit der SPR-Signale von der PCR-Produktkonzentration wurde die Konzentration schrittweise erhöht (0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 ng/ μ l). Die Hybridisierung wurde in den ersten 10 min ausgewertet. Nach jeder Hybridisierung mit einer anderen Konzentration wurden mit 500 μ l 120 mM MgCl₂ gespült.

2.8.3 Auswertung der SPR-Signale

Für die Bestimmung der SPR-Signaländerungen wurden die Werte über 120 s gemittelt, um daraus die Differenzen zu berechnen. Dafür wurden die Werte vor der Hybridisierung von denen nach der Hybridisierung und dem Spülen mit 120 mM MgCl₂ subtrahiert. Die Verschiebung der SPR-Minima wurde referenziert. Dazu wurden die Signale auf Flächen des Mikroarrays verwendet, die nur mit Mercaptohexanol geblockt wurden und auf denen keine Sonden-DNA immobilisiert wurde. Die Kinetik und die Signaländerungen wurden anhand entsprechender Messsignale der Orte der Peakmaxima und der Mitte der Kontrollsonden-Spots ausgewertet.

2.9 Fluoreszenzmikroskopie

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie wurde untersucht, wie die PCR-Produkte auf jedem Spot räumlich verteilt gebunden haben. Dazu wurden die DNA-Mikroarrays mit 20 μ l einer 2 μ M YOYO[®]-1-iodid-Lösung (Invitrogen, Y3601) in 10 mM Tris und 1 mM EDTA über 2 h im Dunklen bei Raumtemperatur angefärbt. Es wurde das Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M (Carl Zeiss) verwendet.

2.10 Strukturierung durch μ CP

Für die Experimente zur Strukturierung der Goldoberflächen in hydrophile und hydrophobe Bereiche wurden verschiedene Master aus Silicium angefertigt. Der Prozess ist in Abbildung 2.5 schematisch dargestellt. Eine ausführliche Beschreibung der Schritte zur Herstellung aller auf den SPR-Chips getesteten Master ist in der Diplomarbeit von FRANK GÖTZE zu finden [87]. Für die vorliegende Arbeit wurden nur streifenförmig strukturierte Stempel verwendet. Die Stege der Strukturen waren $7\ \mu\text{m}$ breit und durch $15\ \mu\text{m}$ breite Streifenbereiche getrennt.

2.10.1 Herstellung des Masters

Die Herstellung der Master soll hier kurz beschrieben werden. Die ausführliche Beschreibung ist der Diplomarbeit von FRANK GÖTZE zu entnehmen [87]. Der Master wurde mittels Laserlithographie hergestellt. Dazu wurde ein Siliciumwafer gereinigt und mit einem Haftvermittler (TI-Prime, Micro Chemicals) beschichtet. Danach wurde ein Positivlack (AZ[®] 1514, Micro Chemicals) aufgetragen und vorgebacken. Anschließend wurde der Lack mittels eines Lithographielasers (Heidelberg Instruments DWL 66Fs) strukturiert. Danach wurde erneut erhitzt, um eine Vernetzung der unbelichteten Bereiche zu erzielen. Der verbleibende belichtete Lack wurde mit dem Entwickler (AZ[®] 351B, Micro Chemicals) entfernt. Das Ätzen wurde bis zu einer Tiefe von $10\ \mu\text{m}$ durch die GeSIM mbH durchgeführt.

2.10.2 Herstellung der PDMS-Stempel

Die Silicium-Master wurden als Positiv-Strukturen hergestellt, das heißt in der Form der Stempel. Nach der Reinigung der Silicium-Master wurden diese im Luftplasma behandelt, um eine SiO_2 -Schicht zu erhalten. Danach erfolgte eine Beschichtung mit Trichloro(1H,1H,2H,2H-perfluorooctyl)silan (Sigma Aldrich) aus der Gasphase, um das Ablösen des PDMS nach der Abformung zu ermöglichen. Nach dem Abgießen und Vernetzen des PDMS (SYLGARD[®] 184 KIT, Dow Corning) wurden die PDMS-Master entnommen. In analoger Weise wie mit den Silicium-Mastern wurde mit den PDMS-Mastern verfahren. Die beim letzten Schritt erhaltenen PDMS-Stempel wurden für das μ CP verwendet (Abbildung 2.5). Dieses Vorgehen erlaubt das Schonen der Silicium-Master und eine Vervielfältigung der

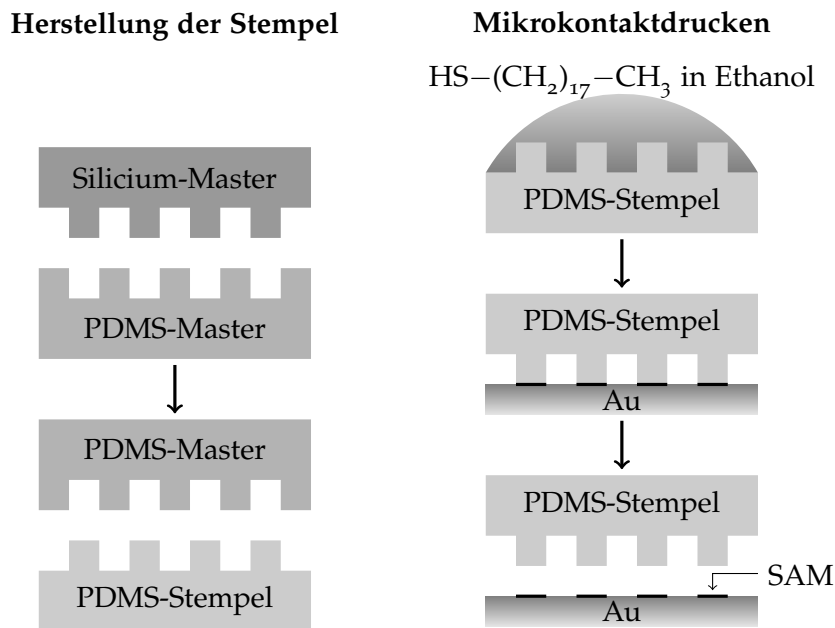


Abbildung 2.5: Herstellung der PDMS-Stempel und schematischer Ablauf des μ CP. Ausgehend von einem Silicium-Master wird zunächst ein PDMS-Master erzeugt. Der PDMS-Master dient zum Abformen der PDMS-Stempel. Ein Stempel wird mit einer ethanolischen Lösung des Octadecylmercaptans, $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$, überschichtet. Nach dem entfernen der überschüssigen Lösung wird das $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$ in Form einer SAM auf ein Goldsubstrat strukturiert übertragen.

PDMS-Master, um eine größere Anzahl der Stempel parallel abformen und verwenden zu können.

2.10.3 Mikrokontaktdrucken

Für das Mikrokontaktdrucken wurde der PDMS-Stempel 2 min mit 20 mM Octadecylmercaptanlösung in reinst Ethanol überschichtet. Danach wurde die überschüssige Lösung vom Stempel durch kurzes Abblasen im Stickstoffstrom entfernt. Direkt im Anschluss wurde der Stempel für 15 s mit der Goldoberfläche des SPR-Chips in Kontakt gebracht (Abbildung 2.5). Nach dem vorsichtigen Ablösen des Stempels wurden die verbleibenden hydrophilen Streifenbereiche auf dem SPR-Chip mit thiolmodifizierten DNA-Sonden funktionalisiert.

2.10.4 Beschichtung hydrophiler Oberfläche mit Sonden-DNA

Thiolmodifizierte Sonden-DNA mit der Sequenz des Anti-TAG₁₇ (50 μ M, 100 mM MgCl₂, 5 % Glycerin) wurde mittels des Mikropipettiersystems Nano Plotter 2.1 (GeSiM mbH) linienförmig, für die drei optischen Bereiche (Abbildung 2.2) immobilisiert. Dazu wurden 50 μ l-Tropfen abgesetzt. Das Blocken gegen unspezifische Adsorption erfolgt durch 30 min mit 10 mM ethanolischer Mercaptoundecanollösung und anschließend 60 min mit 10 mM wässriger Mercaptohexanollösung.

Um die Funktionsfähigkeit der DNA-Sonden zu prüfen, wurde eine Hybridisierung mit 5 ng/ μ l des 300 bp langen TAG₁₇-PCR-Produktes in 120 mM MgCl₂ durchgeführt. Zusätzlich wurde das PCR-Produkt auf dem Mikroarray nach der Hybridisierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff YOYO[®]-1-iodid markiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

2.11 Phosphorothioat-DNA-Sonden

In diesem Experiment werden Phosphorothioat-DNA und thiolmodifizierte DNA immobilisiert. Die Immobilisierungslösungen enthalten 50 μ M Sonden-DNA, 5 % Glycerin und 100 mM MgCl₂. Das Mikroarray wird, wie in Abschnitt 2.8.1 beschrieben, mit Hilfe des Mikropipettiersystems aufgebaut. Die Sequenzen und Modifikationen der verwendeten Sonden sind in Tabelle 2.6 gezeigt. Die Immobilisierung der Phosphorothioat-DNA wurden in Mitarbeit von KATHIA LORENA JIMÉNEZ-MONROY durchgeführt und in Form einer Master-Arbeit beschrieben [110]. Die Sonden werden entweder direkt auf die Goldoberfläche der SPR-Chips aufgetragen oder auf eine zuvor funktionalisierte Oberfläche. Diese Funktionalisierung der Sensoroberfläche erfolgt durch die Beschichtung der Goldoberfläche mit 1 mM 11-Mercapto-1-undecanol für 2 h. Anschließend wird mit reinst Ethanol gespült und im N₂-Strom getrocknet. Danach wird der so gebildete SAM mit 10 % 3-(Iodpropyl)trimethoxysilan in Ethanol (95 % mit 5 % H₂O) für 2 h überschichtet. Nach dem Spülen mit reinst Ethanol und Wasser wird der SPR-Chip im N₂-Strom getrocknet und für die Immobilisierung der DNA-Sonden verwendet. Das Blocken der Oberflächen nach der Immobilisierung der Sonden wird mit 1 mM Mercaptohexanol für 30 min durchgeführt. Auf den SPR-Chips mit Sonden, welche direkt an das Gold gebunden sind, erfolgt die Hybridisierung bei 25 °C, 120 mM MgCl₂ und 5 ng/ μ l TAG₁₇-PCR-Produkt mit der Länge von 300 bp. Auf SPR-Chips mit Sonden, die

Tabelle 2.6: Sequenzen und Modifikationen der Phosphorothioat-DNA-Sonden im Vergleich zu den thiolmodifizierten DNA-Sonden.

Name	Sequenz (5'→3')	3'-Modifikationen
Anti-TAG ₁₇ hp	ATAGGCTCTCCAGAATAAGGTCTCG GATCGATCGATC	
Anti-TAG ₁₇ -SH	Anti-TAG ₁₇	-(CH ₂) ₃ -SH
Anti-TAG ₁₇ -T8-SH	Anti-TAG ₁₇	-TTTTTTTT-(CH ₂) ₃ -SH
Anti-TAG ₁₇ -A8-SH	Anti-TAG ₁₇	-AAAAAAAA-(CH ₂) ₃ -SH
Anti-TAG ₁₇ -T8-PT	Anti-TAG ₁₇	-TTT*T*T*T*T*T
Anti-TAG ₁₇ -A8-PT	Anti-TAG ₁₇	-AAA*A*A*A*A*A
Anti-TAG ₁₇ -HP-PT	Anti-TAG ₁₇	-hp*G*T*A*A*hp
Kontrolle 4	TAGGTGGTACGTCTATTCTGGTCC	-TTTTTTTT-(CH ₂) ₃ -SH

* - Phosphorothioatgruppe

über das Iodsilan immobilisiert sind, erfolgt die Hybridisierung bei 25 °C, 60 mM MgCl₂ und 2,5 ng/μl TAG₁₇-PCR-Produkt mit der Länge von 300 bp.

Kapitel 3

Ergebnisse und Diskussion

Eine ausreichende Sondendichte ist entscheidend für hohe Signale auf DNA-Chips [95]. Um eine spezifische Hybridisierung zu erzielen, muss die freie Goldoberfläche auf den SPR-Chips geblockt werden. Andernfalls führen Wechselwirkungen der Nucleobasen mit der Goldoberfläche zur unspezifischen Adsorption der DNA auf der Sensoroberfläche und eine sequenzspezifische Aussage ist nicht mehr möglich [51, 53, 54]. Um die spezifische Hybridisierung der Ziel-DNA (z.B. PCR-Produkte) mit den Sonden zu ermöglichen, wird die freie Goldoberfläche durch die Beschichtung mit Mercaptoalkoholen (z.B. Mercaptohexanol) geblockt. Das Mercaptohexanol (MCH) bildet eine selbstorganisierende Monoschicht (SAM) [111]. Außerdem verdrängt es die unspezifisch adsorbierte DNA von der Goldoberfläche und verbessert die Zugänglichkeit der Ziel-DNA zur Sonde [59]. Die Sondendichte kann durch den Zusatz des MgCl_2 zur Immobilisierungslösung kontrolliert werden. Dabei wird die elektrostatische Abstoßung des Phosphatrückgrats reduziert [72, 112]. Aus dem gleichen Grund wird MgCl_2 zur Hybridisierungslösung gegeben. Bei der Hybridisierung zwischen einem TAG und seinem Anti-TAG wird dadurch die Stabilität der entstehenden DNA-Doppelhelix erhöht. Dies ermöglicht eine dichtere Packung der PCR-Produkte auf den Spots der Sonden-DNA.

3.1 XPS-Untersuchungen zur Sondendichte

Die Abhängigkeit der Sondendichte von der Magnesiumchloridkonzentration in der Immobilisierungslösung wurde mittels XPS untersucht. Dazu wurde $1 \mu\text{M}$ eines thiolmodifizierten ODN bei 0, 2, 20 und 120 mM MgCl_2 auf goldbedampften Silicium-Wafern immobilisiert. Danach wurde 1 mM Mercaptohexanol für die

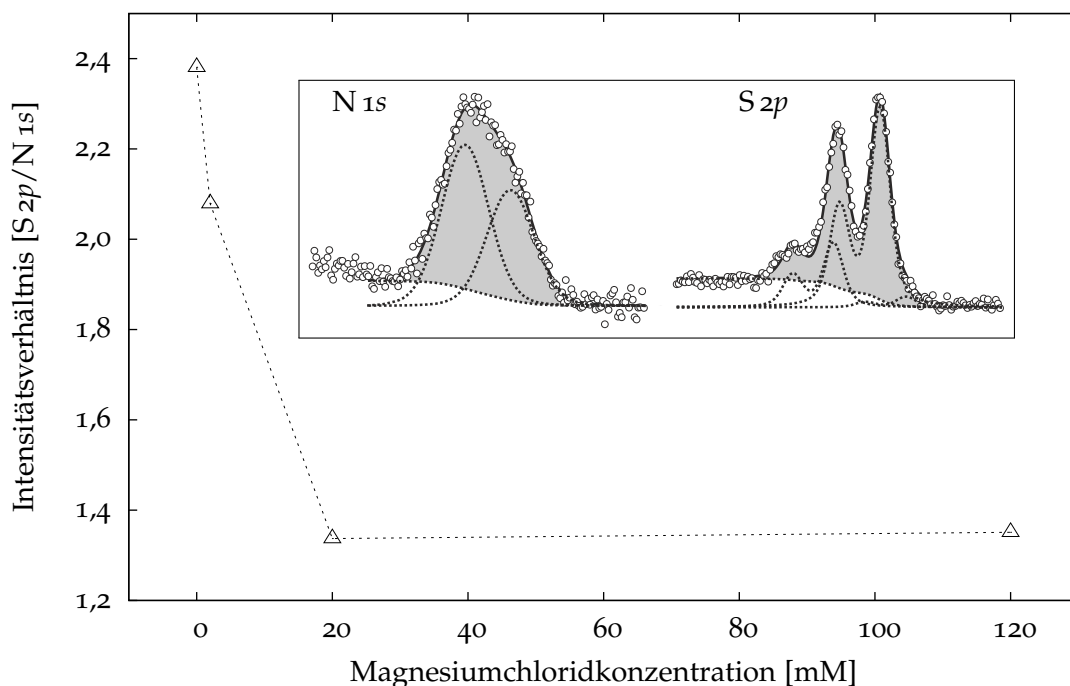


Abbildung 3.1: Steigerung der Sondendichte durch Zugabe des MgCl_2 , dargestellt als Abnahme des Intensitätsverhältnisses der Photoelektronenemission des Schwefels ($\text{S } 2p$) zu der des Stickstoffs ($\text{N } 1s$). Der umrandete Bereich zeigt die Intensitätsbeiträge in den $\text{S } 2p$ - und $\text{N } 1s$ -Spektren, welche mittels der Methode der kleinsten Quadrate ermittelt sind [72].

Ausbildung eines gemischten SAMs verwendet. Es wurde das Verhältnis von Mercaptohexanol zur DNA auf dem Goldsubstrat als Funktion der MgCl_2 -Konzentration untersucht. Die mit Mercaptohexanol bedeckte Fläche und damit auch das Mercaptohexanol/DNA-Verhältnis verkleinert sich mit steigender DNA-Belegungsichte. XPS wurde für die chemische Analyse verwendet. Dazu erfolgte die Bestimmung des Intensitätsverhältnisses λ zwischen den Schwefelsignalen ($\text{S } 2p$) und den Stickstoffsignalen ($\text{N } 1s$) der Photoemission. Photonen der Energie von 510 eV dienten der Anregung dieser Emission. Das Stickstoffsignal stammt ausschließlich von den Nucleobasen der DNA, wobei das Schwefelsignal sowohl vom Mercaptohexanol als auch von der Thiolmodifikation der ODN-Moleküle stammt. Unter der Annahme, dass die Anzahl immobilisierter Mercaptohexanolmoleküle immer deutlich höher ist als die der ODN-Moleküle und bei Berücksichtigung, dass pro Schwefelatom 119 Stickstoffatome im ODN vorhanden sind kann λ zur direkten Bestimmung des molekularen Mercaptohexanol/ODN-Verhältnisses genutzt werden. Die in Abbildung 3.1 dargestellten Ergebnisse zeigen die Erhöhung

der DNA-Belegungsdichte mit steigender MgCl_2 -Konzentration von 0 bis 20 mM MgCl_2 . Durch die Steigerung der MgCl_2 -Konzentration von 20 mM auf 120 mM ändert sich λ kaum. DNA ist ein negativ geladener Polyelektrolyt. Die Assoziation der Kationen verringert die elektrostatische Abstoßung zwischen den Phosphatgruppen der ODN. In Abhängigkeit von der Konzentration und Art der Kationen finden Konformationsänderungen der DNA-Stränge statt [113–116]. Ein Grund dafür ist die Maskierung der negativen Ladung am Phosphatrückgrat der DNA. Damit verbunden ist die Verkleinerung des Gyrationradius, R_g , der Knäuelkonfiguration einzelsträngiger DNA. Dies ermöglicht eine höhere ODN-Dichte auf der Oberfläche, welche proportional zu R_g^{-2} ist [65, 117]. Es ist bekannt, dass Na^+ - und K^+ -Konzentrationen im molaren Bereich zur Steigerung der Belegungsdichte sowie der Immobilisierungs- und Hybridisierungsrate führen [59, 95]. Bei vergleichbaren Konzentrationen sind die Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Effekte sogar deutlich größer. Untersuchungen mit Mg^{2+} -Konzentrationen von 5 mM [118, 119], 20 mM [120, 121] und 100 mM [71] konnten zeigen, dass bereits millimolare Konzentrationen die Dichte der DNA-SAM beträchtlich erhöhen. PETROVYKH *et al.* verglichen CaCl_2 , MgCl_2 , KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , KCl und NaCl als Zusätze bei der Immobilisierung des ODN 5'-HS-(dT)₂₅-3' mittels XPS und Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie. Unter allen getesteten Ionen zeigte der Mg^{2+} -Zusatz mit einer Konzentration von 100 mM den größten Effekt auf die ODN-Belegungsdichte [71]. In der vorliegenden Arbeit werden systematische Daten für die Abhängigkeit der Sondendichte von der Mg^{2+} -Konzentration präsentiert [72]. Auf dieser Grundlage werden die Immobilisierungsparameter für den Aufbau der DNA-Mikroarrays gewählt.

3.2 Linearität und Empfindlichkeit des SPR-Sensors

Um die Linearität und Empfindlichkeit des SPR-Sensors zu testen, wurde die Abhängigkeit der SPR-Signale von der Konzentration wässriger MgCl_2 -Lösungen bei einer Temperatur von 25 °C untersucht (Abbildung 3.2). Es zeigt sich eine sehr gute Linearität des SPR-Signals (Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,9986$) und es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den drei unterschiedlichen Messkanälen beobachtet. Die Stabilität des Systems wurde dadurch bestätigt, dass bei der Messung mit reinem Wasser vor und nach der Konzentrationsreihe die Signale reproduzierbar waren. Diese Signale variierten um etwa 1 Pixel. Es wurde damit ein linearer Zusammenhang zwischen der Analytkonzentration und dem SPR-

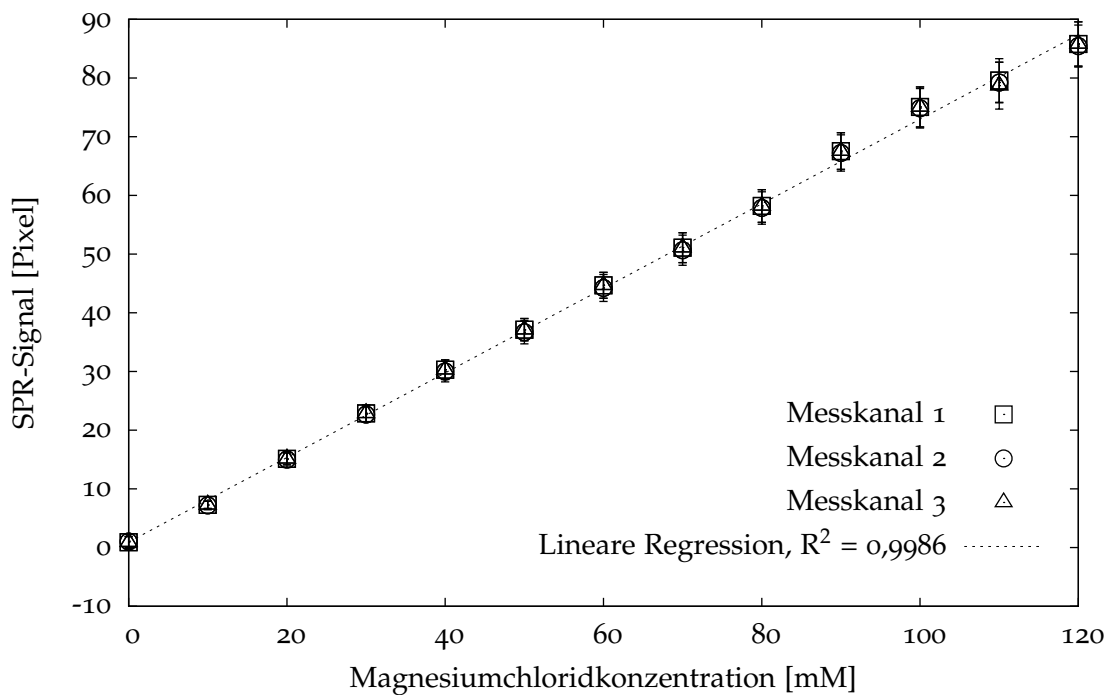


Abbildung 3.2: Abhängigkeit der SPR-Signale von der MgCl_2 -Konzentration. Mittelwerte und Standardabweichungen der SPR-Signale über 1280 Pixel pro Messkanal. Der erste Wert für reines Wasser wurde zur Referenzierung von allen anderen subtrahiert. Der Wert einer Kontrollmessung am Ende der Konzentrationsreihe bezieht sich auf reines Wasser. Das Bestimmtheitsmaß R^2 und die lineare Regression sind für die Messwerte aller Messkanäle zusammen angegeben.

Signal gezeigt, was eine Voraussetzung für die Auswertung weiterer Experimente darstellt.

3.3 Vorversuche: DNA-Mikroarrays auf SPR-Chips

3.3.1 Blocken und unspezifische Adsorption

Die Notwendigkeit des Blockens der freien Goldoberfläche auf dem SPR-Sensor konnte durch Experimente gezeigt werden, bei denen die Beschichtung mit Mercaptohexanol mittels SPR verfolgt wurde. Nach dem Auftragen der Sondenlösungen wurde dazu ein DNA-Mikroarray direkt mit einer ethanolischen Lösung des 11-Mercapto-1-undecanols (MCU) bei einer Konzentration von 10 mM für 1 h behandelt. Dabei wurde die freie Goldoberfläche durch einen SAM aus MCU geblockt. Auf den Sondenorten mit den Rückständen wurde die Sonden-DNA ausgefällt, weil sie nicht in Ethanol löslich ist. Dadurch konnte MCU die unspezifisch adsorbierte DNA nicht ersetzen und die entsprechende Goldoberfläche wurde nicht geblockt. Der Chip wurde danach mit entionisiertem Wasser gespült und für die SPR-Messung, bei einer Temperatur von 40 °C, in das Spektrometer eingebaut. Als Referenz dienten Flächen, die nur mit MCU behandelt wurden. Danach wurde mit 0,1 M Na₂EDTA, 0,1 M NaOH und 10 mM MCH gespült. Während der gesamten Messung verschieben sich die SPR-Minima der Referenz um etwa ± 5 Pixel. Aus Abbildung 3.3 kann entnommen werden, dass die Signale auf den Spots, die mit Sonden-DNA funktionalisiert sind, sinken. Es kann somit geschlussfolgert werden, dass eine Desorption der unspezifisch adsorbierten DNA-Sonden stattfindet. Zunächst werden Magnesiumionen, die an der Sonden-DNA sein können, durch EDTA komplexiert. Dadurch werden mögliche doppelsträngige und elektrostatisch adsorbierte DNA-Strukturen [122] destabilisiert, weil die elektrostatische Abstoßung der DNA-Einzelstränge nicht mehr durch Mg²⁺ kompensiert wird. Als Konsequenz sinkt das SPR-Signal um etwa 5 Pixel. Ein ähnlicher Effekt kann beobachtet werden, wenn anschließend mit NaOH gespült wird. Der hohe pH-Wert führt dazu, dass Wasserstoffbrücken zwischen den Nucleinbasen aufgelöst werden und weitere unspezifisch adsorbierte DNA entfernt wird. Folglich sinkt das Signal um weitere 7 Pixel. Eine deutlich größere Desorption wird beim Spülen mit MCH beobachtet. Das SPR-Minimum verschiebt sich um etwa 24 Pixel zu niedrigeren Werten, da das im Wasser gelöste MCH eine Schwefel-Gold-Bindung ausbildet,

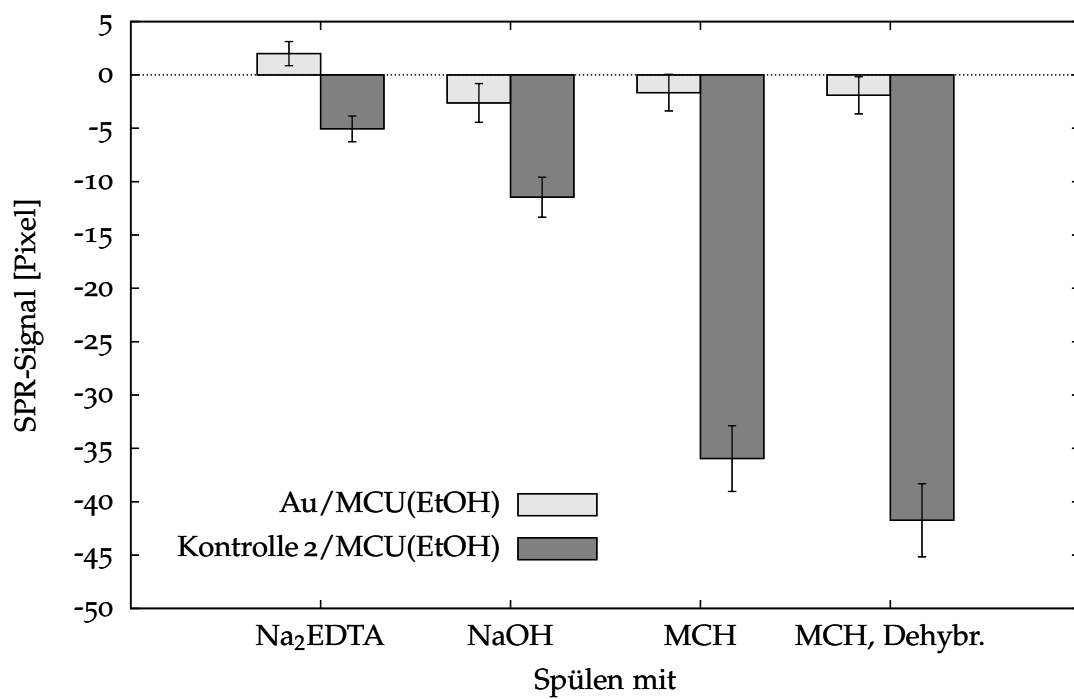


Abbildung 3.3: SPR-Signale beim Blocken gegen unspezifische Adsorption. Mittelwerte und Standardabweichungen der SPR-Signals dreier Messkanäle. Der erste Wert für reines Wasser wurde zur Referenzierung aller anderen Werte subtrahiert.

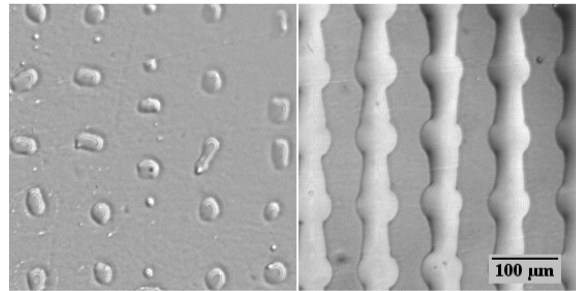


Abbildung 3.4: Mikroskopische Aufnahme der Rückstände nach dem Auftragen der Immobilisierungslösungen ohne Glycerin (links) und mit 5 % Glycerin (rechts). Der Pitch zwischen den Spots (P_s) beträgt 100 µm. Beim zweiten Pipettierdurchgang wird um 50 µm entlang der Linien versetzt.

welche stabiler ist als die adsorptive Bindung der Nucleobasen auf Gold. Die Sonden-DNA wird aufgerichtet, die unspezifische Adsorption wird verhindert und die spezifische Hybridisierung mit komplementärer Ziel-DNA ermöglicht. Bei Wiederholung der Spülvorgänge kommt es zur weiteren Desorption, welche ein Sinken des SPR-Signals um etwa 6 Pixel zur Folge hat. Danach stabilisiert sich das SPR-Signal. Das Blocken ist daher essentiell für die Anwendung der DNA-Mikroarrays auf Gold.

3.3.2 Glycerin als Additiv zur Immobilisierungslösung

Verschiedene Glycerinkonzentrationen werden getestet, um die Immobilisierung mittels eines Mikropipettiersystems zu optimieren. Glycerin verbessert als ein viskoser Zusatz die Stabilität der Linienform der Sondenorte und fixiert die Tropfen auf der Goldoberfläche. Der Zusatz von 5 % Glycerin in der Immobilisierungslösung hat einen deutlichen Effekt sowohl auf die Morphologie als auch auf die Homogenität der linienförmigen Sondenorte (Abbildung 3.4). Mit der optimierten Glycerinkonzentration haben die Tropfen einen Kontaktdurchmesser von etwa 70 µm. Dies ermöglicht einen Pitch von 100 µm.

3.3.3 Einfluss der TAG/Anti-TAG-Sequenzen auf SPR-Signale

Des Weiteren wurde untersucht, welcher Zusammenhang zwischen der Signalstärke und den TAG/Anti-TAG-Sequenzen bei der Detektion der Hybridisierung besteht. Auf den Spots mit den Anti-TAGs 4, 5, 12 und 15 sind die SPR-Signale

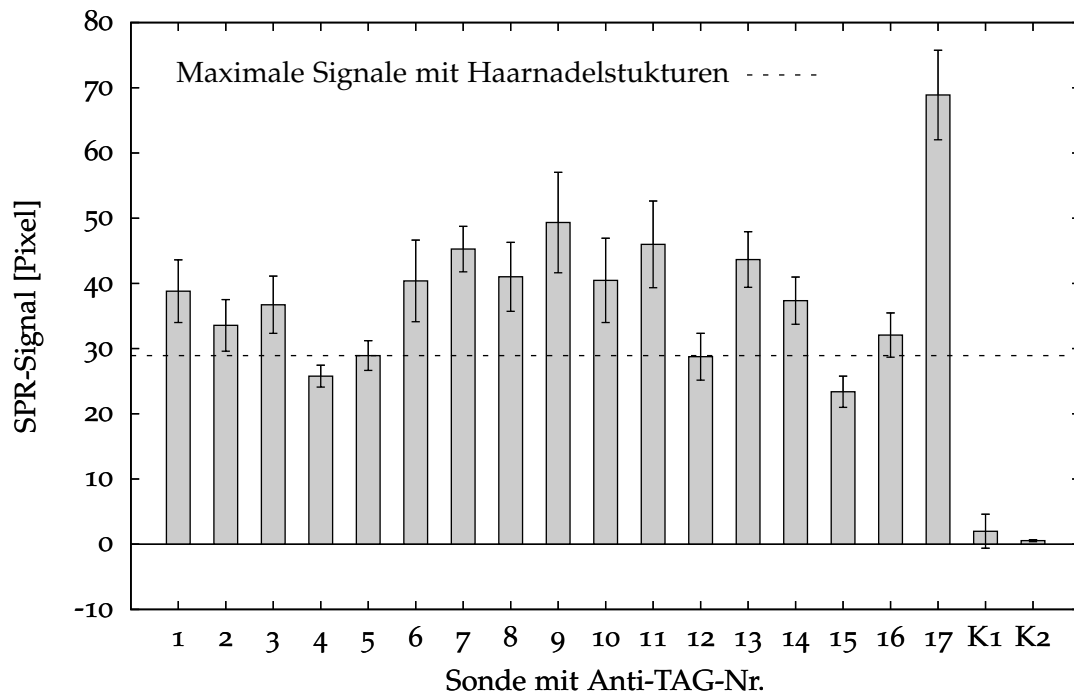


Abbildung 3.5: Einfluss der TAG/Anti-TAG-Sequenzen auf die Signalstärke. SPR-Signale nach 10 min Hybridisierung mit PCR-Produkten einer Konzentration von 5 ng/ μ l auf einem Mikroarray. Mittelwerte und Standardabweichungen auf je 9 Spots eines Chips. Unter der gestrichelten Linie liegen auffällig niedrige Signale. Referenziert gegen Spots mit nichtkomplementärer Kontrollsonde (Kontrolle 3). Die Signale auf den Sondenorten mit Kontrolle 1 (K1) und Kontrolle 2 (K2) sind gezeigt.

deutlich niedriger (< 29 Pixel) im Vergleich zu den anderen Sonden des Arrays (Abbildung 3.5). Analysiert man die Sequenzen der Anti-TAGs, so stellt man fest, dass bei den Anti-TAGs 4, 5, 12 und 15 Haarnadelstrukturen möglich sind, welche mit der Hybridisierung der PCR-Produkte konkurrieren (Tabelle 2.2). Dieses Experiment zeigt, dass weitere Untersuchungen zur Sequenzabhängigkeit der Hybridisierungseffizienz bzw. der SPR-Signale notwendig sind. Trotzdem kann man im Fluoreszenzbild deutlich die Form der Sondenorte erkennen, auf denen die PCR-Produkte spezifisch gebunden haben. Auf den Sondenorten mit den nichtkomplementären Kontrollsequenzen ist entsprechend kaum ein Fluoreszenzsignal zu erkennen (Abbildung 3.6). Die SPR-Signale wurden gegen Sondenorte referenziert, auf denen keine spezifische Hybridisierung stattfinden kann. Signalschwankungen, die aus Druck- und Temperaturänderungen resultieren, werden dadurch minimiert. Es finden spezifische Hybridisierungen auf den erwarteten Sondenorten statt. Die Spots sind deutlich voneinander getrennt aufgebracht. Es können keine Kreuzhy-

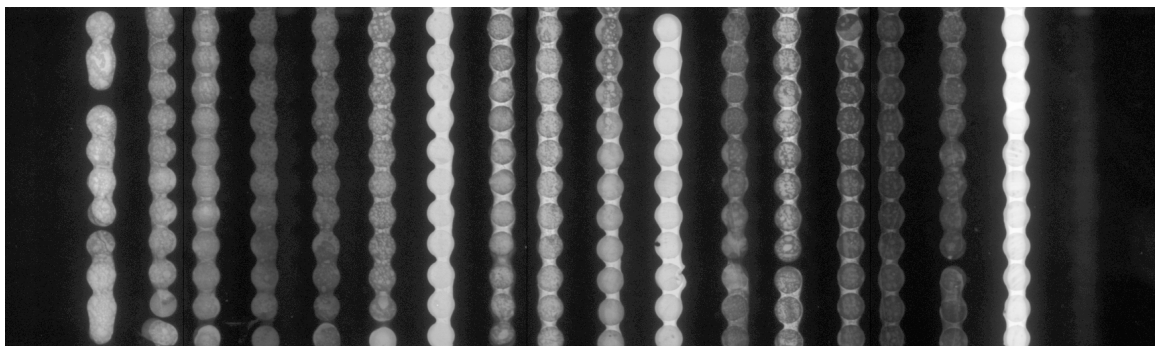


Abbildung 3.6: Zusammenstellung der Fluoreszenzbilder auf einem DNA-Mikroarray nach der Hybridisierung und Einfärbung mit YOYO[®]-1-iodid. Nur die Spots mit den spezifisch gebundenen PCR-Produkten fluoreszieren hell. Die Kontroll-Spots mit nichtkomplementären Sonden bleiben dunkel. Die Reihenfolge der Spots ist von links nach rechts eine dreifache Wiederholung der Sonden: Kontrolle 1, Anti-TAG₁ bis 17, Kontrolle 2 und 3. Nur ein Drittel gezeigt. Die Bildhöhe entspricht etwa 770 µm und der Pitch zwischen den linienförmigen Sondenorten etwa 140 µm.

bridisierungen mit Signalstärken größer als 5 Pixel beobachtet werden. Die hier gefundenen Parameter der Immobilisierung bilden die Basis für die nachfolgenden Experimente der vorliegenden Arbeit.

3.4 Optimierung der Immobilisierungslösung

Weiterführend wurden Experimente zur Hybridisierung auf Mikroarrays durchgeführt, auf welchen unterschiedliche Konzentrationen des MgCl_2 und Sonden-DNA verwendet wurden. Außerdem wurden Glycerin und DMSO als Additive getestet, um homogene, streifenförmige Sondenorte zu erzielen [16, 112]. Einen entscheidenden Einfluss auf die SPR-Signalhöhe und die Hybridisierungskinetik hat die Oberflächenkonzentration der Sonden-DNA, wodurch auch die Nachweisgrenze bei der Detektion komplementärer Ziel-DNA bestimmt wird [95]. In Abbildung 3.7 ist die Optimierung der Zusammensetzung der Sondenlösung bezüglich der MgCl_2 -Konzentration und des Pitch innerhalb der Spot-Linien, P_l , dargestellt (siehe Kapitel 2.6.2). Darin bestätigt sich der gleiche Trend, der auch in den XPS-Experimenten beobachtet wurde (Kapitel 3.1). Durch MgCl_2 in der Immobilisierungslösung lässt sich die Sondendichte steigern, was zu einer höheren Dichte des an der Oberfläche hybridisierten PCR-Produkts führt. In Übereinstimmung mit den XPS-Experimenten (siehe Abbildung 3.1) ist diese Steigerung bis zu 20 mM MgCl_2 deutlich, so dass

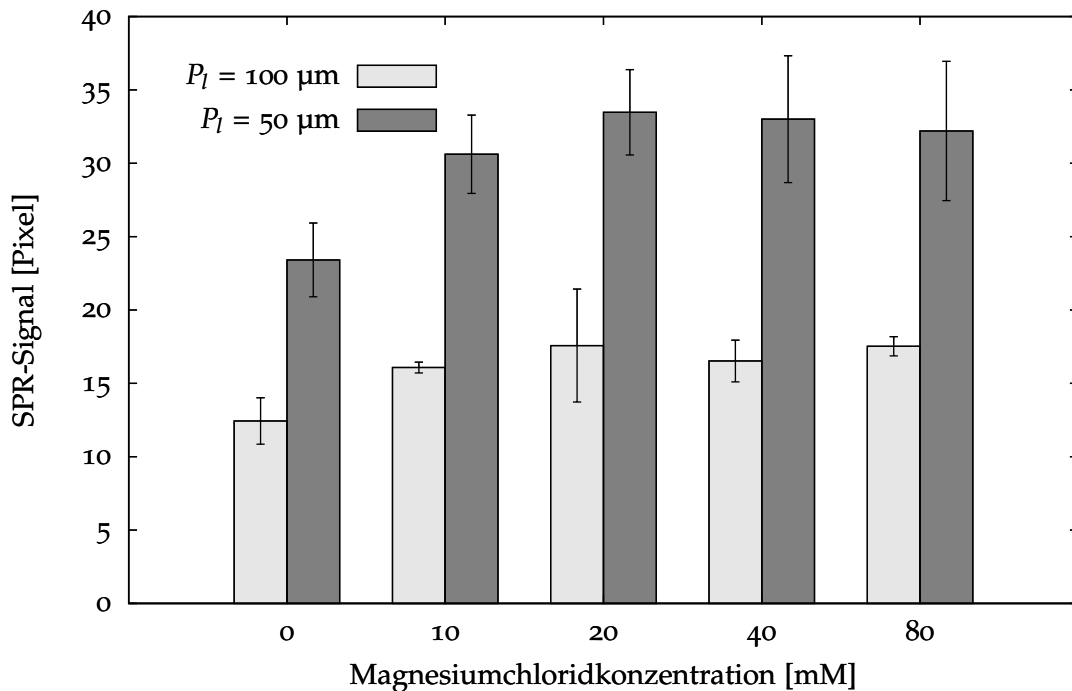


Abbildung 3.7: Abhängigkeit der Hybridisierungssignale von der MgCl_2 -Konzentration in der Immobilisierungslösung und vom Pitch innerhalb der Spot-Linien, P_l .

eine weitere Erhöhung der Salzkonzentration keine signifikante Steigerung der SPR-Signale zur Folge hat. Damit zeigt sich die Schlüsselrolle der Sondendichte für hohe SPR-Signale bei der Detektion der Hybridisierungen auf SPR-Chips. Dieser Zusammenhang wird ebenfalls deutlich aus Abbildung 3.8 zur Abhängigkeit der SPR-Signale von der Sondenkonzentration in der Immobilisierungslösung und beim Vergleich des P_l . Höhere SPR-Signale sind auf Sondenorten zu registrieren, auf denen die Immobilisierung mit höherer Sondenkonzentration durchgeführt wurde. Eine Sättigung konnte in diesen Experimenten nicht beobachtet werden. Daher ist hier anzunehmen, dass die Sondendichte auf der Sensoroberfläche der limitierende Faktor ist. Weiterhin wird deutlich, dass auf Sondenorten mit halbem P_l etwa doppelt so hohe Signale erreicht werden. Dieses Ergebnis ist zu erwarten, weil bei halbem P_l die doppelte Menge an Sonden-DNA pro Messkanal gebunden werden kann und damit ein doppelt so großes Signal bei der Hybridisierung resultiert. Das gleiche ist der Abbildung 3.9 zur Untersuchung der Glycerin- bzw. der DMSO-Zusätze in der Immobilisierungslösung zu entnehmen. Hier kann zusätzlich gezeigt werden, dass durch Glycerin bzw. DMSO das schnelle Eintrocknen verhindert wird und durch die höhere Viskosität sowie bessere Benetzung im Ver-

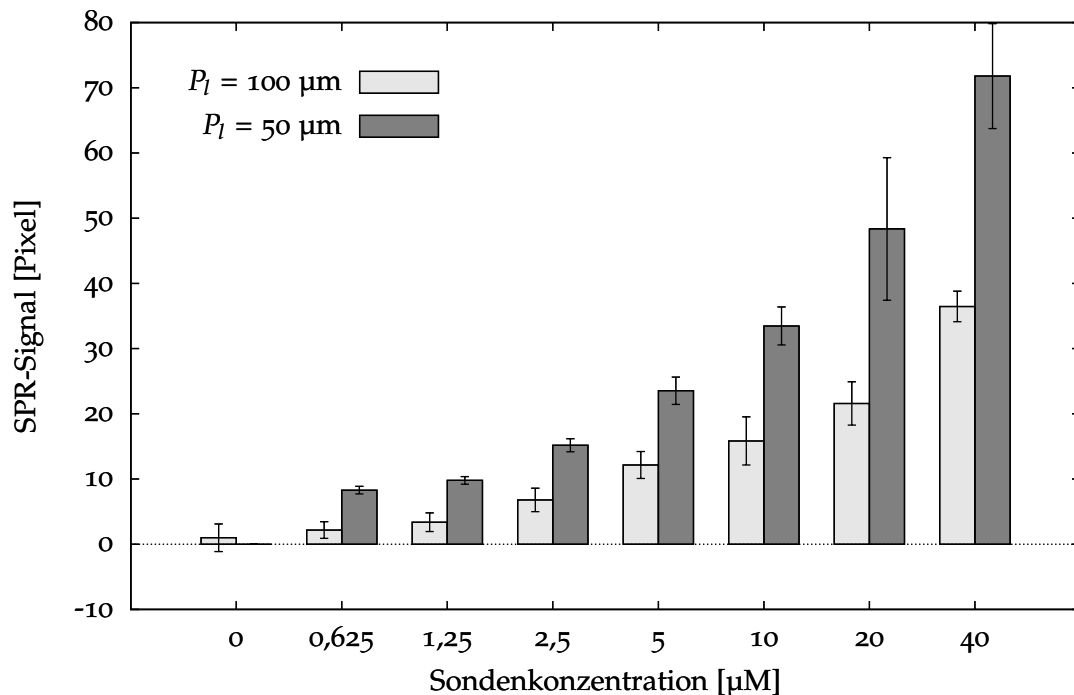


Abbildung 3.8: Abhängigkeit der Hybridisierungssignale von der Sondenkonzentration in der Immobilisierungslösung und vom Pitch innerhalb der Spot-Linien, P_l .

gleich zu rein wässrigen Lösungen eine homogenere Funktionalisierung möglich ist. Der Aufbau der Mikroarrays wird dadurch erleichtert, dass die Haftung der Tropfen verbessert wird und eine Kontamination mit benachbarten Sonden durch das Zusammenlaufen verhindert wird. Dies ist in Abbildung 3.10 dargestellt. Auf dem Sondenort, auf dem die Immobilisierungslösung kein Glycerin enthält, sind die Tropfen paarweise ineinander geflossen.

3.5 Einfluss der PCR-Produktkonzentration auf SPR-Signale

Es werden Hybridisierungen mit aufsteigender PCR-Produktkonzentration und 300bp langen PCR-Produkten durchgeführt. Die SPR-Signale steigen mit steigender PCR-Produktkonzentration (Abbildung 3.11). Eine lineare Regression wurde mit den Signalen für die PCR-Produktkonzentrationen bis 2,5 ng/µl durchgeführt. Die Regressionsgerade wurde durch den Koordinatenursprung gelegt. Die Bestimmtheitsmaße (R^2) sind in beiden Fällen 0,99. Diese Daten deuten auf einen

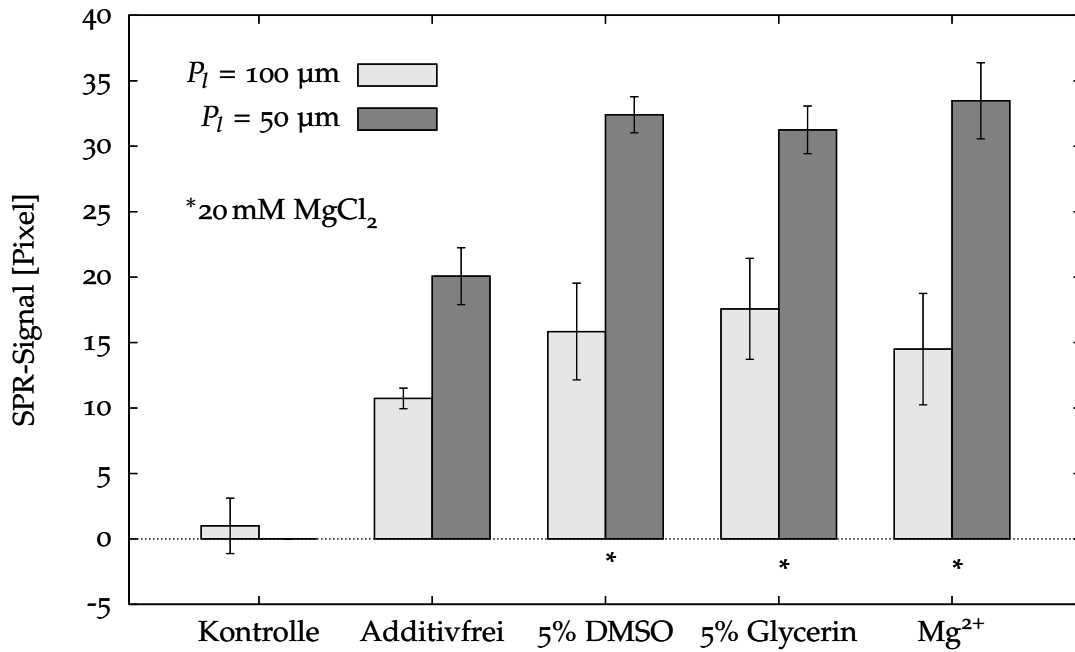


Abbildung 3.9: Abhängigkeit der Hybridisierungssignale von den Additiven in der Immobilisierungslösung und vom Pitch innerhalb der Spot-Linien, P_l . Referenziert gegen eine geblockte Goldoberfläche. Das Signal auf dem Sondenort mit Anti-TAG13 als Kontrolle ist gezeigt.

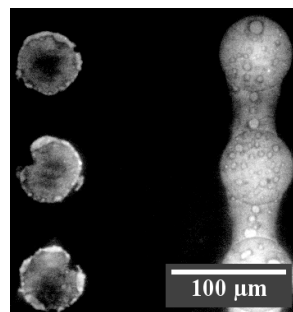


Abbildung 3.10: Fluoreszenzbild zur Untersuchung des Glycerins als Zusatz auf zwei Spots funktionalisiert mit $10 \mu\text{M}$ einer thiolmodifizierten Sonde ohne Zusätze (links) und mit 5 % Glycerin sowie 20 mM MgCl_2 (rechts). Der Pitch innerhalb der Linien, P_l , beträgt auf beiden Sondenorten $50 \mu\text{m}$. Auf dem linken Sondenort sind die Tropfen paarweise ineinander geflossen.

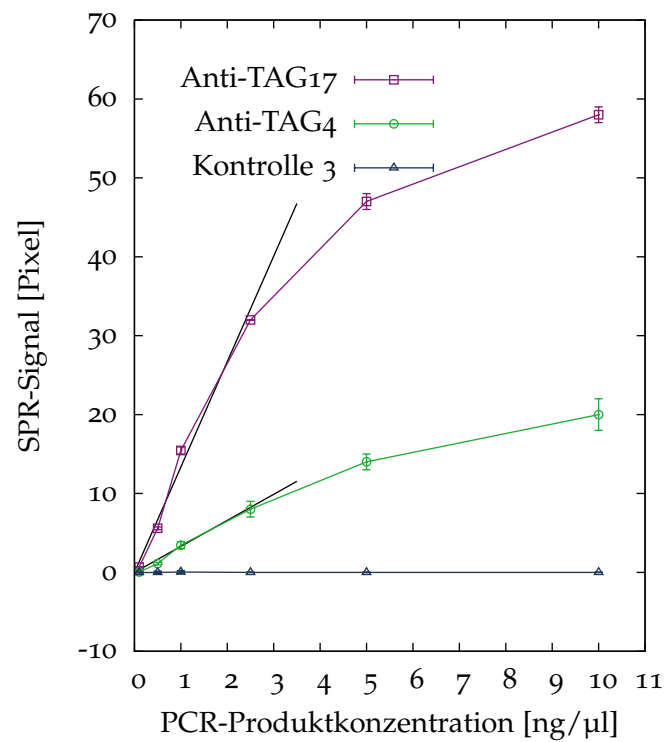


Abbildung 3.11: SPR-Signale nach Hybridisierungen mit steigenden Konzentration der 300 bp langen PCR-Produkte. Die schwarzen Linien repräsentieren lineare Regressionen mit dem Schnittpunkt im Koordinatenursprung und den PCR-Produktkonzentrationen bis 2,5 ng/µl. Standardabweichungen und Mittelwerte aus 30 Spots.

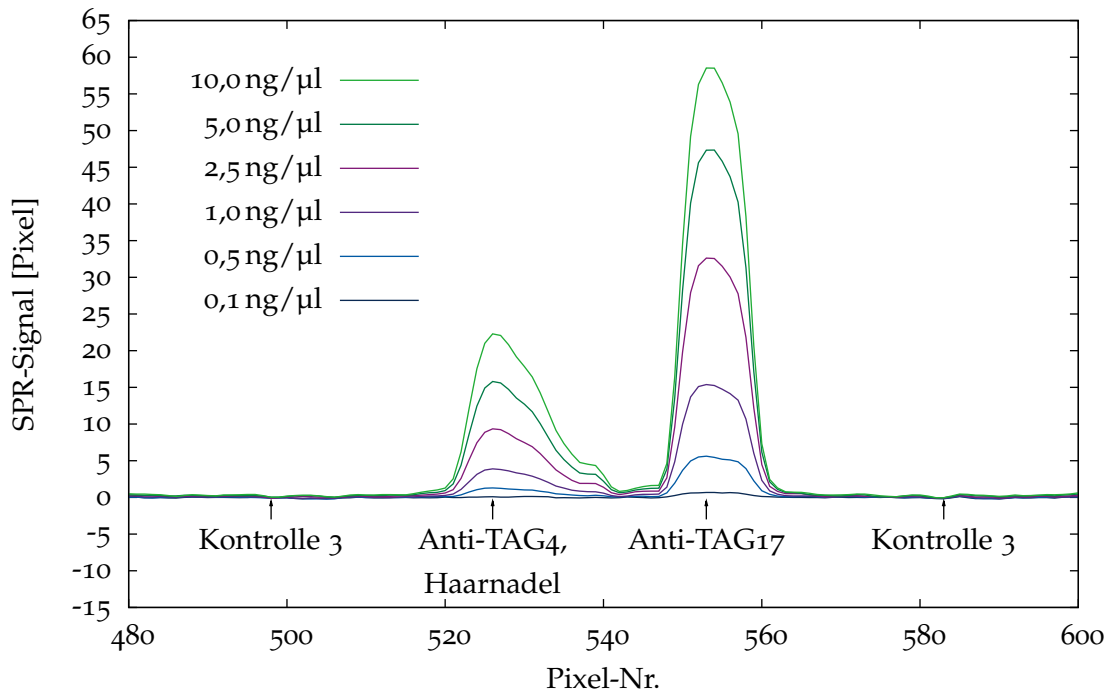


Abbildung 3.12: Örtliche Auflösung der SPR-Signale auf vier ausgewählten Sondenorten eines DNA-Mikroarrays. Die Peaks entstehen nach der Hybridisierung mit unterschiedlichen Konzentrationen der 300 bp langen PCR-Produkte.

linearen Zusammenhang zwischen der PCR-Produktkonzentration und den SPR-Signalen hin, wenn die Konzentration unter $2,5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ liegt. Sondenorte mit dem Anti-TAG₄ zeigen Signale, die um das Drei- bis Fünffache niedriger sind als auf den Sondenorten des Anti-TAG₁₇. Auf den Spots der Kontrollsonde ist keine Kreuzhybridisierung feststellbar. Die örtliche Auflösung der Spots auf der Sensoroberfläche ist durch die Peaks erkennbar, die durch die Hybridisierung auf den komplementären Sondenorten entstehen. In Abbildung 3.12 ist die örtliche Verteilung der Hybridisierungssignale über vier Spots des Mikroarrays gezeigt. Eine Überlappung der Peaks tritt nicht auf. Die Untersuchung einer 10 min langen Hybridisierung, bei unterschiedlichen PCR-Produktkonzentrationen, ergibt eine Nachweisgrenze von $0,5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ($2,6 \text{ nM}$) des PCR-Produkts. Die Annahme eines linearen Zusammenhangs zwischen der PCR-Produktkonzentration und den SPR-Signalen ist für Konzentrationen bis $2,5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ wird durch $R^2 = 0,99$ unterstützt. Dies kann unter folgenden Voraussetzungen:

- Die Hybridisierung hat ein Gleichgewicht erreicht.
- Die Hybridisierungsisothermen können durch eine einfache Langmuir-Ad-

sorptionisotherme beschrieben werden.

- Die unspezifische Adsorption kann vernachlässigt werden.
- Die Konzentration des PCR-Produkts in der Lösung ist nicht zu hoch verglichen mit der Konzentration, bei der die Hälfte der Sonden hybridisiert ist [97, 123].

Nur in einigen der Experimente mit 300 bp langen PCR-Produkten wurde das Gleichgewicht nicht voll erreicht. Die restlichen drei Bedingungen sind immer erfüllt. Daher kann angenommen werden, dass das SPR-Signal in erster Näherung proportional zur hybridisierten Menge im Gleichgewicht an der Sensoroberfläche ist. Nach einer geeigneten Kalibrierung kann eine quantitative Auswertung der Hybridisierung zur Bestimmung der PCR-Produktkonzentration vorgenommen werden. Diese Methode hat gegenüber einer Messung der UV-Absorption oder einer Elektrophorese den Vorteil, dass Mischungen verschiedener PCR-Produkte mit ähnlichen oder gleichen Längen nebeneinander quantifiziert werden können.

3.6 Einfluss der PCR-Produktlänge auf SPR-Signale

Der Einfluss der PCR-Produktlänge wurde durch die Hybridisierung mit 60, 100 oder 300 bp langen PCR-Produkten untersucht (Abbildung 3.13). In Abbildung 3.14 sind die SPR-Signale relativ zum Maximum der erreichten Signale nach 10 min Hybridisierung auf den jeweiligen Spots dargestellt. Längere PCR-Produkte zeigen eine geringere Hybridisierungsrate als kürzere. Jedoch sind die absoluten Signale mit längeren PCR-Produkten höher als mit kürzeren PCR-Produkten. Dies tritt auf den Anti-TAG₄-Sondenorten nach 5 min und auf den Anti-TAG₁₇-Sondenorten nach 2 min ein. Die Verschiebung der SPR-Minima auf den Spots mit Anti-TAG₄ sind drei- bis vierfach geringer als auf Spots mit Anti-TAG₁₇. Es konnte wieder keine Kreuzhybridisierung auf Spots mit der nichtkomplementären Kontrollsonde detektiert werden ($0,1 \pm 0,1$ Pixel). Die PCR-Produkte mit 300, 100 oder 60 bp bei 5 ng/ μ l entsprechen den Stoffmengenkonzentrationen von 26, 72 bzw. 112 nM. Eine schnellere Hybridisierung der kürzeren PCR-Produkte zu Beginn ist auf ihre höhere molare Konzentration zurückzuführen (Abbildung 3.14). Außerdem ist der höhere Diffusionskoeffizient kleinerer Moleküle die mögliche Ursache für die schnellere Gleichgewichtseinstellung bei der Hybridisierung. Trotzdem führen

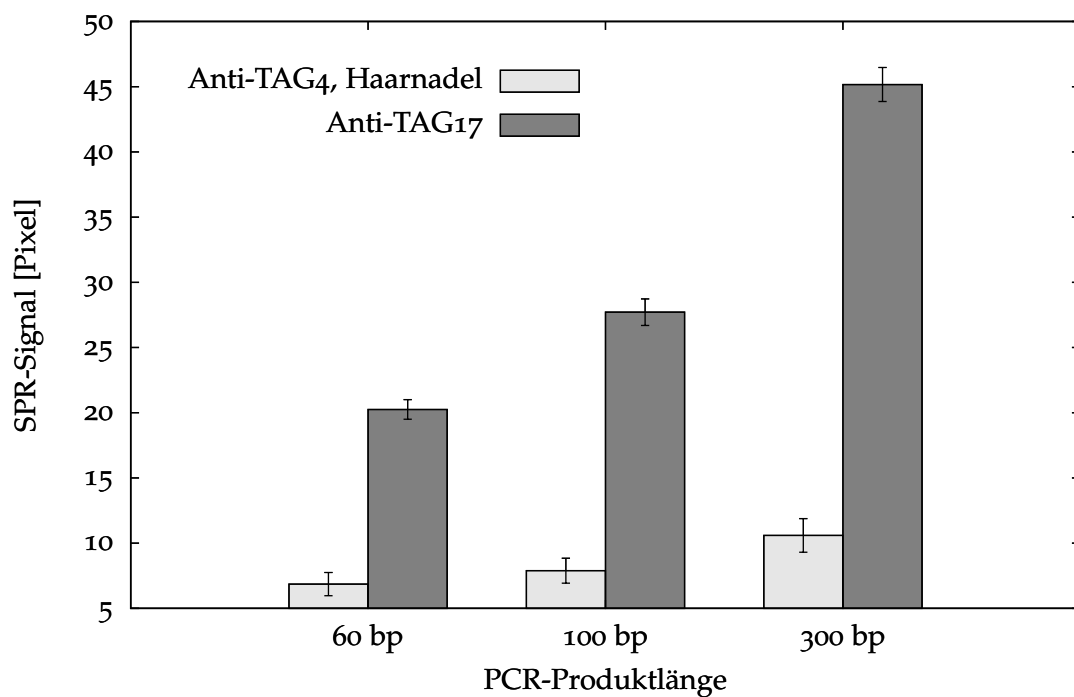


Abbildung 3.13: SPR-Signale nach der Hybridisierung mit 60, 100 oder 300 bp langen PCR-Produkten. Mittelwerte und Standardabweichungen auf 30 Spots. Keine Kreuzhybridisierung auf Spots mit der nichtkomplementären Kontrollsonde: $0,1 \pm 0,1$ Pixel. Mittelwert und Standardabweichung aus 90 Einzelwerten.

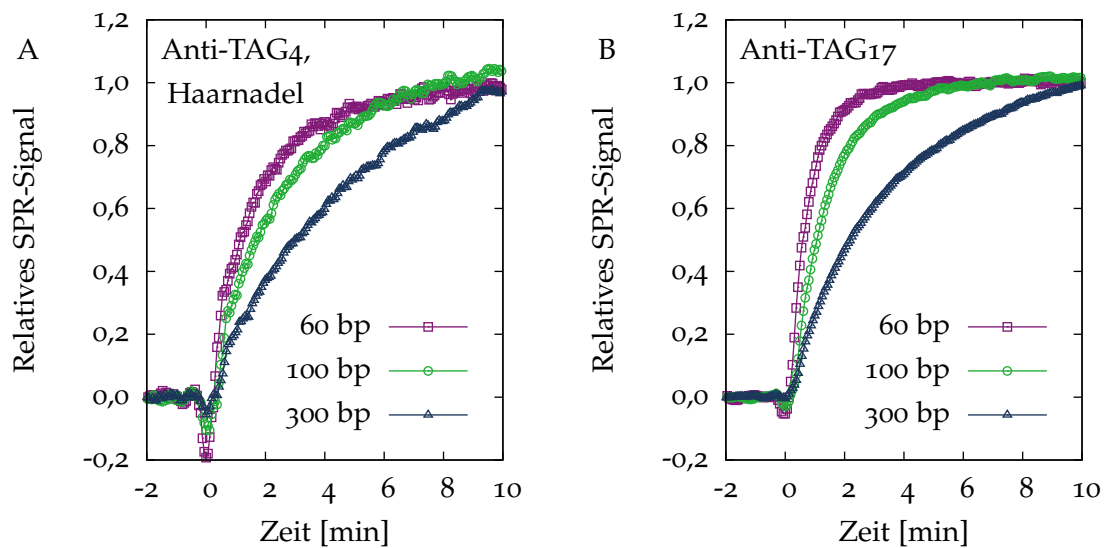


Abbildung 3.14: Kinetik der relativen SPR-Signale bei der Hybridisierung mit 60, 100 oder 300 bp langen PCR-Produkten auf Spots mit Anti-TAG4 (A) und Anti-TAG17 (B). Anti-TAG4 ermöglicht die Bildung der Haarnadelstrukturen. Die SPR-Signale nach 10 min Hybridisierung wurden auf 1 gesetzt.

längere PCR-Produkte zur dichteren Packung der DNA auf der Oberfläche, was eine höhere Änderung des Brechungsindex bzw. der SPR-Signale zur Folge hat (Abbildung 3.13). Folglich kann eine niedrigere Nachweisgrenze erreicht werden, wenn längere PCR-Produkte verwendet werden.

3.7 Einfluss der Haarnadelstrukturen auf SPR-Signale

Die geringeren Hybridisierungsgeschwindigkeiten und niedrigere SPR-Signale auf Spots mit der Anti-TAG₄-Sonde im Vergleich zur Anti-TAG₁₇-Sonde (Abbildung 3.14) stimmen mit Berichten überein, die sich mit sogenannten *Molecular Beacons*⁽¹⁶⁾ beschäftigen [124–126]. Die Bildung der Haarnadelstrukturen in DNA-Sonden durch die intramolekulare Faltung komplementärer Bereiche der DNA-Einzelstränge steht im Gleichgewicht zum Entfalten und zur Hybridisierung mit der komplementären Ziel-DNA. Trotz höherer Selektivität der Haarnadelstrukturen gegenüber ihren komplementären Sequenzen, sind Sekundärstrukturen bei Sonden nicht erwünscht, wenn schnelle Hybridisierungen auf DNA-Mikroarrays detektiert werden sollen. Daher gibt es theoretische Arbeiten zum Entwurf der Sonden mit ähnlichen Schmelztemperaturen bzw. mit ähnlichem GC-Gehalt, mit möglichst wenigen Kreuzhybridisierungen und Sekundärstrukturen [127, 128]. Nur wenn diese Kriterien beim Entwurf der DNA-Sequenzen berücksichtigt werden, kann ein Mikroarray mit zufriedenstellender Qualität und guter Vergleichbarkeit aller Spots hergestellt werden.

3.8 Spezifität des TAG/Anti-TAG-Systems

Die SPR-Signale jeder der 135 Spots wurden in Echtzeit aufgezeichnet und analysiert. In Abbildung 3.15 sind die Endwerte der Hybridisierung nach 6 min bei einer Flussrate von 20,6 mm/s (7,4 µl/s) gezeigt. Die Spots, welche nur mit Mercaptohexanol beschichtet sind, werden als Referenz verwendet. Folglich können die unspezifische Adsorption und die Kreuzhybridisierung unterschieden werden, wenn das Blocken entsprechend durchgeführt wurde und die PCR-Produkte nur mit den Sonden wechselwirken und nicht mit der geblockten Oberfläche. Bereits 6 min nach Beginn der Hybridisierung können deutliche SPR-Signale ausgewertet

⁽¹⁶⁾ engl. für „molekulare Leuchtfeuer“, spezielle DNA-Haarnadelstrukturen als Fluoreszenzsonden

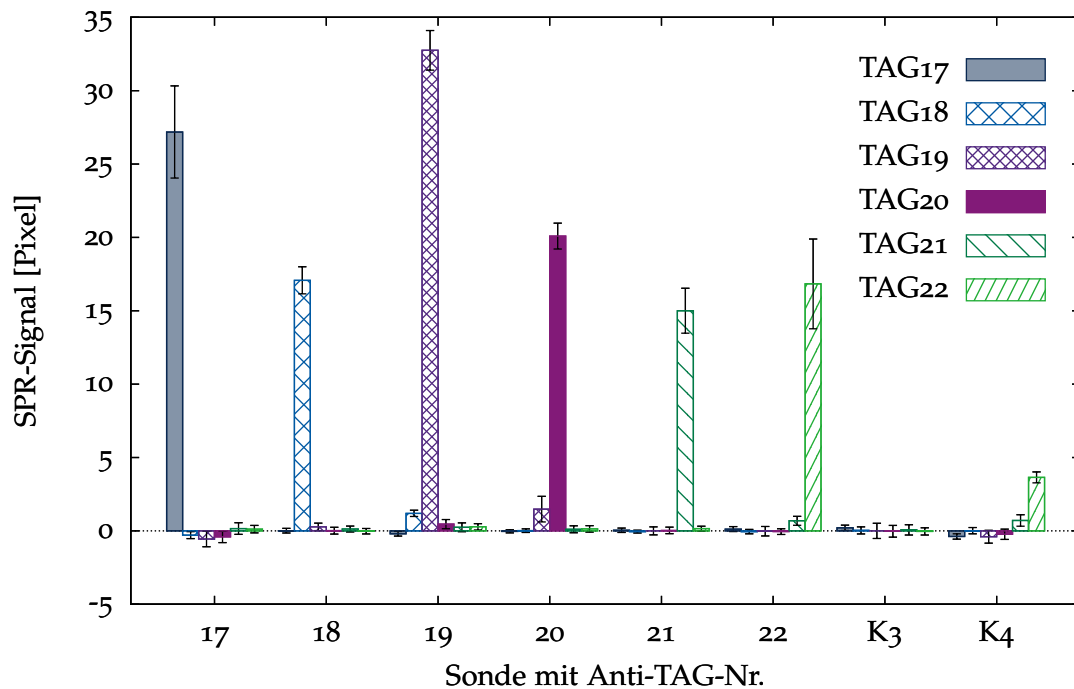


Abbildung 3.15: Test auf Kreuzhybridisierungen. SPR-Signale auf dem Mikroarray eines TAG/Anti-TAG-Systems nach der Hybridisierung mit PCR-Produkten. Nach jeder der sechs Hybridisierungen (6 min mit 1 ng/ μ l PCR-Produkt) wird dehybridisiert. Kontrolle 3 (K3) ist nicht komplementär zu allen TAGs. Kontrolle 4 (K4) zeigt eine Kreuzhybridisierung mit TAG22. Die Mittelwerte der Signale auf den Spots, die nur mit Mercaptohexanol beschichtet sind, dienen als Referenz und werden von allen anderen Signalen subtrahiert.

Tabelle 3.1: TAG/Anti-TAG-System mit Kreuzhybridisierungen. Identische Sequenzen der Länge von 7 Basen. Die komplementären Teile sind unterstrichen. Eine Kreuzhybridisierung wurde zwischen TAG22 und Kontrolle 4 beobachtet, jedoch nicht zwischen TAG21 und Anti-TAG20 (Kleinbuchstaben).

Name	Sequenz
	5'→3'
TAG ₁₇	CGAGACCTTATTCTGGAGAGCCTAT
TAG ₁₈	GAGCGTCCGTGTTGTGTAGTGATAA
TAG ₁₉	AACAGAAGACACCGAGCATAGATAC
TAG ₂₀	GCGTAGAGTTTATTTAGGTGGACAA
TAG ₂₁	ATCTCATCTGT <u>Tagcgtag</u> GTGTAGC
TAG ₂₂	AACGGAAAGCAGTA <u>ATCGGTCTAAC</u>
	5'→3'-TTTTTTT-(CH ₂) ₃ -SH
Anti-TAG ₁₇	ATAGGCTCTCCAGAATAAGGTCTCGT
Anti-TAG ₁₈	TTATCACTACACAACACGGACGCTCT
Anti-TAG ₁₉	GTATCTATGCTCGGTGTCTTCTGTTT
Anti-TAG ₂₀	TTGTCCACCTAAATAAACT <u>ctacgct</u>
Anti-TAG ₂₁	GCTACAC <u>ctacgct</u> ACAGATGAGATT
Anti-TAG ₂₂	GTTAG <u>ACCGATT</u> ACTGCTTTCCGTTT
Kontrolle 3	CTATCTAGCATGCCTATCAGCGTTGT
Kontrolle 4	TCAC <u>ACCGATT</u> CTCATAGTAACGCCT

werden. Der Fokus in diesen Untersuchungen liegt auf der Spezifität des TAG/Anti-TAG-Systems. Es treten keine unerwarteten Kreuzhybridisierungen auf. Nur die Kontrolle 4 zeigt eine Kreuzhybridisierung mit dem TAG₂₂-PCR-Produkt. Dies lässt sich auf ihre 7 Basen langen, komplementären Sequenzen zurückführen (Tabelle 3.1). Es fällt jedoch auf, dass keine Kreuzhybridisierung zwischen TAG₂₁-PCR-Produkt und Anti-TAG₂₀-Sonde beobachtet wird, obwohl bei den entsprechenden Sequenzen auch 7 Basen lange komplementäre Bereiche auftreten. Der Unterschied liegt hier in der Position der komplementären Sequenz. Bei Anti-TAG₂₁ liegt diese Sequenz näher an der Sensoroberfläche, als es bei Kontrolle 4 der Fall ist. Die Hybridisierung an der Oberfläche ist in diesem Fall wahrscheinlich so stark sterisch gehindert, dass keine Bindung des TAG₂₁-PCR-Produktes mit der Anti-TAG₂₀-Sonde detektiert werden kann [93, 98, 100, 101, 129]. Eine Kreuzhybridisierung zwischen TAG₂₀-PCR-Produkt und Anti-TAG₂₁ wird ebenfalls nicht beobachten, weil in diesem Fall der analoge Sequenzbereich nur aus 6 Basen besteht. Die unterschiedlichen Signalhöhen auf den verschiedenen Spots sind möglicherweise auf Unsicherheiten bei der Bestimmung der PCR-Produktkonzentration zurückzuführen.

ren, da nur kleine Mengen der PCR-Produkte zur Verfügung standen und die Endkonzentration mit 1 ng/ μ l relativ gering war.

3.9 Hybridisierungskinetik und Massentransport

Es wird angestrebt, möglichst hohe Signale mit einer minimalen Probenmenge zu erreichen. Dazu muss die Mikrofluidik den Diffusionsweg bzw. die Transportlimitation des Analyten zu den immobilisierten Sonden minimieren. Eine analytische Behandlung dieser Phänomene auf SPR-Biosensoren wird in einer Arbeit durch CHRISTENSEN beschrieben. In Bezug auf SPR-Biosensoren wird dieser Effekt am Beispiel der Protein-Ligand-Wechselwirkungen in mikrofluidischen Kanälen theoretisch beschrieben [130]. Die Höhe der Diffusionsschicht, in welcher der Transport des Analyten nur durch Diffusion stattfindet, hängt von der Flussrate über der Sensoroberfläche ab. Eine niedrige Flussrate bewirkt eine Transportlimitation, die durch eine hohe Diffusionsschicht bedingt wird. Daher ist das Pumpen der Hybridisierungslösung essentiell, um den diffusionslimitierten Transport der Ziel-DNA zur Oberfläche zu überwinden und eine schnelle Detektion zu ermöglichen [102, 107, 108]. Dieser Zusammenhang für die Hybridisierung mit PCR-Produkten wird in Abbildung 3.16 verdeutlicht. Nach der ersten Injektion des komplementären PCR-Produktes steigt das SPR-Signal bis zu dem Zeitpunkt, bei dem der Fluss im Mikrokanal gestoppt wird. Dies hat eine drastische Reduzierung der Hybridisierungsrate zur Folge. Ausgehend vom sehr geringen Anstieg ($7,8 \pm 1,1$ Pixel/h) des SPR-Signals kann keine Hybridisierung während dieser Zeit detektiert werden. Führt man die Hybridisierung bei geeignetem Fluss über etwa 90 min durch, steigen die SPR-Signale bis etwa 90 Pixel (Abbildung 3.17). Dies kann durch eine schnelle Bindung der PCR-Produkte aus der Lösung zu den immobilisierten, komplementären Sonden erklärt werden. Jedoch reicht die Diffusion innerhalb des Mikrokanals nicht aus, um die beobachtete Bindungsrate beim Pumpen zu erreichen. Bestätigt wird diese Schlussfolgerung durch den zweiten Pumpschritt in Abbildung 3.16. Obwohl die Flussrate im Vergleich zum ersten Pumpschritt erhöht wird, verkleinert sich der Signalanstieg. Versetzt man den Anfang des zweiten Pumpschrittes im Diagramm an den Zeitpunkt als der erste Pumpschritt beendet wurde, ergibt sich eine kontinuierliche Bindungskinetik (versetzte Werte in Abbildung 3.16). Eine weitere Steigerung der Flussrate erhöht unter den gegebenen Bedingungen die Hybridisierungsrate nicht. Daher kann angenommen werden,

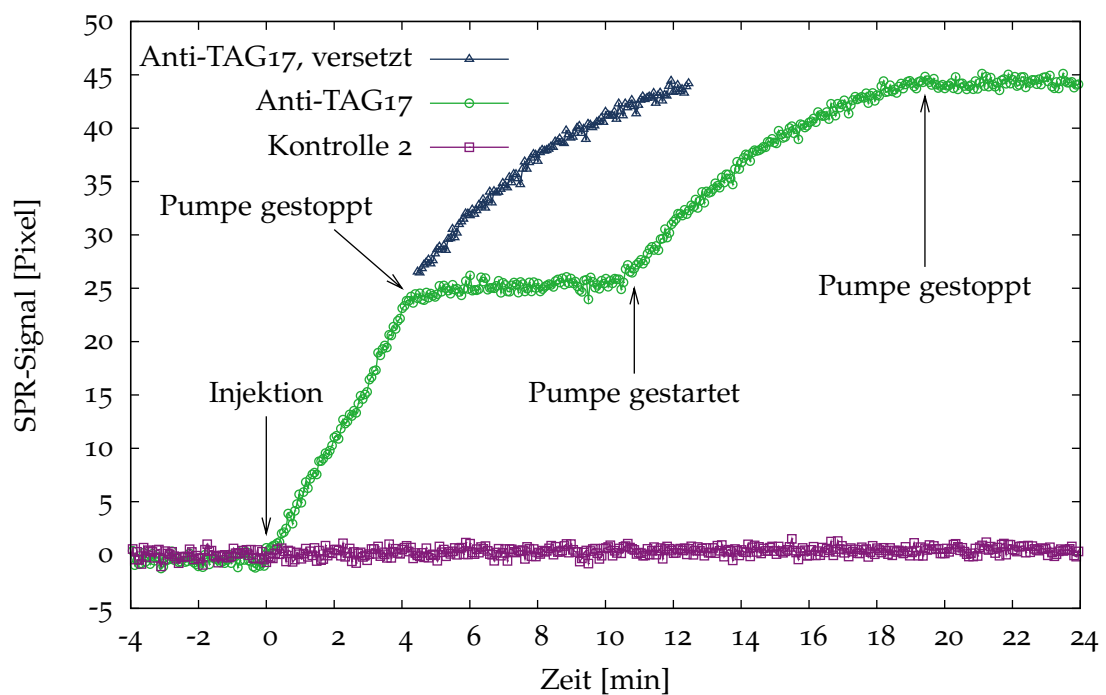


Abbildung 3.16: Hybridisierungskinetik in Abhängigkeit vom mikrofluidischen Fluss auf Spots der Sonden Anti-TAG17 und Kontrolle 2. Injektion von $60 \mu\text{l}$ des PCR-Produkts ($1 \text{ ng}/\mu\text{l}$) mit $20,6 \text{ mm}/\text{s}$ ($7,4 \mu\text{l}/\text{s}$) innerhalb von 8 s. Die versetzten Datenpunkte sind SPR-Signale, die ausschließlich beim Pumpen aufgezeichnet wurden.

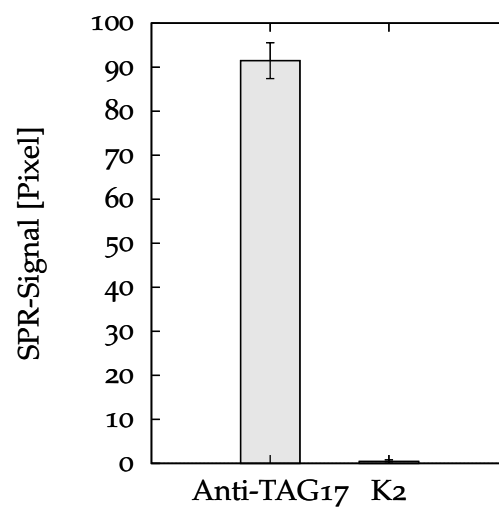


Abbildung 3.17: Endwerte der Hybridisierung nach etwa 90 min im Fluss auf Spots der Sonden Anti-TAG₁₇ und Kontrolle 2 (K2). Injektion von 60 μl des PCR-Produktes (1 ng/ μl) mit 20,6 mm/s (7,4 μl /s).

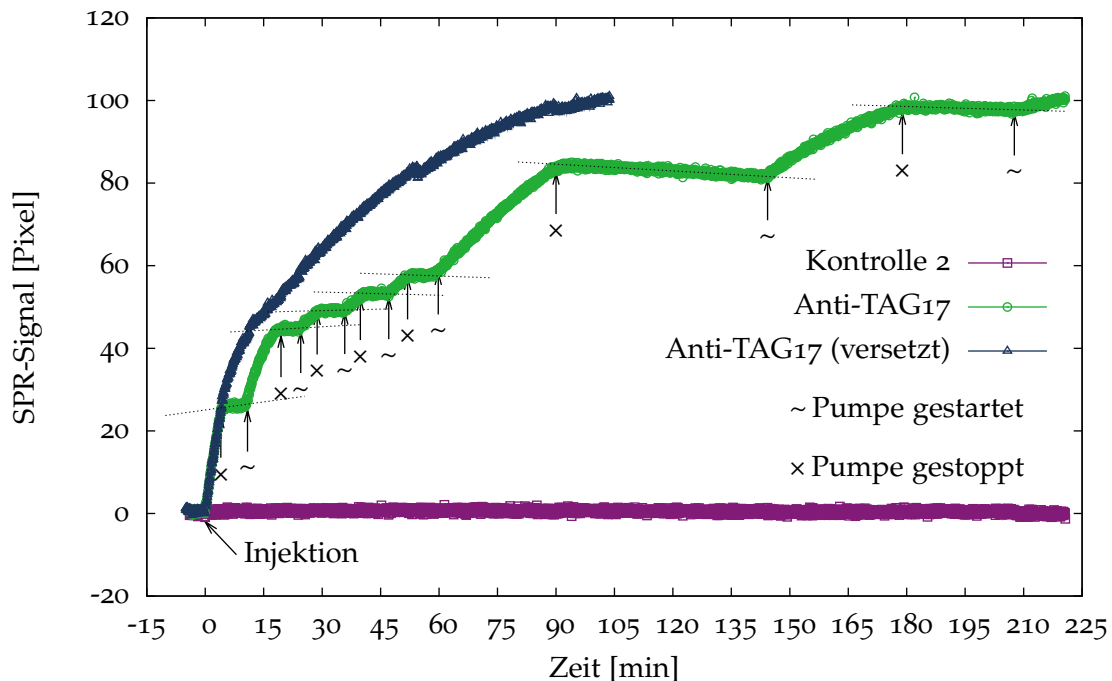


Abbildung 3.18: Hybridisierungskinetik in Abhängigkeit vom mikrofluidischen Fluss auf Spots der Sonden Anti-TAG17 und Kontrolle 2. Injektion von $60\ \mu\text{l}$ des PCR-Produktes ($1\ \text{ng}/\mu\text{l}$) mit $20,6\ \text{mm}/\text{s}$ ($7,4\ \mu\text{l}/\text{s}$) innerhalb von $8\ \text{s}$. Gestrichelte Linien sind jeweils lineare Regressionen der Werte bei gestoppter Pumpe. Die versetzten Datenpunkte sind SPR-Signale, die ausschließlich beim Pumpen aufgezeichnet wird.

dass sich der Massentransport nicht mehr limitierend auf die Bindungskinetik auswirkt.

In Abbildung 3.18 sind die SPR-Signale über längere Zeit in Abhängigkeit vom Fluss dargestellt. In der Zeitspanne von $90\ \text{min}$ bis $140\ \text{min}$, bei gestoppter Pumpe, sinkt das SPR-Signal um $-3,28 \pm 0,06\ \text{Pixel}/\text{h}$. Das bedeutet, dass ein Teil der TAGs dehybridisiert. Wird in der Mikrofluidik wieder ein Fluss eingestellt, kann weiteres PCR-Produkt gebunden werden. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Stabilität der DNA-Doppelhelices im Fluss höher ist als im ruhenden Medium [131, 132].

3.10 Strukturierung der Sensoroberflächen durch μCP

Die Sonden-DNA liegt in wässriger Lösung vor. Deshalb können hydrophob/hydrophile Streifenbereiche auf der Sensoroberflächen zur gezielten Beeinflussung

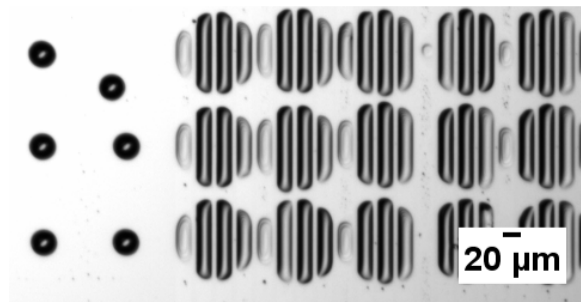


Abbildung 3.19: Mikroskopbild der Rückstände einzelner 50-pl-Tropfen auf hydrophob/hydrophil strukturierter Goldoberfläche eines Si-Wafers. Flächig gedrucktes Octadecylmercaptan im linken Bildteil. Streifenbreite: 7 μ m (hydrophob) und 15 μ m (hydrophil).

der Morphologie und Mobilität solcher Flüssigkeit eingesetzt werden [83]. Alkanthiole, wie das Octadecylmercaptan, können mittels Mikrokontaktdruckern (μ CP⁽¹⁴⁾) als SAM als Streifen auf Goldoberflächen strukturiert aufgebracht werden. Es wird eine Breite von 7 μ m für diese Streifen gewählt, was knapp unterhalb der Auflösung der CCD-Kamera im SPR-Spektrometer, von 7,3 μ m je Pixel, liegt. Die verbleibenden Goldflächen zwischen der hydrophoben Streifen sind 15 μ m breit und hydrophil. Auf diesen hydrophilen Streifen werden die DNA-Sonden immobilisiert [133]. Die wässrige Immobilisierungslösung benetzt bevorzugt die hydrophilen Streifen. Auf hydrophoben Bereichen ist die Benetzung deutlich schlechter und die Tropfen sind nach dem Absetzen mobiler (Abbildung 3.19). Durch das Erhöhen des abgesetzten Volumens können die hydrophilen Streifenbereiche vollständig gefüllt werden. Beim Überschreiten eines kritischen Volumens kommt es zur Überbrückung hydrophober Bereiche (Abbildung 3.20) [80]. Durch Optimierung der Abstände zwischen den abgesetzten Tropfen und durch Modifizierung der Benetzungseigenschaften der Immobilisierungslösungen können hochdichte Streifenarrays erzeugt werden (Abbildung 3.21). Der minimale Pitch wird durch den maximalen Kontaktdurchmesser (90–110 μ m) beim Auftreffen der 50-pl-Tropfen bestimmt. Mit der verwendeten Streifenstruktur ist daher ein Pitch von 140 μ m (ohne Strukturierung, Abbildung 3.21, Mitte) und 110 μ m (mit Strukturierung, Abbildung 3.21, rechts) möglich. Durch die Markierung des PCR-Produkts auf dem Mikroarray mit dem Fluoreszenzfarbstoff YOYO[®]-1-iodid, können die Verteilung doppelsträngiger DNA innerhalb eines Sondenortes und die SPR-Signale verglichen werden (Abbildung 3.22). Die Fluoreszenzsignale bestätigen die SPR-Signale, welche durch Mittelung über die Streifenarrays erhalten werden.

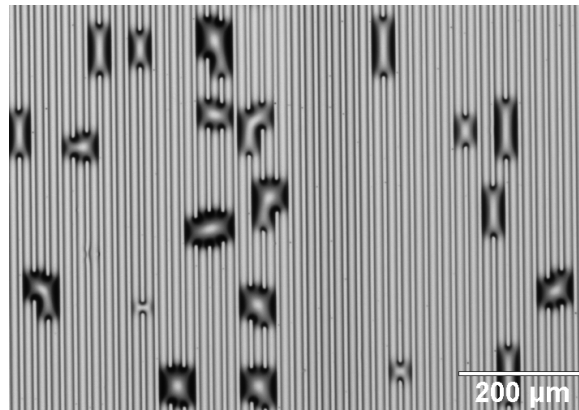


Abbildung 3.20: Mikroskopische Aufnahme der überbrückter, hydrophober Bereiche (Oberfläche wie in Abbildung 3.19).

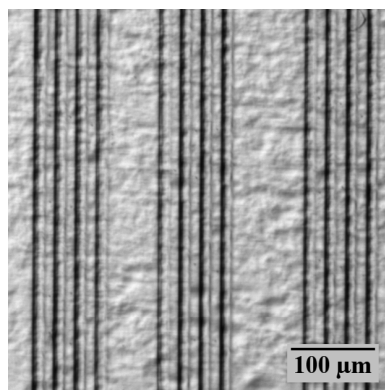


Abbildung 3.21: Mikroskopische Aufnahme der Rückstände auf hydrophob/hydrophil strukturierter SPR-Chipoberfläche. 5 % Glycerin in der Immobilisierungslösung. Streifenbreite: 7 μm (hydrophob) und 15 μm (hydrophil).

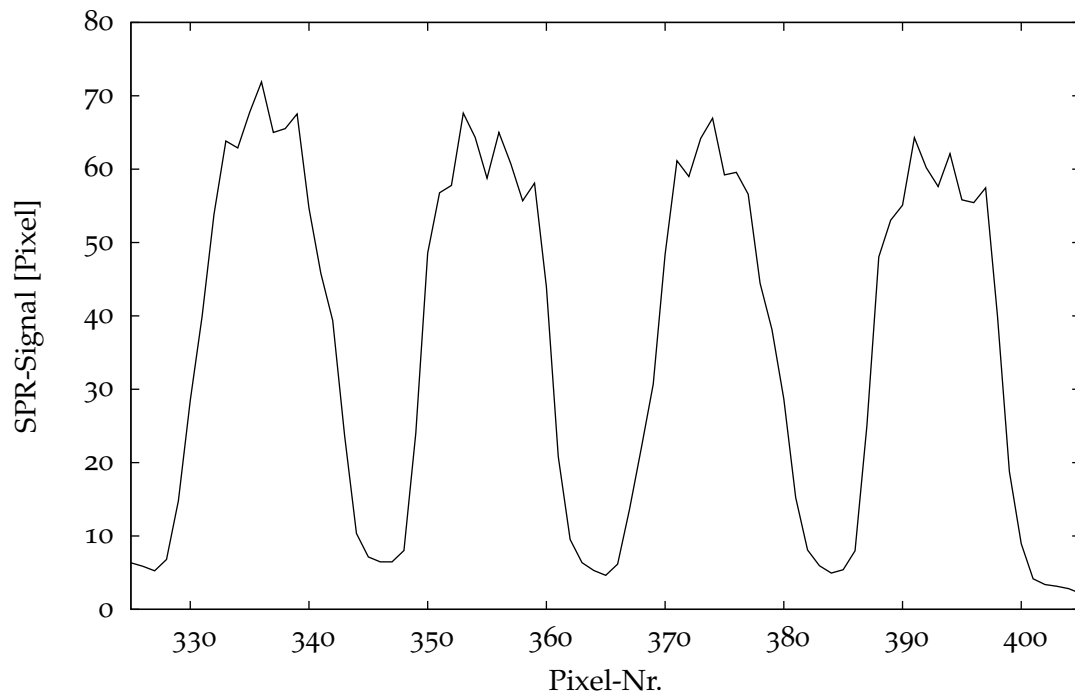


Abbildung 3.22: SPR-Signale (oben) und fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (unten) nach der Hybridisierung auf hydrophob/hydrophil strukturiertem SPR-Chip analog zu Abbildungen 3.19 und 3.21.

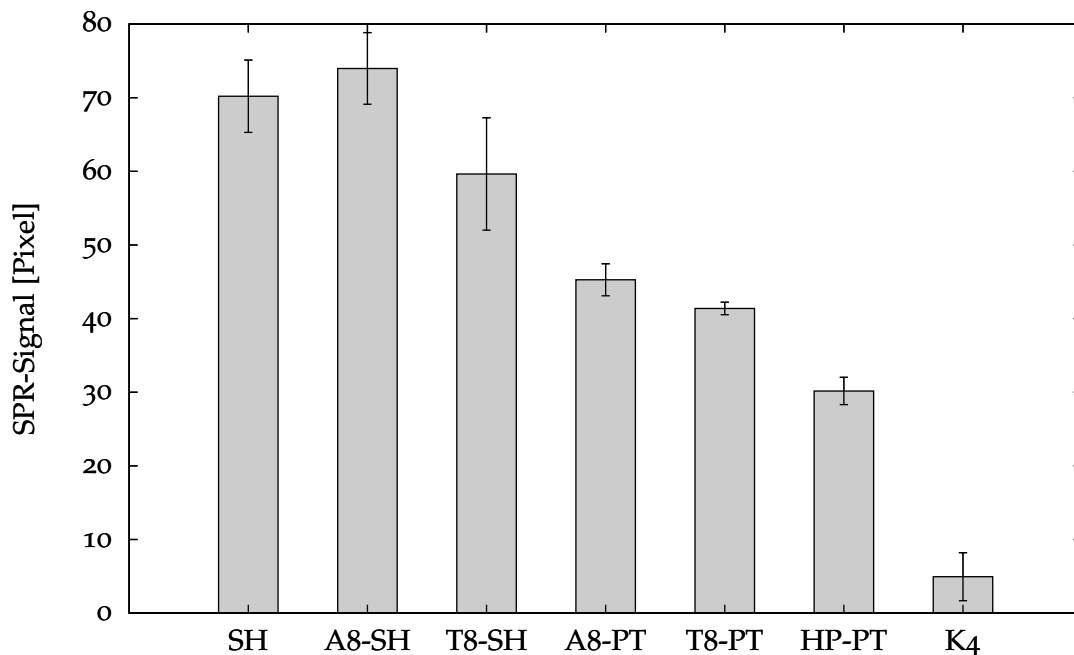


Abbildung 3.23: SPR-Signale nach 30 min Hybridisierung mit dem TAG₁₇-PCR-Produkt der Länge von 300 bp auf einem SPR-Chip mit Anti-TAG₁₇-Sonden (Tabelle 2.6), welche über Thiol- und Phosphorothioatgruppen direkt an die Goldoberfläche gebunden sind. Referenziert gegen eine geblockte Goldoberfläche. Das Signal auf dem Sondenort mit Kontrolle 4 (K₄) ist gezeigt.

3.11 Phosphorothioat-DNA-Sonden

Phosphorothioat-DNA auf Gold Die Wechselwirkung des Schwefels der PT-DNA mit Goldnanopartikeln wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen untersucht [134–138]. Die entsprechenden Berichte deuten darauf hin, dass die Bindungseffizienz der PT-DNA stark von der Inkubationszeit, Struktur und den Konzentrationen abhängt. Daneben gibt es Veröffentlichungen, in denen die Immobilisierung der PT-DNA auf planaren Goldsubstraten beschrieben wird [139, 140]. Davon ausgehend wird in der vorliegenden Arbeit die PT-DNA direkt an die Goldoberfläche gebunden und als Sonde für die Detektion der Hybridisierungen verwendet. Die Hybridisierung eines 300 bp langen PCR-Produkts mit verschiedenen strukturierten Anti-TAG-Sonden (Tabelle 2.6) wurde untersucht. Die dazugehörigen Messwerte sind in Abbildung 3.23 dargestellt. Diese Daten zeigen höhere Signale für lineare Sonden mit Thiolmodifizierung als für die gleichen Sequenzen

mit PT-Modifizierung. Außerdem werden auf Spots mit Sonden, welche am 3'-Ende acht aufeinanderfolgende Adeninbasen enthalten, Anti-TAG₁₇-A8-, höhere Signale beobachtet als mit analogen Sonden der Struktur, Anti-TAG₁₇-T8-, mit acht aufeinanderfolgenden Thyminbasen. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass Adenin eine stärkere Affinität zu Gold hat als Thymin. WOLF *et al.* berichten über eine größere Belegungsdichte durch ODN der Struktur von 5'-(dA)₂₅-3' als durch 5'-(dT)₂₅-3'. Jedoch wird eine geringere Sondendichte der thiolmodifizierten ODN HS-(CH₂)₆-5'-(dA)₂₅-3' beobachtet als für HS-(CH₂)₆-5'-(dT)₂₅-3'. Dies gilt aber nur für Adsorptionszeiten von mehreren Minuten. Die anfängliche Adsorption des HS-(CH₂)₆-5'-(dA)₂₅-3' ist etwas schneller als die des HS-(CH₂)₆-5'-(dT)₂₅-3'. Die Verdrängung der unspezifisch adsorbierten Nucleobasen durch die Thiolgruppen setzt erst nach einigen Minuten der Immobilisierung in wässriger Lösung ein. Daher wird über eine höhere Belegungsdichte durch HS-(CH₂)₆-5'-(dT)₂₅-3' im Vergleich zu HS-(CH₂)₆-5'-(dA)₂₅-3' erst nach längerer Zeit berichtet [53]. Weil in der vorliegenden Arbeit die Immobilisierung in Form kleiner Tropfen der Sondenlösungen erfolgt, verdunsten diese Lösungen in weniger als einer Minute und der Effekt der höheren Affinität des Adenins zu Gold überwiegt. Diese Beobachtungen stehen in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von KIMURA-SUDA *et al.*, bei denen poly(dA) stärker auf Gold adsorbieren als poly(dT), poly(dC) oder poly(dG). Die Adsorption des Adenins auf Gold ist so stark, dass A-T-Basenpaare einer DNA-Doppelhelix aufschmelzen und die Thyminbasen durch Adeninbasen von der Oberfläche verdrängt werden [51]. Molekülbausteine aus poly(dA) können daher als Platzhalter bei der Immobilisierung von DNA auf Goldoberflächen eingesetzt werden [56, 58].

Ein weiterer Aspekt, welcher bei der Hybridisierung betrachtet wird, ist die Fähigkeit der Sonden zur Ausbildung der Haarnadelstrukturen. Während Haarnadelstrukturen in der Erkennungssequenz der TAGs und Anti-TAGs die Hybridisierungseffizienz senken, kann die thermodynamische Stabilität des TAG/Anti-TAG-Doppelstrangs erhöht werden, wenn eine Haarnadelstruktur zur Immobilisierung genutzt wird, welche sich benachbart zur Anti-TAG-Sequenz befindet [141]. Jedoch kann dieser Effekt in Abbildung 3.23 nicht beobachtet werden. Dies kann damit erklärt werden, dass innerhalb der kurzen Zeit der Immobilisierung, bis ein 50- μ l-Tropfen verdunstet, keine dichte Packung und Ausrichtung der Sonden erfolgen kann. Stattdessen überwiegt die Physisorption, bei der die Nucleobasen adsorbieren und noch nicht durch stabilere Schwefel-Gold-Bindungen ersetzt werden. In

Tabelle 3.2: Theoretischer Gyrationradius der Sonden und deren Einfluss auf die SPR-Signale.

Anti-TAG ₁₇ Sonde	N [Basen]	R_g [nm]	Relative Sondenlänge [%]	Relatives SPR- Signal [%]
-SH	25	1,9	100	100 ± 7
-T8-SH	33	2,2	76	85 ± 11
-A8-SH	33	2,2	76	105 ± 7
-T8-PT	33	2,2	100	100 ± 2
-A8-PT	33	2,2	100	109 ± 5
-HP-PT	53	2,8	62	73 ± 4

dieser Phase der Adsorption ist die molekulare Größe der Sonden ausschlaggebend für die Belegungsdichte. Die molekulare Größe einer Sonde kann mit ihrem Gyrationradius beschrieben werden. Der Gyrationradius, R_g , einer Sonden der Länge von N Basen, wurde mit Hilfe der Gleichung:

$$R_g = (0,38 \text{ nm})\sqrt{N} \quad (3.1)$$

nach TINLAND *et al.* abgeschätzt [117]. Für die maximale Oberflächenkonzentration, die Sondendichte Γ_{max} , gilt somit die Proportionalität $\Gamma_{max} \sim R_g^{-2}$ oder $\Gamma_{max} \sim N^{-1}$. Mit steigendem R_g verringert sich Γ_{max} . Das SPR-Signal, S , kann als proportional zur Bedeckung der Sensoroberfläche mit dem hybridisierten PCR-Produkt betrachtet werden. Daher kann diese Proportionalität auch zwischen Γ_{max} und S angenommen werden. Somit kann die Beziehung:

$$\frac{N_0}{N_i} \approx \frac{S_i}{S_0} = \frac{\Gamma_{max,i}}{\Gamma_{max,0}} \quad (3.2)$$

für die relative Sondenlänge aufgestellt werden. Der Index i der Gleichung (3.2) bezieht sich auf eine ausgewählte Sonde und der Index 0 auf diejenige Sonde, für welche $\Gamma = 100\%$ gesetzt wird und S_0 einem relativen Signal von 100% entspricht. Unter diesen Voraussetzungen und mit den SPR-Signalen aus Abbildung 3.23 kann der Einfluss der Sondenlänge auf die Detektion der Hybridisierung abgeschätzt werden. Dazu werden in Tabelle 3.2 Sonden verglichen, welche untereinander die gleichen chemischen Bindungen zur Sensoroberfläche aufweisen. Die Tendenz der SPR-Signale in Abhängigkeit von der Sondenlänge kann durch die Abschätzung auf Grundlage der Gleichung 3.2 erfolgen. Man erkennt auch den Einfluss der höheren

Affinität der Nucleobase Adenin im Vergleich zum Thymin. Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl thiolmodifizierte DNA als auch PT-DNA direkt auf Gold immobilisiert werden kann und zur Detektion von Hybridisierungen geeignet ist. Auf Spots mit PT-DNA sind die Hybridisierungssignale deutlich niedriger. Dies deutet darauf hin, dass die entsprechende Sondendichte geringer ist als die auf Spots mit thiolmodifizierter DNA. Ein sensitiver Sensor mit Sonden aus PT-DNA kann hergestellt werden, wenn die Immobilisierung über die PT-Gruppen verbessert wird. Dies konnte durch die Beschichtung der Goldoberfläche mit elektrophilen Gruppen erreicht werden. Der Schwefel der PT-Gruppen bindet durch nucleophile Substitution effektiv an die elektrophile Iodalkyl-Oberfläche.

Phosphorothioat-DNA auf einer Iodalkyl-Oberfläche In Abbildung 3.24 sind die Echtzeitdaten der Hybridisierung auf einem SPR-Chip dargestellt, der mit 11-Mercapto-1-undecanol und 3-(Iodpropyl)trimethoxysilan funktionalisiert ist. Auf diesem Chip kann PT-DNA besser anbinden, was an den hohen und spezifischen Signalen bei der Hybridisierung zu erkennen ist. Thiole sind zwar gute Nucleophile, werden jedoch inaktiv, wenn sie oxidiert werden und Disulfide bilden. Dies kann eine mögliche Erklärung dafür sein, dass auf dem Spot der T8-SH-Sonde deutlich geringere Signale erreicht werden als auf dem Spot der A8-SH-Sonde. Weil nicht unter Ausschluss des Luftsauerstoffs gearbeitet werden konnte, ist die Bildung der Disulfide nicht auszuschließen. Daher ist beim Arbeiten mit thiolmodifizierten Sonden darauf zu achten, dass die Sonden möglichst lyophilisiert aufbewahrt werden und sofort nach dem Lösen in der Immobilisierungslösung auf die Sensoroberfläche aufgebracht werden. Dagegen sind die Signale auf Spots mit Phosphorothioat-DNA sehr ähnlich. Die Stabilität der Phosphorothioatgruppe gegenüber der Oxidation und Disulfidbildung erlaubt einen reproduzierbaren Aufbau der DNA-Mikroarrays.

3.12 SPR-Chips zur Mutationsanalyse der akuten myeloischen Leukämie

Auf der Grundlage der Experimente zum Aufbau der SPR-Chips und zur Hybridisierung in der Mikrofluidik wird eine Arbeitsanweisung formuliert, die es erlaubt einen SPR-basierten Nachweis genetischer Mutationen durchzuführen:

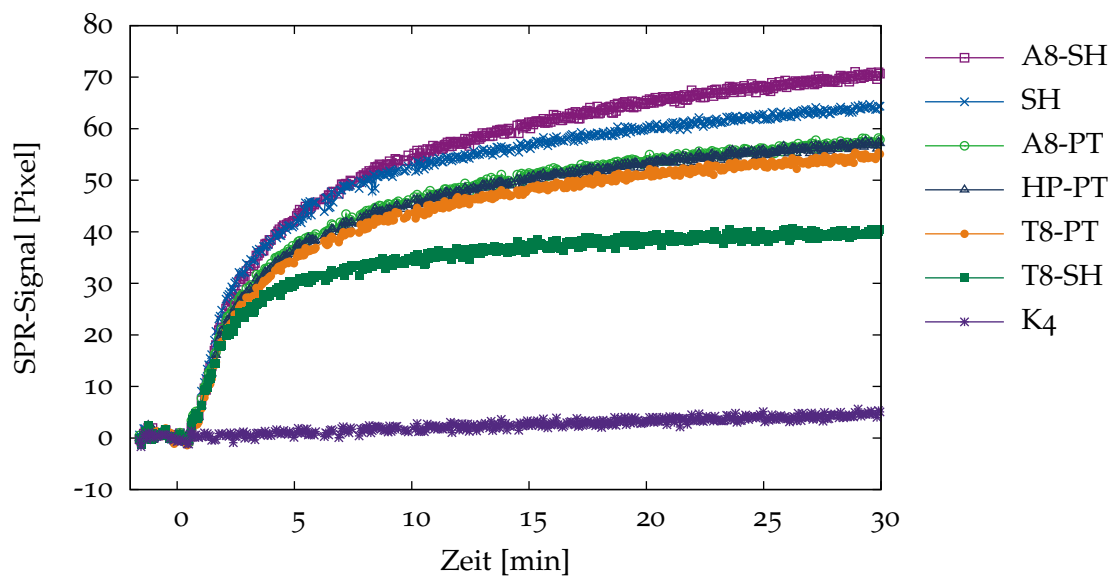


Abbildung 3.24: Kinetik der Hybridisierung des TAG₁₇-PCR-Produktes der Länge von 300 bp auf einem SPR-Chip, welcher mit 11-Mercapto-1-undecanol und 3-(Iodpropyl)trimethoxysilan funktionalisiert ist. Die Anti-TAG₁₇-Sonden (Tabelle 2.6) sind über Thiol- und Phosphorothioatgruppen an das Silan gebunden. Referenziert gegen eine geblockte Oberfläche. Das Signal auf dem Sondenort mit Kontrolle 4 (K4) ist gezeigt.

Thiolmodifizierte Sonden werden mit der Konzentration von 50 μM , 5 % Glycerin und 100 mM MgCl_2 in wässriger Lösung verwendet. Die Immobilisierung der Sonden erfolgt durch das Aufbringen der Immobilisierungslösung in 50- μl -Tropfen mittels eines Mikropipettiersystems. Danach wird 30 min eine ethanolische Lösung mit 10 mM MCU zum Blocken verwendet. Dadurch wird die Goldoberfläche zwischen den Spots mit einer stabilen SAM bedeckt. Da DNA in Ethanol nicht löslich ist, wird keine Sonden-DNA unter den unterschiedlichen Sondenorten verteilt und eine Kreuzkontamination findet nicht statt. Anschließend wird 60 min mit 10 mM wässriger MCH-Lösung geblockt, um auch auf den Spots freie Bindungsstellen des Goldes zu belegen und die spätere Hybridisierung mit den Sonden zu ermöglichen (siehe Kapitel 1.11). Die Hybridisierung erfolgt im mikrofluidischen Kanal mit PCR-Produkten und 120 mM MgCl_2 in einer wässrigen Lösung bei 40 °C.

Diese Vorgehensweise wird zur Detektion zweier Mutationen der akuten myeloischen Leukämie (AML) verwendet. Dabei handelt es sich um Chromosomenmutationen. Die eine Mutation ist die Translokation $t(8;21)(q22;q22)^{(17)}$ mit dem Fusionsgen $AML1^{(18)}-ETO^{(19)}$ [142], die andere Mutation ist die Inversion $inv(16)(p13q22)^{(20)}$ mit dem Fusionsgen $CBFB^{(21)}-MYH11^{(22)}$ Typ D [143]. Für diese Experimente wurden PCR-Produkte durch die Biotype Diagnostic GmbH hergestellt. Dazu wird RNA⁽²³⁾ aus Patientenproben isoliert und eine cDNA⁽²⁴⁾ synthetisiert. Im Anschluss wird eine Multiplex-PCR durchgeführt. Die vier eingesetzten Primer sind spezifisch für die Bruchstellen der entsprechenden Chromosomen. Zwei dieser Primer tragen je eine TAG-Sequenz. Dazu komplementäre Sonden sind auf dem SPR-Chip immobilisiert. Zusätzlich werden Kontrollsonden verwendet, um einerseits die Spezifität der Hybridisierung zu testen und andererseits die Funktionsfähigkeit des Chips zu prüfen. Hierfür wird zu jeder Hybridisierung ein Modell-PCR-Produkt gegeben, welches spezifisch mit einer der Kontrollsonden hybridisiert und hohe SPR-Signale

⁽¹⁷⁾ Das Chromosom 8 fusioniert mit dem Chromosom 21 nach Brüchen an den Stellen q22.

⁽¹⁸⁾ engl. *acute myleoid leukemia 1*

⁽¹⁹⁾ engl. *eight twenty one*

⁽²⁰⁾ Nach einem Doppelstrangbruch des Chromosoms 16, an den Stellen p13 und q22, wird dieses Fragment, um 180° gedreht, wieder eingebaut.

⁽²¹⁾ engl. *core binding factor β*

⁽²²⁾ engl. *myosin heavy chain 11*

⁽²³⁾ Ribonucleinsäure, engl. *ribonucleic acid*

⁽²⁴⁾ engl. *copy-DNA*, enzymatisch mit der reversen Transkriptase an einem RNA-Templat synthetisiert

liefert.

Mit diesem Verfahren detektierte die Biotype Diagnostic GmbH spezifische SPR-Signale von 50 bis 60 Pixel, wobei die Kreuzhybridisierung kleiner als 10 Pixel war. Die oben erwähnten Chromosomenmutationen wurden aus einem Multiplex-PCR-Ansatz erfolgreich mittels eines DNA-Mikroarrays auf einem SPR-Chip analysiert.

Kapitel 4

Zusammenfassung und Ausblick

Die Immobilisierung thiolmodifizierter DNA konnte auf Grundlage der XPS-Experimente verbessert werden. Eine genügend hohe Sondendichte kann durch den MgCl_2 -Zusatz von 20 bis 120 mM erreicht werden. Durch das Blocken der freien Flächen mit Mercaptoalkoholen kann die unspezifische Adsorption verhindert werden. Um das Auftragen der Sondenlösungen mit Hilfe eines Mikropipettiersystems zu ermöglichen, wird Glycerin mit einer Konzentration von 5 % zugesetzt. Dadurch können bis zu 180 linienförmige Sondenorte auf der Goldoberfläche eines SPR-Chips aufgebaut werden.

Die Hybridisierung auf den DNA-Mikroarrays konnte mittels SPR detektiert werden. Die Nachweisgrenze für 300 bp lange PCR-Produkte liegt bei etwa 0,5 ng/ μl (2,6 nM). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass es einen linearen Bereich für eine mögliche Quantifizierung der PCR-Produkte gibt. Dieser Bereich ist für Konzentrationen unter 2,5 ng/ μl zu erwarten. Daher sollte eine separate Quantifizierung der PCR-Produkte ähnlicher oder gleicher Länge in einer Hybridisierungslösung möglich sein. Die Untersuchung unterschiedlicher Längen der PCR-Produkte zeigt, dass längere PCR-Produkte günstig für hohe SPR-Signale mit einer akzeptablen Kinetik sind. Haarnadelstrukturen senken die Nachweisgrenze und sollten auf DNA-Mikroarrays vermieden werden, wenn eine Quantifizierung auf Sondenorten mit unterschiedlichen Sequenzen notwendig ist. Bei einer geeigneten Wahl der TAG- und Anti-TAG-Sequenzen treten kaum Kreuzhybridisierungen auf und die Detektion kann innerhalb der ersten 10 min erfolgen.

Die Geschwindigkeit der Hybridisierung an der Sensoroberfläche ist durch die Diffusion der Ziel-DNA zur Sonden-DNA limitiert. Ein mikrofluidischer Fluss ist für eine schnelle Detektion entscheidend. Außerdem wirkt die Strömung im

Mikrokanal stabilisierend auf die DNA-Doppelhelix und fördert die Anbindung der Ziel-DNA an die komplementären Sonden.

Neben thiolmodifizierter DNA wurde DNA mit Phosphorothioatgruppen auf der Goldoberfläche der SPR-Chips immobilisiert. Bei direkter Anbindung an das Gold ist die Größe der Sonden bestimmend für die Sondendichte und die resultierenden Hybridisierungssignale. Thiole binden stärker an die Goldoberfläche als Phosphorothioate. Zusätzlich kann eine höhere Affinität des Adenin zu Gold im Vergleich zum Thymin beobachtet werden. Die Erhöhung der Oberflächenkonzentration der PT-DNA-Sonden kann über eine geeignete Beschichtung der Goldoberfläche erreicht werden. Dazu wird eine SAM aus 11-Mercapto-1-undecanol mit 3-(Iodpropyl)trimethoxysilan aufgebaut. Die Iodalkylgruppen können dann zur nucleophilen Substitution mit den Phosphorothioatgruppen dienen. Bei dieser Oberflächenchemie ist die Sondendichte nicht vorrangig von der Molekülgröße abhängig.

Durch μ CP des Octadecylmercaptans kann die Goldoberfläche des SPR-Sensors in hydrophile und hydrophobe Streifenbereiche (Streifenbreiten 15 μ m bzw. 7 μ m) unterteilt werden. Dadurch wird die Morphologie der Flüssigkeitstropfen in diesen Bereichen kontrolliert und die Integrationsdichte des DNA-Mikroarrays erhöht. Es können 15 μ m breite Sondenorte mit dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten SPR-Spektrometer ausgewertet werden.

Zukünftige Untersuchungen auf den SPR-Chips können auf die Stabilität und Geschwindigkeit der DNA-Hybridisierungen in Abhängigkeit von Temperatur und Flussrate beinhalten. Die Quantifizierung von PCR-Produkten auf SPR-Chips kann weiter entwickelt werden, wenn die Effekte der TAG/Anti-TAG-Sequenzen berücksichtigt werden. Weiterhin kann die Morphologie der Flüssigkeitstropfen auf hydrophil/hydrophob strukturierten Oberflächen optimiert werden, um ein sicheres Befüllen der Sondenorte eines Mikroarrays zu ermöglichen. Die verwendete Plattformtechnologie kann in der medizinischen Diagnostik angewendet werden. Die Detektion der Hybridisierung basierend auf einem TAG/Anti-TAG-System ist zum Nachweis der in einer Multiplex-PCR synthetisierten Produkte geeignet und wurde erfolgreich anhand der Mutationsanalyse der Fusionsgene *AML1-ETO* und *CBFB-MYH11* bei der akuten myeloischen Leukämie bestätigt.

Teil II

Nucleobasen-Sequenzentwurf

Kapitel 5

Ein erschöpfender Algorithmus

DNA hat die bemerkenswerte Fähigkeit zur spezifischen molekularen Erkennung, welche durch die Sequenz der Nucleinbasen Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) und Cytosin (C) bestimmt wird. Diese Sequenzerkennung basiert hauptsächlich auf der Watson-Crick-Basenpaarung der komplementären Basen A-T und G-C [88]. Jedoch ist die eindeutige Hybridisierung verschiedener DNA-Stränge in einer Mischung zahlreicher Sequenzen in der Lösung oder an Oberflächen entscheidend für die meisten Anwendungen in der Genetik, der DNA-Nanobiotechnologie und für das DNA-Computing [128, 144, 145]. Daher müssen Kreuzhybridisierungen minimiert werden, indem die Einzigartigkeit aller möglichen Subsequenzen des verwendeten Satzes kontrolliert wird. Zusätzlich muss auf Sekundärstrukturen geachtet werden, die durch Faltung bei Intrastrang-Wechselwirkungen auftreten. Haarnadelstrukturen reduzieren die Hybridisierungseffizienz und die Bindungsraten auf DNA-Mikroarrays (siehe Kapitel 3.3.3) [146].

Der erschöpfende Nucleinbasen-Sequenzentwurf-Algorithmus EGNAS⁽²⁵⁾ ist in der Programmiersprache C++ formuliert und wird als ausführbare Datei zur Verfügung gestellt [147]. Damit können Sequenzen mit kontrollierten Intra- und Interstrang-Eigenschaften generiert werden. Die EGNAS-Software wird mit bisher erhältlichen rechnergestützten Werkzeugen verglichen. Dazu werden Daten ausgewählter Publikationen mittels EGNAS neu analysiert, um die Tauglichkeit des neuen Algorithmus zu belegen.

Die in diesem Teil der vorliegenden Arbeit beschriebene Entwicklung eines Nucleobasen-Sequenzentwurf-Algorithmus und dessen Umsetzung in Form der Software EGNAS ist in der Zeitschrift *BMC Bioinformatics* publiziert [147]. Die Formulierung

⁽²⁵⁾ engl. *exhaustive generation of nucleic acid sequences*

des Algorithmus in der Programmiersprache C++ wurde durch MARTIN BÖNSCH (Professur für Physikalische Chemie, Mess- und Sensortechnik, Technische Universität Dresden) durchgeführt. Eine Anleitung zur Verwendung der EGNAS-Software befindet sich in Anhang A.

5.1 Bisherige Software und Algorithmen

In der Literatur werden zahlreiche Strategien des DNA-Sequenzentwurfs beschrieben [148–167]. In der vorliegenden Arbeit sollen nicht alle Algorithmen untersucht werden. Dennoch werden die Ergebnisse mit zuvor publizierten Daten verglichen. BRENNEMAN und CODON gaben einen kurzen thematischen Überblick zum Entwurf der DNA-Stränge [168]. Nach bestem Wissen gibt es bisher keine erhältliche Software, welche die Möglichkeit bietet, Nucleobasen-Sequenzen mit geeigneter Berücksichtigung der Intra- und Interstrang-Wechselwirkungen zu generieren. Außerdem ist eine maximale Größe des Sequenzsatzes generierter Sequenzen erwünscht, wenn Mikroarrays aufgebaut werden sollen oder wenn DNA-Stränge zum Adressieren einer hohen Anzahl unterschiedlicher Zielmoleküle gebraucht werden.

Es können Sequenzsätze definierter Eigenschaften mit SEIFFERTS *et al.* Software Seed [164, 165] wie auch mit FELDKAMPS *et al.* DNASequencesGenerator und CANADA [154, 159, 161, 167] generiert werden. Diese Programme sind frei erhältlich, arbeiten effizient, liefern befriedigende Satzgrößen und erfüllen zuvor bestimmte Interstrang-Eigenschaften innerhalb eines Sequenzsatzes. Mit den erwähnten Programmen ist es aufwendig, große Sequenzmengen zu erreichen und dabei gleichzeitig die Intrastrang-Eigenschaften zu kontrollieren. So können selbstkomplementäre Subsequenzen, Haarnadelstrukturen und Wiederholungen innerhalb ein und desselben Strangs nur vermeiden, wenn nach einer Sequenzgenerierung geeignete Sequenzen für einen weiteren Programmdurchlauf ausgewählt werden. Das heißt, dass ein iteratives Vorgehen notwendig ist und maximal mögliche Satzgrößen nicht garantiert werden können. Das liegt daran, dass bei diesen Algorithmen die Intrastrang-Eigenschaften nicht unabhängig von den Interstrang-Eigenschaften definiert werden können.

Sowohl SEIFFERT als auch FELDKAMP nutzen das durch SEEMAN [148, 149] eingeführte Criton-Konzept. Critons sind alle überlappenden Teile eines Sequenzstrangs mit einer bestimmten Länge L_c , deren Komplemente als Anti-Critons bezeichnet

werden. Unter Berücksichtigung der Criton-Regeln werden Stränge generiert, die aus einzigartigen Basissequenzen bestehen. Es gibt 4^{L_c} Critons und Anti-Critons. Diese Tatsache limitiert die pro Sequenzsatz maximal mögliche Anzahl an Sequenzen, N_s , der Länge L_s . Jede Sequenz besteht aus $(L_s - L_c + 1)$ überlappenden Segmenten. Um den Criton-Regeln zu genügen, wird jede Basissequenz höchstens einmal pro Satz verwendet und das entsprechende Komplement ist nicht erlaubt. Für ungerade L_c ist die eine Hälfte aller möglichen Sequenzen komplementär zur anderen Hälfte und N_s kann mit

$$N_s = \frac{4^{L_c}}{2(L_s - L_c + 1)} \quad (5.1)$$

bestimmt werden. Für gerade L_c ist die Satzgröße durch

$$N_s = \frac{4^{L_c} - 4^{\frac{L_c}{2}}}{2(L_s - L_c + 1)} \quad (5.2)$$

gegeben, weil es $4^{\frac{L_c}{2}}$ selbstkomplementäre Basissequenzen gibt, die verboten sind. Weitere Limitierungen resultieren aus Einschränkungen im Hinblick auf den Guanin-Cytosin-Gehalt (GC-Gehalt) und die durch den Benutzer verbotenen Sequenzen.

5.2 Kriterien und Optionen des EGNAS-Algorithmus

Der Sequenzentwurf-Algorithmus EGNAS bietet dem Benutzer verschiedene Optionen, damit die erzeugten Sequenzen bestimmte Kriterien erfüllen:

1. Sequenzlänge L_s .
2. Länge der Basissequenzen (Criton-Länge L_c).
3. Genauer GC-Gehalt oder sein Bereich.
4. Kein terminales Adenin oder Thymin im Strang. / Geforderte GC-Enden.
5. Verbotene Sequenzen. / Einbezogene Sequenzen.
6. Länge der verbotenen selbstkomplementären Subsequenzen L_{sc} .
7. Verbotene Stammlänge der Haarnadelstrukturen L_{hp} .

8. Länge der Subsequenzen, die innerhalb ein und derselben Sequenz nicht wiederholt werden dürfen (Gleiten, L_{sl}).
9. Verbotene Länge der Subsequenzen, die komplementär zu Nachbarsequenzen sind L_{ni} .

Die EGNAS-Software bietet die Option, die molare freie Enthalpie für die Bildung eines DNA-Doppelstrangs zu berechnen. Diese Berechnung basiert auf dem „Modell nächster Nachbarn“⁽²⁶⁾ [91] mit Parametern nach *SANTALUCIA et al.* [92]. *MARKY et al.* untersuchten den Helix-Knäuel-Übergang und beschrieben das „Ausfransen“ eines DNA-Strangs an terminalen T-A-Basenpaaren [169]. Im „Modell nächster Nachbarn“ haben *SANTALUCIA et al.* einen Strafwert von 0,4 kcal/mol für Stränge mit einem 5'-T-Ende zugewiesen [92]. Mit EGNAS ist es möglich, Sequenzen zu generieren, die kein terminales Adenin oder Thymin enthalten. So kann das Risiko des „Ausfransens“ in den entworfenen DNA-Strängen reduziert werden, indem nur Guanin oder Cytosin an den Strangenden erlaubt sind. In solchen Fällen soll diese Option als „geforderte GC-Enden“ bezeichnet werden.

Guaninreiche DNA-Motive können parallele, viersträngige Komplexe bilden [170]. Weiterhin ist bekannt, dass Telomere, die Enden eukaryotischer Chromosomen, guaninreiche Überhänge besitzen sowie intra- und intermolekulare Strukturen bilden [171]. Daher werden die Subsequenzen GGG oder folglich CCC oftmals beim Entwurf der DNA-Stränge verboten, um die Bildung der Guanin-Tetraden⁽²⁷⁾ zwischen sich formenden Haarnadelstrukturen zu umgehen.

Homopolymere Sequenzabschnitte mit Wiederholungen des Adenins oder Thymins sind unerwünscht für bestimmte Anwendungen, die den Einsatz der DNA-Polymerasen benötigen. Diese Prozesse sind abhängig von der Genauigkeit der DNA-Polymerasen, die wiederum durch die Sequenz der zu replizierenden DNA-Stränge beeinflusst wird. Die Wiederholung ein und derselben Base in der Sequenz kann zu ihrer fehlerhaften Replikation führen, weil dort ein Templat-Primer-Gleiten möglich ist [172]. Deswegen werden beim Sequenzentwurf vorzugsweise Motive verboten, die vier und mehr aufeinanderfolgende Adenin- oder Thyminbasen enthalten. Verbotene Sequenzen bzw. Motive verbotener Subsequenzen sollen einzeln in einer Menge aufgelistet werden, die im Folgenden in geschweiften Klammern angegeben wird. Wenn beispielsweise die Subsequenzen GGG und CCC verboten sind, wird {GGG; CCC} die Menge der verbotenen Elemente sein.

⁽²⁶⁾ engl. *nearest-neighbor model*

⁽²⁷⁾ auch G-Quadruplex, G-Tetraplex oder G-Quartett genannt

5.3 Intrastrang-Eigenschaften

Im Vergleich zur Software, die in Abschnitt 5.1 beschrieben ist, bietet EGNAS neue Optionen bezüglich der Intrastrang-Eigenschaften. Diese sind entscheidende Voraussetzungen, um Sekundärstrukturen zu vermeiden, die auf selbstkomplementäre Sequenzen und die Bildung der Haarnadelstrukturen zurückzuführen sind, was in Kapitel 3.3.3 experimentell gezeigt ist. Im Gegensatz zum Criton-Konzept [148, 149], wie es von SEIFFERT [164, 165] und FELDKAMP [154, 159, 161] angewendet wird, behandelt der neue Algorithmus Intrastrang-Eigenschaften getrennt. Es ist damit möglich, eine Sequenz zu generieren, in der sich Critons wiederholen und Anti-Critons vorkommen. Dennoch wird es zwischen zwei oder mehreren Sequenzsträngen desselben Satzes keine Wiederholungen der Critons der Länge von L_c Basen geben. Darüber hinaus werden dazugehörige, komplementäre Anti-Critons nicht vorkommen.

5.3.1 Haarnadelstrukturen und Selbstkomplementarität

Haarnadelstrukturen werden auch als Haarnadelschleifen bezeichnet. Sie bestehen aus zwei komplementären Arm-Sequenzen und der Schleife. Die Arm-Sequenzen sind in der Lage, den doppelsträngigen Stamm zu bilden, während sie mit der einzelsträngigen Schleifen-Struktur verbunden sind. Selbstkomplementarität wird als Sonderfall einer Haarnadelstruktur behandelt, bei dem die Schleifenlänge null beträgt. Deshalb besitzt eine selbstkomplementäre Sequenz immer eine gerade Anzahl an Basen. Sind Haarnadelstrukturen mit einem L_{hp} langen Stamm verboten, kommen folgerichtig keine $2L_{hp}$ Basen langen selbstkomplementären Subsequenzen vor.

5.3.2 Gleiten

Der Begriff „Gleiten“ wird hier für eine Intrastrang-Eigenschaft verwendet. Er bedeutet, dass eine Subsequenz mehrmals an verschiedenen Stellen auf ein und demselben Strang auftritt. Wenn ein komplementärer Strang daran hybridisiert, stehen verschiedene Bindungsstellen neben der komplementären Gesamtsequenz zur Verfügung. Ein Gleiten zwischen den hybridisierenden Strängen würde stattfinden. Zum Beispiel erlaubt das Sequenzpaar in Abbildung 5.1 ein Gleiten, das durch die Wiederholung einer 7 Basen langen Subsequenz verursacht wird.

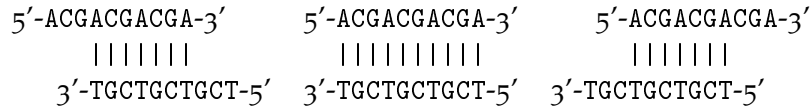


Abbildung 5.1: Gleiten eines komplementären Sequenzpaares verursacht durch die Wiederholung einer 7 Basen langen Subsequenz.

5.3.3 Kontrolle der Intra- und Interstrang-Eigenschaften

EGNAS erlaubt die separate Kontrolle der Intra- und Interstrang-Eigenschaften. Zur Demonstration dieser Möglichkeit soll ein kleiner Satz 10 Basen langer Sequenzen generiert werden. Alle unterschiedlichen Stränge sollen aus 3 Basen langen einzigartigen Subsequenzen bestehen und es darf keine Kreuzhybridisierung zwischen 3 Basen langen Abschnitten auftreten. Demzufolge werden die Interstrang-Eigenschaften mit $L_c = 3$ kontrolliert. Intrastrang-Eigenschaften werden durch die verbotene Länge des Gleitens und die Stammlänge der Haarnadelstrukturen definiert. Aus diesem Grund wird die Länge des Gleitens für 4 Basen lange Subsequenzen ($L_{sl} = 4$) ausgeschlossen. Haarnadelstrukturen werden mit einer Stammlänge größer als 3 Basenpaare nicht erlaubt ($L_{hp} = 4$). Es sind somit keine selbstkomplementären Sequenzen vorhanden, die länger als 6 Basen sind. Die Ergebnisse dieser Sequenzgenerierung werden in Tabelle 5.1 gezeigt. Man kann 3 Basen lange Sequenzen finden, die sich innerhalb ein und desselben Strangs wiederholen, weil das Gleiten für 4 Basen lange Subsequenzen verboten ist ($L_{sl} = 4$). In Übereinstimmung mit $L_{hp} = 4$ gibt es Haarnadelstrukturen mit der maximalen Stammlänge von 3 Basenpaaren und selbstkomplementäre Sequenzen, die maximal 6 Basen lang sind.

Mit $L_c = 3$ und der Gleichung (5.1) beträgt die maximale Satzgröße genau vier Sequenzen, wenn L_c als globale Criton-Regel gilt. Weil aber die Intrastrang-Eigenschaften getrennt behandelt werden, können fünf Sequenzen generiert werden. Demzufolge kann die Satzgröße durch das Ändern der Intrastrang-Eigenschaften erhöht werden, ohne Kreuzhybridisierungen zu riskieren (Abschnitt 6.9).

5.3.4 Wechselwirkungen mit Nachbarsequenzen

Wenn Primer mit TAGs gepaart werden, können neue Kriterien für die TAG-Sequenzen auftreten. Dann kann die Rückfaltung der Primer ein Problem sein. So

Tabelle 5.1: Satz 10 Basen langer Sequenzen mit $L_c = 3$, $L_{hp} = 4$, $L_{sc} = 8$, $L_{sl} = 4$. Die Schleifen der Haarnadelstrukturen werden durch Kleinbuchstaben symbolisiert. Die Punkte stehen für Basen ohne Bedeutung für die jeweils betrachtete Eigenschaft.

Sequenz	Haarnadelstruktur	Selbstkomplementarität	Gleiten
GGCGGCCTTG	GGCgGCC...	...GGCC...	GGCGGC....
GAGATTATTT			...ATTATT.
ACGACGTCCA	ACGaCGT...	..GACGTC..	ACGACG....
AGTAGTGAC	.GTAgTgTACGTAC	.GTA..GTA. AGTAGT....
TTCATGCTGA	.TCAtgcTGA	..CATG....	

verursachen Haarnadelstrukturen Einzelbasenverlängerungen (SBE⁽²⁸⁾-Reaktionen, siehe Abbildung 7.1), obwohl kein Templat vorhanden ist. In der Literatur werden verschiedene Herangehensweisen zur Primer-TAG-Paarung beschrieben. Diese Methoden arbeiten mit Sätzen zuvor gefundener TAG-Sequenzen. HIRSCHHORN *et al.* schlagen dazu die Berechnung einer empirischen Zahl für die Rückfaltung vor [128]. Wenn diese Zahl größer als ein bestimmter Grenzwert ist, wird versucht den SBE-Primer mit einem anderen TAG zu paaren. KADERALI *et al.* verwendeten einen Alignment-Algorithmus, welcher die Berechnung der Änderung der freien Enthalpie als Kriterium für die Primer-TAG-Paarung verwendet [158].

EGNAS begrenzt die Wechselwirkung mit benachbarten Strängen bereits während der Sequenzgenerierung. Daher werden alle möglichen L_{ni} langen komplementären Subsequenzen eines Nachbarstrangs für die Generierung der entsprechenden TAG-Sequenz verboten. Dies gilt speziell für den Entwurf der Stränge, in denen ein molekularer Abstandshalter, ein Spacer⁽²⁹⁾, zwischen der Nachbarsequenz und dem TAG vorgesehen ist. Solch ein Spacer könnte zum Beispiel Hexaethylenglykol sein [146]. Überlappende Subsequenzen, die durch direkte Anknüpfung einer Nachbarsequenz zum 3'- oder 5'-Ende eines TAGs entstehen, werden nicht berücksichtigt. Jedoch wird in Abschnitt 7 gezeigt, dass die Möglichkeiten zur Bildung der Haarnadelstrukturen deutlich reduziert werden, obwohl TAGs direkt ohne Spacer an Nachbarsequenzen angehängt werden.

⁽²⁸⁾ engl. *single-base extension*

⁽²⁹⁾ engl. *spacer*, chemische Modifikation als Abstandshalter oder Verlängerung in Molekülen

5.4 Ablauf des erschöpfenden Algorithmus

Im folgenden Abschnitt wird beschrieben, wie die EGNAS-Software einen Satz mit geeigneten Sequenzen erstellt. Ein vereinfachter Programmablaufplan dieser Software, die auf dem EGNAS-Algorithmus beruht, ist in Abbildung 5.2 dargestellt. Anfangs werden alle L_c Basen lange Subsequenzen in den einbezogenen Sequenzen und Nachbarsequenzen ausgelesen und zusammen mit ihren Komplementen als verbotene Sequenzen gespeichert. Die einbezogenen Sequenzen und Nachbarsequenzen werden zuvor vom Benutzer definiert. Das bedeutet, dass L_c Basen lange Kreuzhybridisierungen zwischen diesen und den generierten Sequenzen nicht auftreten dürfen. Anschließend werden alle möglichen Basissequenzen mit der Länge von L_c Basen erzeugt, die den benutzerdefinierten Kriterien aus Abschnitt 5.2 genügen. Es wird schrittweise eine Zeichenkette von links nach rechts gebildet, indem erlaubte Basissequenzen zufällig kombiniert werden. Nach jedem Schritt wird die wachsende Sequenz gegen die Kriterien geprüft.

Nachdem alle noch vorhandenen Basissequenzen als Suffixe getestet wurden, können Kombinationen vorkommen, die das Anhängen weiterer Basissequenzen verhindern, weil die entstehende Zeichenkette mindestens einem notwendigen Kriterium nicht genügt. In einem solchen Fall wird diese Kombination als verbotene Sequenz gespeichert. Ein Versuch, eine Sequenz erneut aufzubauen, würde also die Basissequenzen auslassen, die zu verbotenen Sequenzen oder Subsequenzen führen.

Eine Sequenz wird dann gespeichert, wenn sie die definierte Länge hat und alle anderen Kriterien erfüllt. Jede L_c Basen lange Subsequenz und ihr Komplement innerhalb dieses generierten Strangs werden verboten und aus der Liste der Basissequenzen entfernt. Danach startet die nächste Sequenzgenerierung durch die analoge Kombination der noch verbleibenden Basissequenzen. Wenn alle Basissequenzen verboten sind oder es keine verwendbaren mehr gibt, wird die Sequenzgenerierung beendet.

Weiterhin kann der Benutzer einen vollständigen Satz erzwingen. Damit existieren keine zusätzlichen Sequenzen mit den gleichen benutzerdefinierten Einschränkungen. Die Generierung eines vollständigen Sequenzsatzes erhöht die Rechenzeit. Die Einschränkung der Satzgröße kann zur deutlichen Reduzierung der Rechenzeit führen (Abschnitt 6.10, Tabelle 6.10).

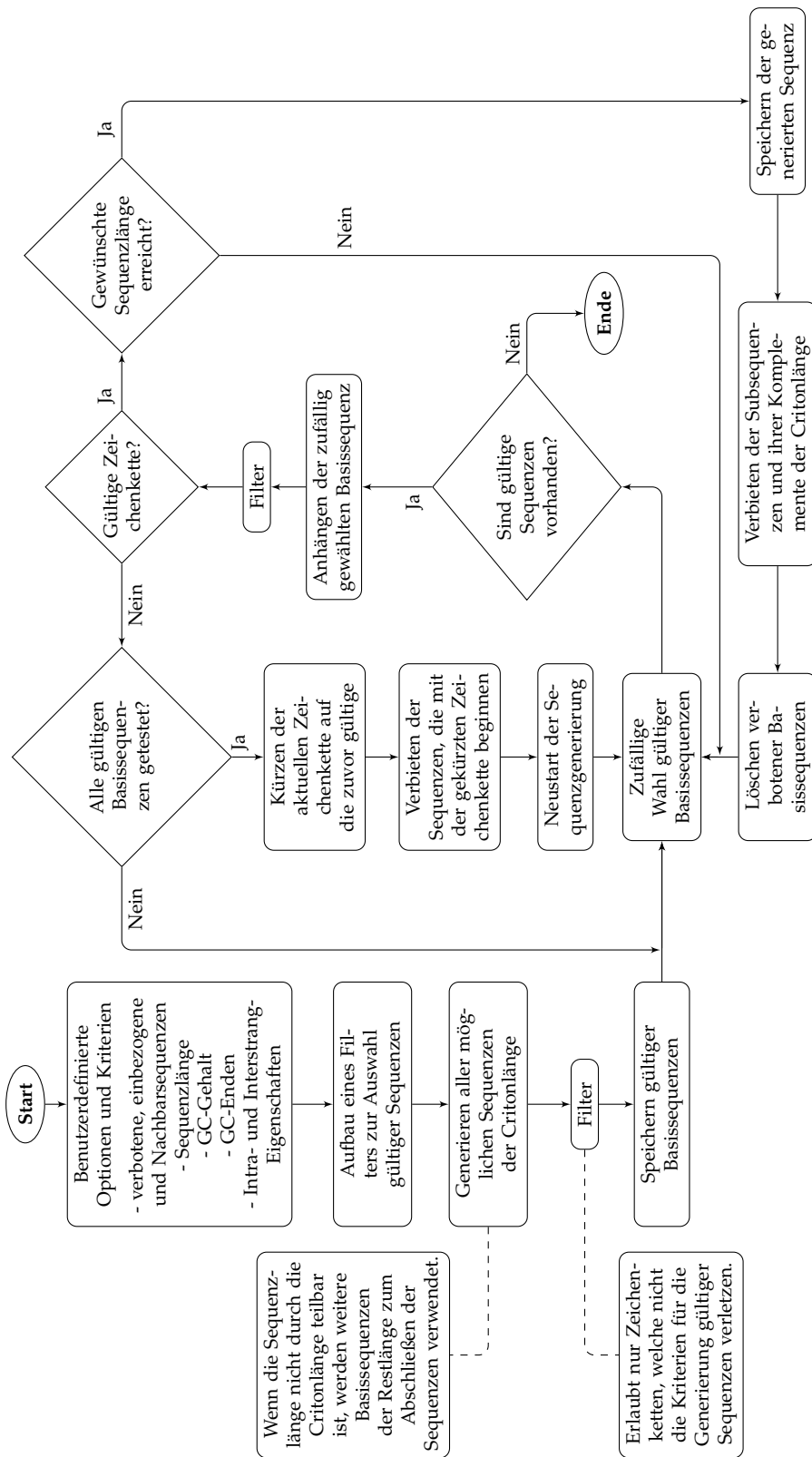


Abbildung 5.2: Vereinfachter Programmablaufplan einer Software auf Grundlage des erschöpfenden EGNAS-Algorithmus.

Kapitel 6

Softwarevergleich und Leistungstests

6.1 Programmierung und Computersystem

Der Sequenzzentwurf-Algorithmus EGNAS ist in der Programmiersprache C++ umgesetzt. Es ist aktuell ein Kommandozeilenprogramm, das für die Betriebssysteme Linux, Mac OS X und Microsoft Windows kompiliert ist. EGNAS ist für nicht kommerzielle Nutzung unter <http://www.chm.tu-dresden.de/pc6/EGNAS> oder <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/13/138> frei erhältlich. Für den Vergleich der Rechenzeiten wurde beim Erzeugen der Sequenzen ein und dasselbe Computersystem mit Intel® Core™ i5 CPU 3,20 GHz und 4 GB RAM verwendet. Als Betriebssystem wurde das 32-Bit Ubuntu 10.04 (Linux) genutzt. Intra- und Interstrang-Eigenschaften werden durch die Analyseoption der Software Seed [164, 165] überprüft.

6.2 Criton-Regeln und Intrastrang-Eigenschaften

Um die EGNAS-Software mit anderen Programmen zu vergleichen, ist es notwendig, zwischen zwei verschiedenen Einstellungen der Optionen für die Sequenzgenerierung zu unterscheiden. Die in Abschnitt 5.3 festgelegten Criton-Regeln können für den gesamten Satz generierter Sequenzen angewendet werden. Das gilt für Seed [164, 165], CANADA [167] und DNASequencesGenerator [154, 159]. In diesen Fällen soll sich auf „globale Criton-Regeln“ bezogen werden.

Für die Intrastrang-Eigenschaften (L_{sc} , L_{sl} und L_{hp} , Abschnitt 5.3) bedeutet das, dass sie wie die Interstrang-Kriterien behandelt werden. Im Einzelnen werden L_{sc}

Basen lange selbstkomplementäre Subsequenzen verboten, wenn die Criton-Länge L_c beträgt. Haarnadelstrukturen mit einer Stammlänge von L_{hp} und das Gleiten L_{sl} Basen langer Subsequenzen werden ebenfalls ausgeschlossen. Dabei gelten die folgenden Beziehungen:

1. $L_c = L_{sl} = L_{hp}$.
2. Für gerade L_c : $L_{sc} = L_c$.
3. Für ungerade L_c : $L_{sc} = L_c + 1$.

Mit EGNAS können Intrastrang-Eigenschaften unabhängig von den Criton-Regeln bestimmt werden. Die Criton-Regeln kontrollieren dabei nur die Kreuzhybridisierungen der unterschiedlichen Sequenzen untereinander, ohne Selbstkomplementarität, Haarnadelstrukturen oder Gleiten zu berücksichtigen.

6.3 Einfluss des GC-Gehaltes und der GC-Enden auf die Satzgröße

Der Einfluss des GC-Gehaltes und der GC-Enden wird untersucht, indem Sequenzsätze mit den globalen Criton-Regeln $L_c = 4$ (Abschnitt 6.2) generiert werden. Diese Sätze werden für jeden möglichen GC-Gehalt der 10 Basen langen Sequenzen erstellt.

Wie in Abbildung 6.1 gezeigt wird, kann die Einschränkung des GC-Gehaltes zu reduzierten Satzgrößen führen. Während 50 % GC-Gehalt nicht notwendigerweise die Sequenzmenge verkleinert, schränken extreme Werte des GC-Gehaltes die Satzgröße deutlich ein. Bei einem GC-Gehalt von 30 % und 70 % beträgt die Satzgröße etwa die Hälfte der Satzgrößen, die ohne Einschränkungen oder mit 50 % GC-Gehalt erzielt wird.

Tabelle 6.1 zeigt, wie die Einschränkung des GC-Gehaltes und der GC-Enden die Satzgrößen beeinflussen. Die Satzgröße wird deutlich gesenkt, wenn GC-Enden gefordert werden und der GC-Gehalt auf exakt 50 % eingestellt wird. Jedoch ist keine Verringerung der Satzgröße ersichtlich, wenn nur eine der beiden Einschränkungen gilt.

Sätze mit der jeweils höchsten Anzahl an Sequenzen sind in Tabelle 6.2 dargestellt. Nach Gleichung (5.2) ergibt sich 17 als maximale Satzgröße. Wenn keine Einschränkungen gewählt sind oder nur der GC-Gehalt auf 50 % gesetzt wird, kann eine

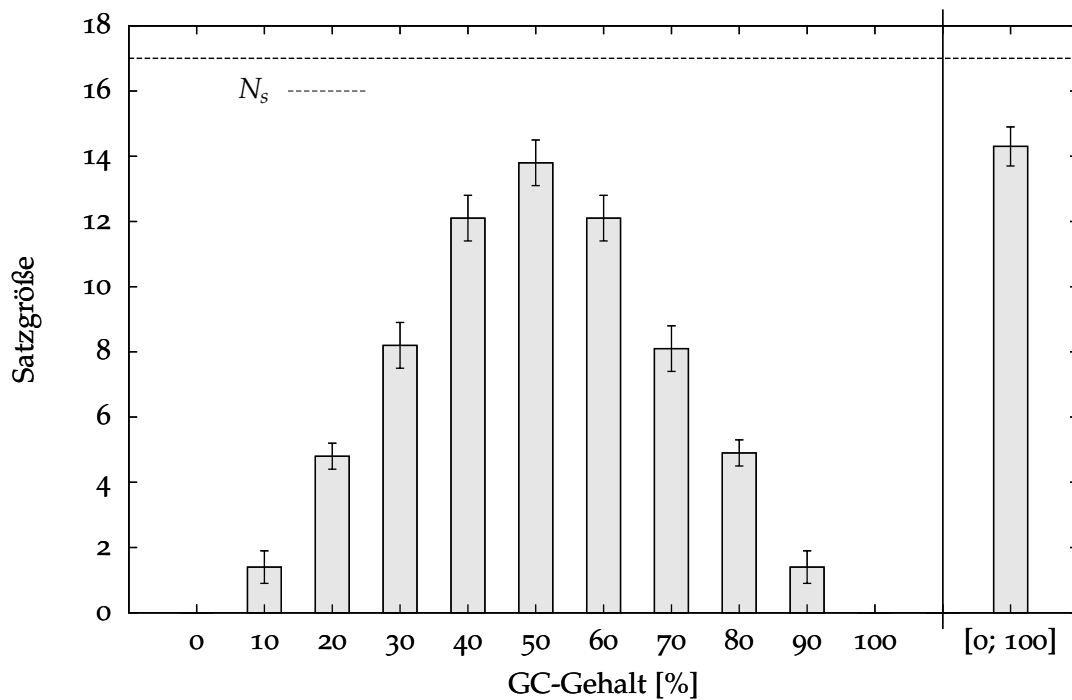


Abbildung 6.1: Satzgrößen bei eingeschränktem GC-Gehalt. Es werden Sätze 10 Basen langer Sequenzen mit $L_c = 4$ für eine globale Criton-Regel generiert. Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 1000 Sätzen bei eingeschränktem GC-Gehalt und aus 10000 Sätzen bei uneingeschränktem GC-Gehalt [0; 100]. Das theoretische Maximum $N(\max) = 17$ nach Gleichung (5.2) ist gezeigt.

Tabelle 6.1: Einfluss des GC-Gehaltes und der GC-Enden auf die Satzgröße. Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 10000 Sätzen. Sätze 10 Basen langer Sequenzen mit $L_c = 4$ für eine globale Criton-Regel.

GC-Gehalt	GC-Enden gefordert?	Satzgröße		
		Mittelwert	Minimum	Maximum
nicht eingeschränkt *	nein	$14,3 \pm 0,6$	12	16
eingeschränkt auf 50% *	nein	$13,8 \pm 0,7$	11	16
nicht eingeschränkt	ja	$13,3 \pm 0,6$	11	15
eingeschränkt auf 50%	ja	$10,0 \pm 0,6$	8	12

* siehe auch Abbildung 6.1

Tabelle 6.2: Sätze 10 Basen langer Sequenzen mit $L_c = 4$ für eine globale Criton-Regel. Unterschiedliche Einschränkungen werden getestet.

Nr.	Keine Einschrän- kungen	GC-Gehalt 50 %	GC-Enden gefordert	GC-Gehalt 50 %, GC-Enden gefordert
	5'→3'	5'→3'	5'→3'	5'→3'
1	AGAAGTAGCA	ATTCTGGTGC	GCCTCCCCTG	CACCAATACG
2	TACATTATCG	GAACCGAGAT	CGGCACGGAC	CGACTTAGAC
3	TGGTGGCGGG	CACAAAGACG	CCCAGATCAG	CGAAATCGTC
4	ATCATCTAAA	GACCTAATCG	CACAGTAGAG	CCCTGATAAC
5	AGTGACGAGC	GGGCAGTTAT	GCCCATCCAG	GCCGTTTTAC
6	GCCTGGATTG	GCTGTTGGAT	CCTTGGCGTC	GCTCATTAC
7	GCTTTGAACG	CGGGTAGTAA	CAATCACCGC	CTACAAGCAC
8	CCTATGCGAA	TTGCTCAAGG	GGCTTTTCTC	CTGGAAGATG
9	TACCTTGTGC	CGAAATACGG	GGTCGTTATC	GACCTATGTG
10	AGCGTATTCC	CGTGTCACTT	GTGGTAAACC	CAACAGTGTC
11	GTGTCGGCAG	GATAGCGGAA	CGCAACATAC	GAGAGTTCTG
12	ATGGGGACTG	CCCTGATGTA	GTGTCTTCGC	CTCCTTTGAC
13	ACCCTCTTAC	TATGGGGAGT	GAACCTAGTG	
14	GGGCTGTTGG	TAAAACGCCG	CTATTTGAGC	
15	GGAGACCGTG	AGTCGCATTG	GGAATGCTGC	
16	AAAACTCAGA	ATGAAGCCAC		

Ausbeute von 94 % (16 Sequenzen) erzielt werden. Dies sind hohe Satzgrößen im Vergleich mit Rechnungen, die durch FELDKAMP [161] durchgeführt wurden.

6.4 Satzgröße in Abhängigkeit von der Sequenz- und Criton-Länge

Tabelle 6.3 zeigt die Abhängigkeit der Satzgröße von der Kombination der Sequenz- und Criton-Länge. Für jede der 124 Kombinationen werden 10 Sätze mit L_c für eine globale Criton-Regel erstellt. In Übereinstimmung mit den Gleichungen (5.1) und (5.2) wächst die Satzgröße mit steigender Criton-Länge und sinkender Sequenzlänge. Die Criton-Länge hat den höchsten Einfluss auf die Satzgröße, da L_c im Exponenten der Gleichungen steht (Abschnitt 5.1). FELDKAMP stellte eine analoge Tabelle auf [161].

Im Mittel generierte FELDKAMP $84,4 \pm 4,3$ % der jeweils maximal möglichen Anzahl der Sequenzen pro Satz. EGNAS hat eine etwas höhere mittlere Ausbeute von 87,0

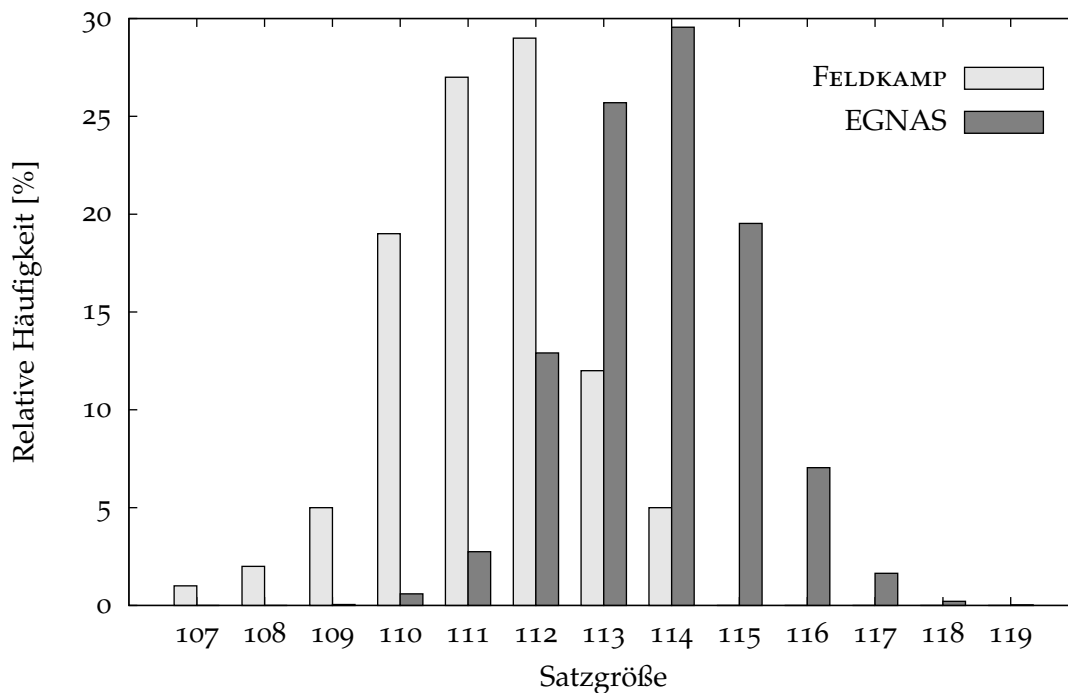


Abbildung 6.2: Histogramm der Satzgrößen. Vergleich der Ergebnisse der EGNAS-Software und der Software von FELDKAMP [161]. 20 Basen lange Sequenzen mit $L_c = 6$ für eine globale Criton-Regel. Relative Häufigkeiten der Satzgrößen. 10000 Sätze werden generiert.

$\pm 4,6\%$. Bei 120 der 124 unterschiedlichen Kombinationen aus Tabelle 6.3 konnten mit EGNAS gleiche oder höhere Satzgrößen erzielt werden als mit FELDKAMPS Software.

6.5 Schwankung der Sequenzgröße

Eine weitere interessante Eigenschaft der Sequenzsätze ist die Verteilung ihrer Größen bei sonst gleichen Optionen der Sequenzgenerierung. In Abbildung 6.2 werden die Ergebnisse der EGNAS-Software und der Software von FELDKAMP [161] verglichen. Die Kombination 20 Basen langer Sequenzen mit $L_c = 6$ wird für eine globale Criton-Regel gewählt. FELDKAMP generierte 100 Sätze mit diesen Einstellungen. Jedoch werden 10000 mit EGNAS erhaltene Sätze ausgewertet, um eine höhere statistische Sicherheit zu erzielen.

Die meisten der von FELDKAMP erstellten Sätze enthalten 112 Sequenzen, wobei mit EGNAS die meisten Sätze 114 Sequenzen aufweisen. In beiden Fällen treten diese Satzgrößen mit einer relativen Häufigkeiten von etwa 30 % auf.

Tabelle 6.3: Satzgrößen in Abhängigkeit von der Sequenzlänge (L_s) und Criton-Länge für globale Criton-Regeln. Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 10 Sätzen. Theoretisch maximal mögliche Satzgröße in Klammern.

L_s	Criton-Länge							
	4		5		6		7	
10	14,2 \pm 0,6	(17)	73,8 \pm 1,2	(85)	348,9 \pm 2,4	(403)	1802,6 \pm 7,6	(2048)
11	12,7 \pm 0,7	(15)	63,8 \pm 0,9	(73)	289,8 \pm 2,8	(336)	1426,1 \pm 8,7	(1638)
12	11,4 \pm 0,5	(13)	54,4 \pm 0,7	(64)	246,2 \pm 3,2	(288)	1183,2 \pm 4,0	(1365)
13	9,7 \pm 0,5	(12)	48,8 \pm 1,0	(56)	214,4 \pm 3,0	(252)	1008,4 \pm 4,9	(1170)
14	8,9 \pm 0,6	(10)	43,9 \pm 0,6	(51)	190,9 \pm 1,9	(224)	876,8 \pm 2,9	(1024)
15	8,1 \pm 0,3	(10)	40,0 \pm 0,5	(46)	172,1 \pm 1,7	(201)	784,0 \pm 1,9	(910)
16	7,7 \pm 0,5	(9)	36,4 \pm 1,0	(42)	155,6 \pm 1,3	(183)	704,2 \pm 3,7	(819)
17	7,0 \pm 0,0	(8)	34,3 \pm 0,8	(39)	142,5 \pm 1,3	(168)	639,8 \pm 3,3	(744)
18	6,4 \pm 0,5	(8)	31,2 \pm 0,4	(36)	131,2 \pm 1,8	(155)	585,9 \pm 3,6	(682)
19	5,9 \pm 0,3	(7)	28,9 \pm 0,6	(34)	122,5 \pm 0,8	(144)	542,6 \pm 4,2	(630)
20	5,9 \pm 0,3	(7)	27,6 \pm 0,8	(32)	113,8 \pm 1,6	(134)	502,8 \pm 2,3	(585)
21	5,6 \pm 0,5	(6)	25,8 \pm 0,4	(30)	106,5 \pm 1,3	(126)	469,0 \pm 2,9	(546)
22	5,0 \pm 0,0	(6)	24,8 \pm 0,6	(28)	100,1 \pm 1,0	(118)	442,7 \pm 2,9	(512)
23	5,0 \pm 0,0	(6)	23,3 \pm 0,5	(26)	94,9 \pm 1,2	(112)	416,0 \pm 1,9	(481)
24	4,6 \pm 0,5	(5)	21,9 \pm 0,6	(25)	89,6 \pm 0,7	(106)	392,9 \pm 2,1	(455)
25	4,1 \pm 0,3	(5)	20,8 \pm 0,4	(24)	84,8 \pm 1,3	(100)	372,3 \pm 1,3	(431)
26	4,0 \pm 0,0	(5)	19,9 \pm 0,3	(23)	80,8 \pm 1,2	(96)	353,8 \pm 1,5	(409)
27	4,0 \pm 0,0	(5)	19,3 \pm 0,5	(22)	77,2 \pm 1,1	(91)	338,3 \pm 1,6	(390)
28	4,0 \pm 0,0	(4)	18,3 \pm 0,5	(21)	73,8 \pm 1,2	(87)	320,9 \pm 1,5	(372)
29	4,0 \pm 0,0	(4)	17,7 \pm 0,5	(20)	70,7 \pm 1,2	(84)	308,1 \pm 1,7	(356)
30	3,9 \pm 0,3	(4)	16,9 \pm 0,6	(19)	68,4 \pm 1,6	(80)	296,4 \pm 1,8	(341)
31	3,1 \pm 0,3	(4)	16,4 \pm 0,5	(18)	65,3 \pm 0,7	(77)	285,2 \pm 2,2	(327)
32	3,0 \pm 0,0	(4)	15,8 \pm 0,4	(18)	63,5 \pm 0,5	(74)	272,8 \pm 2,0	(315)
33	3,0 \pm 0,0	(4)	15,2 \pm 0,4	(17)	60,6 \pm 0,8	(72)	263,7 \pm 1,6	(303)
34	3,0 \pm 0,0	(3)	14,7 \pm 0,5	(17)	58,7 \pm 0,5	(69)	255,3 \pm 1,6	(292)
35	3,0 \pm 0,0	(3)	14,3 \pm 0,5	(16)	56,6 \pm 0,5	(67)	246,0 \pm 1,5	(282)
36	3,0 \pm 0,0	(3)	13,9 \pm 0,3	(16)	54,7 \pm 0,5	(65)	238,8 \pm 1,5	(273)
37	3,0 \pm 0,0	(3)	13,6 \pm 0,5	(15)	53,3 \pm 0,8	(63)	230,9 \pm 1,2	(264)
38	3,0 \pm 0,0	(3)	13,0 \pm 0,0	(15)	51,7 \pm 0,5	(61)	223,7 \pm 0,9	(256)
39	3,0 \pm 0,0	(3)	12,8 \pm 0,4	(14)	50,1 \pm 0,7	(59)	217,1 \pm 2,0	(248)
40	3,0 \pm 0,0	(3)	12,3 \pm 0,5	(14)	48,8 \pm 0,6	(57)	210,6 \pm 1,7	(240)

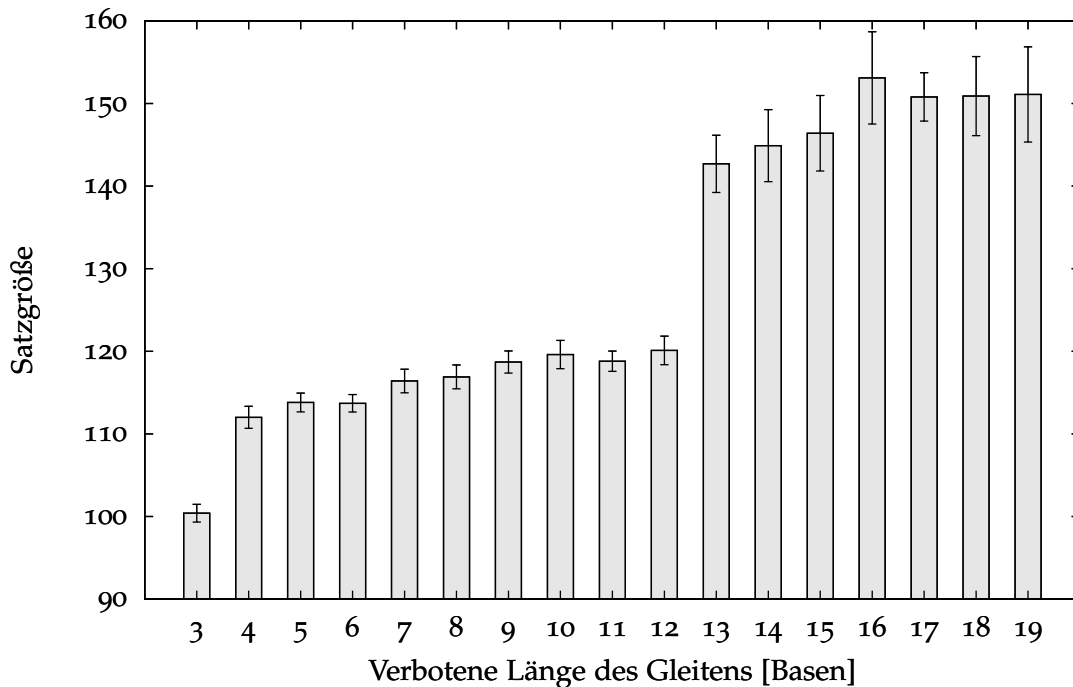


Abbildung 6.3: L_{sl} -Einfluss auf die Satzgröße. Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 10 Sätzen für jedes L_{sl} . Es werden Sequenzen der Länge von 20 Basen generiert. Die globalen Criton-Regeln werden durch $L_c = 6$ bestimmt, wobei L_{sl} variiert wird.

6.6 Gleiten und dessen Einfluss auf die Satzgröße

Mit EGNAS ist es möglich, die Wiederholung der Subsequenzen einer bestimmten Länge innerhalb ein und desselben Strangs zu kontrollieren. Folglich konnten Sequenzsätze mit $L_c = 6$ für globale Criton-Regeln erzeugt werden. L_{sl} wird dabei variiert. Die Ergebnisse dieser Rechnungen sind in Abbildung 6.3 gezeigt.

Bei $L_{sl} = 6$ gelten die globalen Criton-Regeln und es werden im Mittel $113,8 \pm 1,1$ Sequenzen generiert. Eine deutliche Reduzierung der Sequenzgröße auf $100,4 \pm 1,1$ Sequenzen wird für $L_{sl} = 3$ beobachtet. Das ist dadurch bedingt, dass die Verringerung der L_{sl} die Anzahl verwendbarer Basissequenzen reduziert. Eine beträchtliche Steigerung der Satzgröße auf $142,7 \pm 3,5$ Sequenzen erhält man für $L_{sl} = 13$. Hierbei ist L_{sl} für die Wiederholung einer ganzen Basissequenz groß genug. Demzufolge werden für einen kompletten Strang weniger Basissequenzen gebraucht und es bleiben mehr verwendbare Basissequenzen für die Generierung weiterer Stränge.

6.7 Steuerung der Intrastrang-Eigenschaften

Selbstkomplementarität und Haarnadelstrukturen sind die Hauptursachen für die Ausbildung der Sekundärstrukturen. Die Entstehung solcher Strukturen steht in Konkurrenz zur definierten Hybridisierung mit DNA-Strängen. Deshalb wird eine schnelle und sensitive Detektion auf Mikroarrays durch Sekundärstrukturen erschwert [100, 146]. Dementsprechend werden Sequenzen mit minimaler Criton-Länge, L_c , für eine globale Criton-Regel generiert. Zusätzlich werden Selbstkomplementarität und die Möglichkeit zur Bildung der Haarnadelstrukturen unterbunden. Für die Abschätzung der Stabilitäten der Sekundärstrukturen wird der DINAMelt Web Server⁽³⁰⁾ verwendet [173]. Diese Stabilitäten werden als molare freie Enthalpien, ΔG , der stabilsten Haarnadelstrukturen bei 37 °C und 1 M Natriumionen berechnet. FELDKAMP *et al.* generierten 22 Basen lange Sequenzen mit der Einzigartigkeit $L_c = 5$ und wählten daraus die Sequenzen mit den am wenigsten stabilen Sekundärstrukturen [174]. In Tabelle 6.4 werden die von FELDKAMP *et al.* und die mit EGNAS generierten Sequenzen gegenübergestellt, um die theoretischen Stabilitäten möglicher Sekundärstrukturen zu vergleichen.

Haarnadelstrukturen werden durch die Wahl $L_{hp} = 2$ vermieden. Trotz dieser Einschränkung kann die gleiche Satzgröße wie bei FELDKAMP *et al.* erreicht werden. FELDKAMPS *et al.* Software ist jedoch nicht in der Lage, die Intrastrang-Eigenschaften separat zu behandeln. Was zur Folge hat, dass bei FELDKAMP *et al.* beispielsweise eine Haarnadelstruktur mit der Stammlänge von 4 Basenpaaren in Sequenz Nr. 11 (5'-CAAGgtctgCTTG.....-3') auftritt. Wenn kein Falten der Stränge beabsichtigt wird, verbessert die Einschränkung des Parameters L_{hp} die Sequenzqualität beträchtlich. Andererseits führen kleinere Werte für L_{hp} zu kleineren Satzgrößen. Dieser Umstand wird in Tabelle 6.5 deutlich, wo L_{hp} variiert wird und $L_c = L_{sc} = L_{sl} = 6$ für 20 Basen lange Sequenzen gilt. Eine klare Verringerung der Satzgröße ergibt sich für $L_{hp} = 2$. Für $3 < L_{hp} < 6$ ist eine reduzierte Satzgröße nicht ersichtlich.

Weitere Beispiele für das Vermeiden der Haarnadelstrukturen sind in Tabelle 6.6, Tabelle 6.7 und Tabelle 6.8 gegeben. TANAKA *et al.* [156] und FELDKAMP *et al.* [159] publizierten Sätze mit 20 Basen langen Sequenzen. Mit der EGNAS-Software konnten entsprechende Sequenzen mit niedrigeren Stabilitäten der Haarnadelstrukturen entworfen werden. Dabei konnte zusätzlich die Satzgröße von 14 auf 16 Sequenzen gesteigert werden.

⁽³⁰⁾ <http://mfold.rna.albany.edu/?q=DINAMelt/Two-state-folding>, 18. März 2013

Tabelle 6.4: Vergleich 22 Basen langer Sequenzen, die von FELDKAMP *et al.* [174] oder mit EGNAS generierter sind. Die Subsequenzen {GGG; CCC} sind verboten. GC-Enden sind gefordert. Molare freie Enthalpien der stabilsten Haarnadelstrukturen.

Nr.	ΔG [$\frac{kcal}{mol}$]	FELDKAMP <i>et al.</i> 5'→3'	ΔG [$\frac{kcal}{mol}$]	EGNAS 5'→3'
1	-0,3	CCTGCGTCGTTTAAGGAAGTAC	*	GCTCATTTTTACACTCTCCACCG
2	0,6	CAGCCAAGATTCTTTTACCGCC	*	CACACGGAGGCACAGAATAAAC
3	0,4	CCATCATGTGTGCCGAGATATG	*	GAACAGCGAAGAGATAGGAAGG
4	0,3	CTTCTCCTAACTGCACGGAATG	*	CCTTACTCGCCTTTCACATTCC
5	-0,3	GGTCCGGTCATAAAGCGATAAG	*	CAACTCACGCCACTACATCAAC
6	0,7	GTCCCTCGCCTAGTGTTCATTG	2,4	CAAGCCGTCAATAGTCCAAGTC
7	0,2	GGATCTGGCGCATAGACAATTC	2,1	CTGCTGAACCTGATACCGAAAC
8	-0,1	CACGTCACTGTTAATCCGAAGC	1,8	CAGTATTTCCAGTCAGTTCCGC
9	-0,1	GTGAAAAGTGGCAATCGTGAAG	1,8	CCTGTGTTTTTCTATGCTCCTG
10	0,6	GGACGAATACAAAGGCTACACG	1,8	CCTGCCGATGACCTACTTTTTG
11	-2,4	CAAGGTCTGCTTGATTTGGAGG	1,6	CCGTTCTTTGTCTTGCTTCTC
12	-0,9	GTTTTGAACGTAGTAGAGCCGG	1,5	GTGATTGGCTGGTGTGGTTTG
13	-0,2	GTAGGTGTCGGTGCGAAATTAG	1,3	GCTCGTGGTCTTGTATGTCTG
14	-0,1	CTAGAACCGTTACGAGTTTGCG	1,1	GTAGATTTGAGGTGCGTTGTGG
L_c		5		5
L_{hp}		5		2
L_{sc}		6		4
L_{sl}		5		5

* keine Haarnadelstruktur möglich

Tabelle 6.5: L_{hp} -Einfluss auf die Satzgröße bei 20 Basen langen Sequenzen. $L_c = 6$ für eine globale Criton-Länge, abgesehen von unterschiedlichen Werten für L_{hp} . Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 10 Sätzen, die für jeden getesteten L_{hp} -Wert generiert werden.

Verbotene Stammlänge	Satzgröße
2	61,8 \pm 1,2
3	111,6 \pm 1,3
4	113,7 \pm 1,5
5	113,6 \pm 1,2
6	113,8 \pm 1,5

Tabelle 6.6: Vergleich 20 Basen langer Sequenzen, die von TANAKA *et al.* [156], FELDKAMP *et al.* [159] und mit EGNAS generiert werden. Molare freie Enthalpien der stabilsten Haarnadelstrukturen.

Nr.	ΔG [$\frac{kcal}{mol}$]	TANAKA <i>et al.</i> 5'→3'	ΔG [$\frac{kcal}{mol}$]	FELDKAMP 5'→3'	ΔG [$\frac{kcal}{mol}$]	EGNAS 5'→3'
1	1,1	ATGTACGTGAGATGCAAGCAG	1,0	TAGTCGCCGTGATTTGGAAGG	*	GAGAAGGAACACGATACAGC
2	1,1	ATCACTACTCGGTGGTCACT	0,9	GCTGTCTTTTCGTAATACCG	*	CCTTACACATTTCTTCGGCC
3	0,6	AGATGATCAGCAGCGGACACT	0,3	CTGAACGGAACTTAGAGCG	*	CACAAATGAACTTACCGCTC
4	0,5	TCTGTACTGCTGACTCGAGT	-0,1	GTCTAACGGTTCTTACGGCT	2,4	CCTGTCCATCTTTTCGGCTTC
5	0,3	ACATCGACACTACTAGCGCAC	-0,2	AAAGCCGTCGTTTAAAGGAGC	2,1	CTGGCTATGAAACTGAACG
6	-0,2	GCTGACATAGAGTGGGATAC	-0,2	AATCGCAGTACAGATGGTGG	1,8	CTGGGTCTAAATCTGCTCTC
7	-0,5	TGTGCTCGTCTTGGCATACT	-0,2	GGATGACCAGAGCACTTCAA	1,8	GCCGTTATCCTCTGTTTGTG
8	-0,5	TCAGAGATACTCACTGCACG	-0,6	TACGTCTCGAACTGATAGCC	1,8	GGTTTATTGAGGTTGCGAGG
9	-0,8	CGAGTAGTCACAGATGAGA	-0,8	TGATCTTTAAAGGCCGCGC	1,8	CCTCCGATTTTGCCCTTGTG
10	-0,9	CGAGACATCGTGCATATCGT	-0,8	TACGATACTTGGCGAGCGCAT	1,5	GTTGTAGTTCGTTGGTGGTC
11	-1,2	AGACGAGTCTGTCAGGTACAG	-0,9	TGCAGAAAAACTATAGCCGCC	1,5	CTTGGGCTGTTCTATTCTTG
12	-1,8	TATAGCAGCAGTGGCGGTAT	-1,1	GCGCGGACAATTCATTTGGTT	1,4	GGCTCACTCATGCACACTAAC
13	-2,2	GATCTAGCATCATGAGAGCG	-1,7	CCGCAATCCGGTGAATTTAG	1,4	CCTTTACGCCCTGACTTTGAC
14	-2,3	GACAGAGCTATCAGCTACTG	-3,0	CTTAGGCAGGTTGCCACATAT	1,3	CCTGGGTCTTATGTCTCTTG
15					0,9	GCGTGAATGAAGTGAAGTAG
16					0,9	GGATTACTTGGCTTGGACTGG
						GC-Enden gefordert
				#		§
L_c		9		5		5
L_{hp}		5		5		2
L_{sc}		10		6		4
L_{sl}		7		5		5

* keine Haarnadelstruktur möglich

ohne (GGG, CCC)

§ ohne (GGG, CCC; AAAA, TTTT)

6.8 Rechnungen mit einbezogenen Sequenzen

Eine andere hilfreiche Option eines Sequenzzentwurf-Algorithmus ist die Möglichkeit bereits existierende Sequenzen in die Rechnungen einzubeziehen. Folglich ist die Kreuzhybridisierung der neu generierten Sequenzen mit einbezogenen Strängen kontrollierbar. Der EGNAS-Benutzer kann beliebige Sequenzen einbeziehen. Diese können Sequenzen natürlich vorkommender, genomischer DNA sein. Denkbar sind auch Sequenzen der Plasmide, Klonierungsvektoren, Primer oder zuvor entworfener Sätze mit bestimmten Eigenschaften. Als Beispiel ist in Tabelle 6.7 eine schrittweise Generierung der Sequenzen gezeigt. Die Sequenzen, welche von ARITA *et al.* [152] und FELDKAMP *et al.* [159] vorgeschlagen werden, sind neben denen mittels EGNAS generierten dargestellt. Im ersten Schritt werden neun Sequenzen der Länge von 15 Basen gefunden. Diese Sequenzen werden in die zweite Sequenzgenerierung einbezogen, um weitere vier 20 Basen lange Sequenzen zu entwerfen. Im Vergleich zu Sequenzen, die von ARITA *et al.* [152] und FELDKAMP *et al.* [159] vorgeschlagen werden, kann mit EGNAS eine zusätzliche Sequenz mit der Länge von 20 Basen gefunden werden. Dies ist trotz der zusätzlich geforderten GC-Enden und der stark eingeschränkten Sekundärstrukturen möglich. Alle theoretisch möglichen Sekundärstrukturen konnten in diesen Rechnungen eliminiert werden.

Die Optimierung der Sequenzen ist auch mit einer schrittweisen Strategie realisierbar. Dabei wird zuerst mit starken Einschränkungen der Sequenzeigenschaften begonnen. In den nächsten Generierungen werden diese Einschränkungen solange abgeschwächt, bis die gewünschte Satzgröße erreicht ist.

Beispielhaft werden zuerst die Intrastrang-Eigenschaften durch die Wahl $L_{hp} = 2$ kontrolliert. Mit dieser Einschränkung konnte eine Satzgröße von maximal 14 Sequenzen erreicht werden. Für die nächsten Sequenzen werden schließlich Haarnadelstrukturen mit der Stammlänge 2 erlaubt, indem $L_{hp} = 3$ gesetzt wird. Zusätzlich wird Guanin verboten. Durch die L_{hp} -Erhöhung ist die Sequenzgenerierung variabler. Das Verbot des Guanins ermöglicht aber nur Haarnadelstrukturen mit maximal zwei aufeinanderfolgenden Adenin/Thymin-Basenpaaren und keine Guanin/Cytosin-Basenpaare. Solche Haarnadelstrukturen sind weniger stabil als jene mit Guanin/Cytosin-Basenpaaren. Demnach stellen andere Autoren Entwurf-Algorithmen vor, die nur {A; T; C} für die Sequenzgenerierung verwenden, um Haarnadelstrukturen zu vermeiden [153, 175]. Luminex[®] bietet ein TAG/Anti-

Tabelle 6.7: Vergleich der 15 und 20 Basen langen Sequenzen, die von Arrira *et al.* [152], Feldkamp *et al.* [159] und mit EGNAS generiert werden. Molare freie Enthalpien der stabilsten Haarnadelstrukturen. *Keine Haarnadelstruktur möglich. Es können keine theoretisch möglichen Sekundärstrukturen für alle Sequenzen, die mittels EGNAS erzeugt werden, gefunden werden.

Nr.	ARRIRA <i>et al.</i>		FELDKAMP <i>et al.</i>		EGNIAS	
	ΔG [$\frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$]	5'→3'	ΔG [$\frac{\text{kcal}}{\text{mol}}$]		5'→3'	
1	2,5	CCGTCTTCTTCTGCT	1,5	AAAGCCGTGGTTCC	GAGAGAAACGGCAAC	
2	*	TTCCCTCCCTCTCTT	1,0	TTGTGTAICTGTGG	CGCAAACTCACCTAC	
3	3,0	CGTCCCTCTTGT	1,1	TATTAGATGGCCGCC	GCCTTTACATCTCCG	
4	*	CCGCTTCTTGTCCCT	1,3	CTAGCTCCTTTGTCC	GAGAAAGACAAGGCC	
5	2,5	TGCCCTCTTGTTCCT	0,5	GCATTGTAGTGGCTG	CATACGAAAGCACACC	
6	*	CTCCTCTTCCCTTGGCT	-0,5	GGCATATAGCGTGGAC	CCAGCCGATTAACAAC	
7	*	CTTCTCCCTTCCCTCT	-0,4	GTTATTGGACCTCCG	GACGAACAGCAAGAC	
8	*	CGTTCCTTCCCTCTT	-0,1	AGTCATGACCAACG	CAAGGCTCATCCAAG	
9	2,8	TCCCTTGTGTGTGT	-2,4	GAACGGTTAACCGATC	CACGGCATTAACCAG	
10	-1,4	GAGAGAGAGGCCCTATCC	-0,6	AAAGACGTGTGAAGTGGCT	CTACACTCTTCACTTCCACC	
11	-2,2	GAAGAGAAAGGGCACCCCTCC	-0,9	GACGAAAGTTCAAGCAGCGAA	GCCTCATTTCTTACCTCCTTC	
12	0,6	GTGGTGTGGCGTCCCTTCCC	0,1	TGTTAAATCAGGCTCGGCC	GAGACCGAAAGATAGCAGAG	
13					CAACCGCTCAATCTACTCC	
				#		GC-Enden gefordert
L_c		10		5		§
L_{hp}		5		5		
L_{sc}		6		6		
L_{sl}		8		4		

* keine Haarnadelstruktur möglich

ohne {GGG; CCC}

§ ohne {GGG; CCC; AAAA; TTTT}

TAG-System mit diesem Konzept an [176]. Die 14 zuvor generierten Sequenzen werden beim Sequenzzentwurf einbezogen, um den Sequenzsatz zu erweitern. Infolgedessen konnten 6 weitere Sequenzen generiert werden. Das Ergebnis dieser Herangehensweise ist in Tabelle 6.8 gezeigt. Es sind 15 Basen lange Sequenzen gegenübergestellt, die von FAULHAMMER *et al.* [153], FELDKAMP *et al.* [159] und mit EGNAS generiert werden. EGNAS bietet bessere Sequenzen in Bezug auf Sekundärstrukturen, weil die minimalen molaren freien Enthalpien der stabilsten Haarnadelstrukturen der durch FELDKAMP *et al.*, FAULHAMMER *et al.* und EGNAS generierten Sätze $-0,7$ kcal/mol, $0,1$ kcal/mol und $1,8$ kcal/mol betragen. Beim Vergleich der Criton-Länge $L_c = 5$ und des GC-Gehaltes von 40% gibt es keine Verbesserung zu Feldkamps Sequenzen. Dennoch wird eine bedeutende Reduktion der Stabilität der Sekundärstrukturen erreicht, denn die verbotene Stammlänge wird von $L_{hp} = 5$ auf $L_{hp} = 3$ herabgesetzt. Im Gegensatz zu Feldkamps Sequenzen werden GC-Enden gefordert. Es wird dennoch die gleiche Satzgröße erreicht.

6.9 Abwägen der Intra- und Interstrang-Eigenschaften

Weitere Vorteile der Unterscheidung globaler Criton-Regeln und Intrastrang-Eigenschaften werden untersucht. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 6.9 zusammengefasst. Die mittels EGNAS generierten Sequenzen werden mit denen von SHIN *et al.* [155] und von FELDKAMP *et al.* [159] verglichen. Es sind nur sieben 20 Basen lange Sequenzen in einem Satz. Es wird gezeigt, dass der EGNAS-Benutzer Intra- und Interstrang-Eigenschaften gegeneinander abwägen kann, um die erforderliche Satzgröße zu erreichen.

Weil mit $L_c = 5$, $L_{hp} = 2$ und $L_{sl} = 5$ die Satzgrößen von 7 Sequenzen deutlich überschritten werden, kann das Gleiten auf $L_{sl} = 3$ verkleinert werden. Für den ersten Satz werden GC-Enden gefordert und für den zweiten werden L_{sl} von 3 auf 6 Basen sowie L_{hp} von 2 auf 3 Basenpaare erhöht. L_c wird von 5 auf 4 Basen gesenkt. Folglich wird ein Gleiten 5 Basen langer Subsequenzen akzeptiert. Außerdem wird Adenin und Thymin als terminale Basen erlaubt, um insgesamt 7 Sequenzen generieren zu können. Das verstößt gegen die globalen Criton-Regeln mit $L_c = 5$. Dennoch würde keine Kreuzhybridisierung zwischen verschiedenen Strängen mit 4 Basen langen Subsequenzen stattfinden. In beiden mittels EGNAS generierten Sätzen ist die Stabilität der Haarnadelstrukturen geringer im Vergleich zu den Sätzen von SHIN *et al.* [155] bzw. FELDKAMP *et al.* [159].

Tabelle 6.8: Vergleich der molare freie Enthalpien (ΔG) der stabilsten Haarnadelstrukturen zwischen Sätzen 15 Basen langer Sequenzen, die durch FAULHAMMER *et al.* [153], FELDKAMP *et al.* [159] und EGNAS erstellt sind.

Nr.	ΔG [$\frac{kcal}{mol}$]	FAULHAMMER <i>et al.</i> 5'→3'	ΔG [$\frac{kcal}{mol}$]	FELDKAMP <i>et al.</i>	ΔG [$\frac{kcal}{mol}$]	EGNAS 5'→3'
1	*	ATCCTCCACTTCACA	*	CTTCTCTCACCTATA	*	CCTACAAATCAACTC
2	*	CTATTTCTCCACACC	*	GGCAAGAGGAATAAT	*	CTAAACACATCCAAC
3	*	CACCCTTTCTCCTCT	2,0	GCGAAAATTAACTCC	*	GCAGAACAAGATAAG
4	*	TCCTCACATTACTTA	1,9	GATCCGGTTACTAAA	*	CCTTCACTTACATTC
5	*	ACTTCCTTTATATCC	1,9	ACCTGACTCGTAATA	*	CTCTCACAATCTAAC
6	*	TCCACCAACTACCTA	1,6	TAAGTATATCGTGCC	*	CAATTTAACCTCCTC
7	2,6	AACTCTCAAAATCAA	1,6	GTCTGAGCTGATAAA	*	CTTCCATATACACTC
8	2,6	ACCTTACTTTCATA	1,5	GTACCGTTGAATTGT	*	CCACACCTTAATATC
9	2,1	CTCTTACTCAATTCT	1,2	TGCGACTATGTTATG	*	CTATAATTCTCCACC
10	2,1	GTACATTCTCCCTAC	1,1	TTACAGCGTTTTACC	2,8	CGTTGTCTCTATTTT
11	1,8	TTATAACAAACATCC	1,0	AAAGCCGTCAAATAC	2,6	GTTTCAGTATTCGTTC
12	1,8	TTTTAAATTTACAAA	1,0	TACCTTTTTGTCTCG	2,5	GTAGCGAAGAAAATG
13	1,6	ATAATCACATACTTC	0,8	ACAGGCGTATCTAAT	2,5	GGTTGCGTTTTATTG
14	1,6	CATTCCTTATCCCAC	0,4	AGTGACACTAGCATT	2,5	CATCGTCAAGTAAAG
15	1,4	CATATCAACATCTTA	0,4	ATGAGGCAGTCTTTA	2,5	CTTTGGTCTGTTATG
16	1,4	TTAAAATCTTCCCTC	0,2	AAGCTATTGATTGGC	2,2	GTCTTTTTGCTTTTCG
17	1,3	CTAACCTTTACTTCA	0,1	CACTTGAGTACAACA	2,2	GCAGTTTCATAGTTC
18	1,2	GCTTCAAACAATTCC	0,1	GGATGTCCTTGTTTA	2,0	CTTCTACTACCTATC
19	1,2	ACATAACCCTCTTCA	-0,3	ACCAAACCATGATGA	1,9	GATTAGTGGTTTGAG
20	0,1	CATAATCTTATATTC	-0,7	TGGTAGGCCATTTAA	1,8	CTCATCATTACCATC
				#		#
						GC-Enden gefordert
L_c		8		5		5
L_{hp}		5		5		3
L_{sc}		8		6		6
L_{sl}		5		5		5

* keine Haarnadelstruktur möglich

ohne {GGG; CCC}

Tabelle 6.9: Vergleich der 20 Basen langen Sequenzen, die von SHIN *et al.* [155], FELDKAMP *et al.* [159] und mit EGNAS generiert werden. Molare freie Enthalpien der stabilsten Haarnadelstrukturen.

Nr.	ΔG [$\frac{kcal}{mol}$]	SHIN <i>et al.</i> 5'→3'	ΔG [$\frac{kcal}{mol}$]	FELDKAMP <i>et al.</i> 5'→3'
1	0,8	AGGCGAGTATGGGGTATATC	1,0	TAGTCGCGTGATTTGGAAGG
2	0,8	TTATGATTCCACTGGCGCTC	0,6	TTACACTTGAAGCTGGCTCG
3	0,3	CTTCGCTGCTGATAACCTCA	0,3	CTTCGTGTCGGCCATCATAT
4	0,2	CGCTCCATCCTTGATCGTTT	-0,2	AAAGCCGTCGTTTAAGGAGC
5	0,1	ATCGTACTCATGGTCCCTAC	-0,3	GGTTCTTACGCTCTACTGCA
6	-0,3	GAGTTAGATGTCACGTCACG	-0,6	TACGTCTCGAACTGATAGCG
7	-2,3	CCTGTCAACATTGACGCTCA	-2,4	TCATGTTGGCACCCTATGCA
				#
L_c		6		5
L_{hp}		6		4
L_{sc}		6		6
L_{sl}		7		4
Nr.	ΔG [$\frac{kcal}{mol}$]	EGNAS Erster Satz 5'→3'	ΔG [$\frac{kcal}{mol}$]	EGNAS Zweiter Satz 5'→3'
1	*	CAAAGAACCGACATAGCCAC	*	CCAACCAAACCACCAATCTC
2	*	GAACGGCAGGAGACAAATAC	1,4	CTGTGTCGTGTCCTTCTTCA
3	*	CATAAGAGGAAACAGCACGG	1,3	GCAGGCAGGTCAAGGTAAT
4	2,1	GTTGTCCTATTGCTCTGTG	1,0	ATCCGCCATAATAAGTCCGC
5	1,5	GTCGTGTTGCCTTTCTATCC	0,9	CTTTCGGCTCCTAACATTCCG
6	1,3	GGTTTATTCTCGGCTTGTGG	0,7	GAGTGAGTTCCAGAGTATCG
7	1,3	GGCTCGTTTGGTGTATCTTC	0,5	TTGTAGCATCATCAGCGAGG
		GC-Enden gefordert		#
		#		#
L_c		5		4
L_{hp}		2		3
L_{sc}		4		4
L_{sl}		3		6

* keine Haarnadelstruktur möglich

ohne {GGG; CCC; AAAA; TTTT}

Tabelle 6.10: Rechenzeit in Abhängigkeit von der maximal geforderten Satzgröße. $L_c = 6$ für eine globale Criton-Regel. Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 10 Sätzen.

Satzgröße	Rechenzeit [s]
100	$3,6 \pm 1,5$
101	$6,3 \pm 2,8$
102	$3,4 \pm 1,3$
103	$7,0 \pm 2,9$
104	$5,3 \pm 2,5$
105	$7,6 \pm 3,3$
106	$7,9 \pm 2,6$
107	$6,8 \pm 2,7$
108	$5,9 \pm 3,7$
109	$8,9 \pm 3,7$
Vollständig:	
$113,3 \pm 1,3$	$56,2 \pm 12,9$

6.10 Rechenzeit

In diesem Abschnitt soll demonstriert werden, dass die Sequenzgenerierung nur wenige Sekunden dauern kann, wenn der Benutzer die Satzgröße sinnvoll begrenzt. In Tabelle 6.10 sind die Rechenzeiten ausgewertet, die für die Generierung der 20 Basen langen Sequenzen und $L_c = 6$ für eine globale Criton-Regel benötigt werden. Es wird die maximale Anzahl an Sequenzen variiert, die für jeden Satz generiert werden soll. Aus Untersuchungen zur Verteilung der Satzgrößen ist bekannt, dass mindesten 109 Sequenzen in einem vollständigen Satz enthalten sind (siehe Abschnitt 6.5). Daher wird die maximal geforderte Satzgröße auf 109 Sequenzen gesetzt. Nachdem die zuvor bestimmte Satzgröße erreicht wird, stoppt die Sequenzgenerierung und die Rechenzeit wird gespeichert. Wird die Vollständigkeit eines Satzes erzwungen, kann es zur beträchtlichen Steigerung der Rechenzeit von wenigen Sekunden bis zu etwa einer Minute führen. Für einen vollständigen Satz ist es dennoch eine akzeptable Rechenzeit. Tatsächlich steigt die Rechenzeit stark mit L_c an. Die Generierung eines vollständigen Satzes mit $L_c > 8$ kann mehrere Stunden dauern, da die Anzahl der Basissequenzen exponentiell mit L_c wächst (siehe Gleichungen (5.1) und (5.2)).

Kapitel 7

TAG-Primer-Paarung

Einzelbasenverlängerungen, SBE⁽²⁸⁾-Reaktionen, können zur Genotypisierung der Einzelbasenpolymorphien (SNP⁽³¹⁾) eingesetzt werden. Diese Technik, wie sie von FAN *et al.* beschrieben wird, benötigt SBE-TAG-Primer (Abbildung 7.1) [177]. Für die Amplifikation der SNP-enthaltenden Bereiche werden marker-spezifische Primer bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR⁽²⁾) gebraucht. Danach werden die PCR-Produkte als Template für die SBE-Reaktion mit SBE-TAG-Primern genutzt. Die 3'-Enden dieser Primer sind komplementär zu spezifisch flankierenden Bereichen der SNP-Orte und die 5'-Enden sind komplementär zu spezifischen Sonden auf einem Array. Die Generierung geeigneter SBE-TAGs wird mittels EGNAS durchgeführt. Die TAG-Sequenzen sollen minimale Wechselwirkungen mit benachbarten, SNP-flankierenden Sequenzen aufweisen. Daher sind keine 3 Basen langen Subsequenzen komplementär zwischen einer SNP-flankierenden Sequenz und seiner zugehörigen TAG-Sequenz ($L_{ni} = 3$). Die Primer und SNP-flankierenden Sequenzen werden aus einer Arbeit der Autoren FAN *et al.* [177] entnommen, um 148 TAGs mit einer Länge von 20 Basen, $L_c = 8$, $L_{sl} = 8$, $L_{hp} = 2$ und einem GC-Gehalt von 50 % zu generieren. Die Subsequenzen {GGG; CCC; AAAAA; TTTTT} werden verboten und nur GC-Enden sind erlaubt. Einbezogene Sequenzen waren die Primer und flankierenden Bereiche der SNP. Daher treten keine Kreuzhybridisierungen mit 8 Basen langen Subsequenzen unter den TAGs und den einbezogenen Sequenzen auf. Sekundärstrukturen innerhalb der TAGs werden vermieden. Rückfaltungen aufgrund der Wechselwirkungen mit SNP-flankierenden Sequenzen werden reduziert.

Mit Hilfe der EGNAS-Software können TAGs ohne stabile Haarnadelstrukturen

⁽³¹⁾ engl. *single-nucleotide polymorphism*

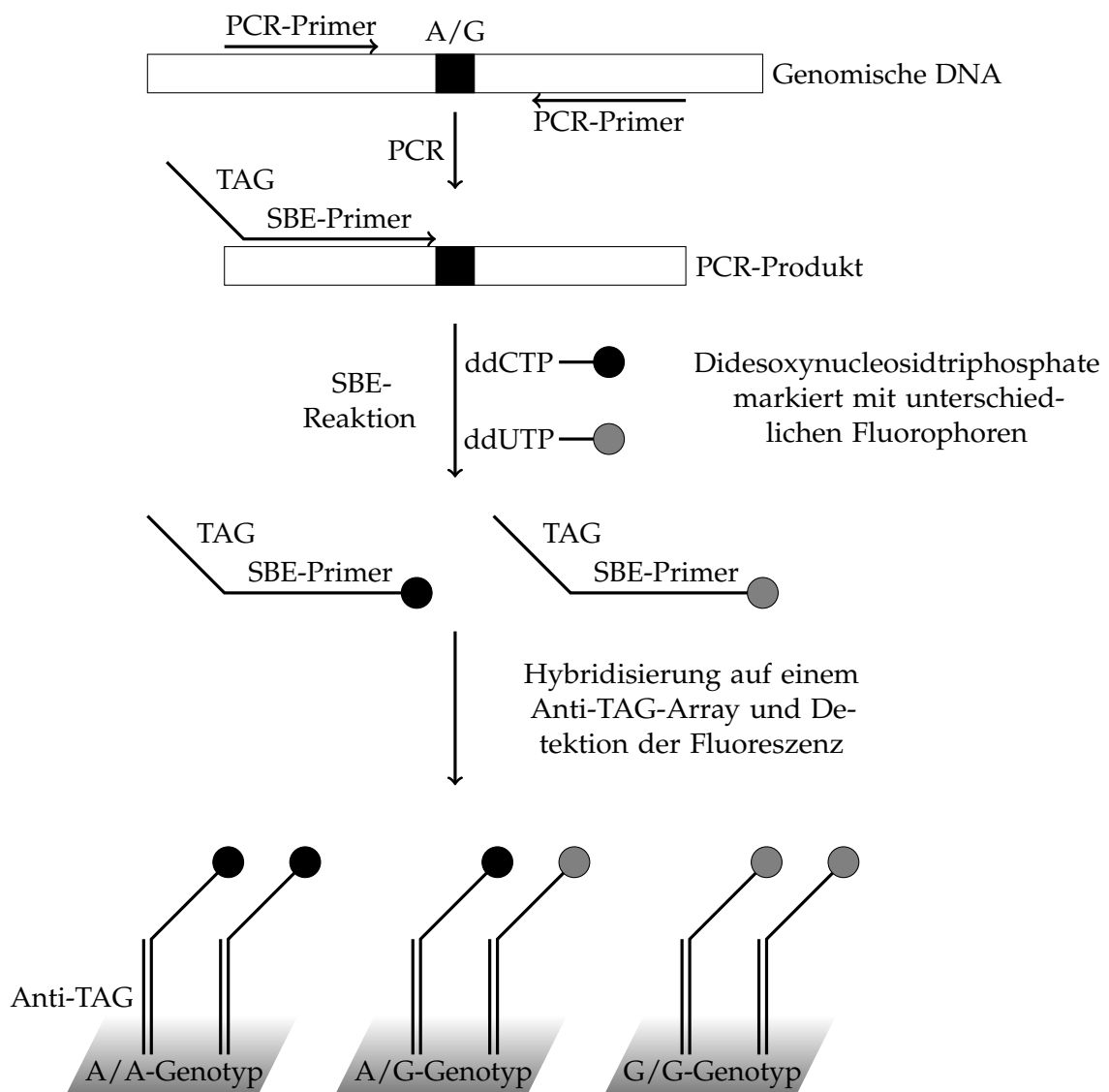


Abbildung 7.1: Prinzip der TAG-SBE-Genotypisierung zur Detektion einer A/G-SNP. Die TAG-Sequenzen werden mittels EGNAS entworfen und mit den Primern gepaart.

Tabelle 7.1: Vergleich der von FAN *et al.* [177] verwendeten TAGs mit denen durch EGNAS generierten. Intra- und Interstrang-Eigenschaften. Molare freie Enthalpien (ΔG , kcal/mol) der stabilsten Haarnadelstrukturen. Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 148 Sequenzen.

	TAGs	
	FAN <i>et al.</i>	EGNAS *
ΔG , Mittelwert	$-0,3 \pm 0,9$	$1,6 \pm 0,5$
ΔG , Minimum	-2,7	0,4
GC-Gehalt	45%-50%	50%
L_c	11	8
L_{hp}	4	2
L_{sc}	6	4
L_{sl}	7	8
L_{ni}	7	3

* GC-Enden gefordert; ohne {GGG; CCC; AAAAA; TTTTT}

Tabelle 7.2: Vergleich der von FAN *et al.* [177] verwendeten SBE-TAGs mit den durch EGNAS generierten. Molare freie Enthalpien (ΔG , kcal/mol) der stabilsten Haarnadelstrukturen. Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 148 Sequenzen.

	Flankierende Sequenzen	TAG-Primer-Paare	
		FAN <i>et al.</i>	EGNAS
ΔG , Mittelwert	$-0,7 \pm 1,2$	$-2,8 \pm 1,4$	$-1,2 \pm 1,1$
ΔG , Minimum	-4,3	-9,0	-4,3

generiert werden ($L_{hp} = 2$, $\Delta G \gg 0,4$ kcal/mol). Im Gegensatz dazu zeigen die von FAN *et al.* vorgeschlagenen TAGs eine sehr stabile Haarnadelstruktur mit einer Stammlänge von 3 Basenpaaren ($L_{hp} = 4$, $\Delta G = -2,7$ kcal/mol). Darüber hinaus ist die TAG-Primer-Paarung mittels EGNAS in Bezug auf Rückfaltungen besser ($L_{ni} = 3$) als das durch die Autoren FAN *et al.* beschriebene Verfahren für 148 SBE-TAG-Primer ($L_{ni} = 7$) [177]. Der Vorteil der EGNAS-Software ist auch beim Vergleich der Einzigartigkeit der TAG-Sequenzen ersichtlich. FAN *et al.* verwenden TAGs mit $L_c = 11$, hingegen generiert EGNAS TAGs mit $L_c = 8$. Die Qualität der TAGs kann somit durch L_{hp} , L_{ni} und L_c bewertet werden, wenn Haarnadelstrukturen, TAG-Primer-Paarung und Kreuzhybridisierung entsprechend im Fokus stehen. Die erzielten Ergebnisse sind in Tabelle 7.1 und Tabelle 7.2 gezeigt. Alle TAGs und Primer-Sequenzen mit ihren molaren freien Enthalpien der stabilsten Haarnadelstrukturen sind in einer Liste auf einer CD-ROM der Arbeit beigefügt.

Kapitel 8

TAGs und Anti-TAGs für DNA-Origami

Selbstorganisierende Strukturen sind fundamental im Bereich der Nanotechnologie. Die DNA erlaubt eine Organisation programmierbarer Bausteine. Eine vielversprechende Methode zur Kontrolle und Anordnung funktioneller Materialien basiert auf DNA-Origami [178]. Das grundlegende Konzept benötigt einen präzisen Entwurf der DNA-Sequenzen. Eine räumlich exakte Funktionalisierung ist erreichbar, indem die einzigartige Adressierbarkeit des DNA-Origami im Nanometerbereich genutzt wird. Das DNA-Gerüst ist ein langer DNA-Einzelstrang, welcher durch hunderte kurzer, synthetischer Oligonucleotide, als Faltungsstränge bezeichnet, gefaltet wird. Die Faltungsstränge werden entworfen, um an mehrere definierte Teile des Gerüsts zu binden und damit sonst voneinander entfernte Punkte des langen DNA-Einzelstrangs miteinander zu verknüpfen. ROTHEMUND zeigt eine Vielfalt unterschiedlicher Formen, die auf diesem Konzept beruhen [144].

Für den Entwurf dreidimensionaler DNA-Strukturen (3D-DNA-Origami) ist das Programm caDNAno geeignet [179]. Hier kann gezeigt werden, dass EGNAS ein nützliches Werkzeug für die Suche nach geeigneten Sequenzen sein kann, wenn Faltungsstränge mit Einzelstrangüberhängen (Anti-TAGs) modifiziert werden müssen. Diese Anti-TAGs werden für die Anbindung DNA-modifizierter Nanopartikel oder Peptid-DNA-Konjugate verwendet, wobei die DNA-Modifizierungen der Partikel und Konjugate als TAGs bezeichnet werden und komplementär zu den Anti-TAGs sind. Im Folgenden werden zwei Beispiele betrachtet, bei denen einzelsträngige und ringförmige DNA des Phagen M13mp18 als Gerüst dient. Die entsprechende Sequenz [180] werden in die Berechnungen einbezogen.

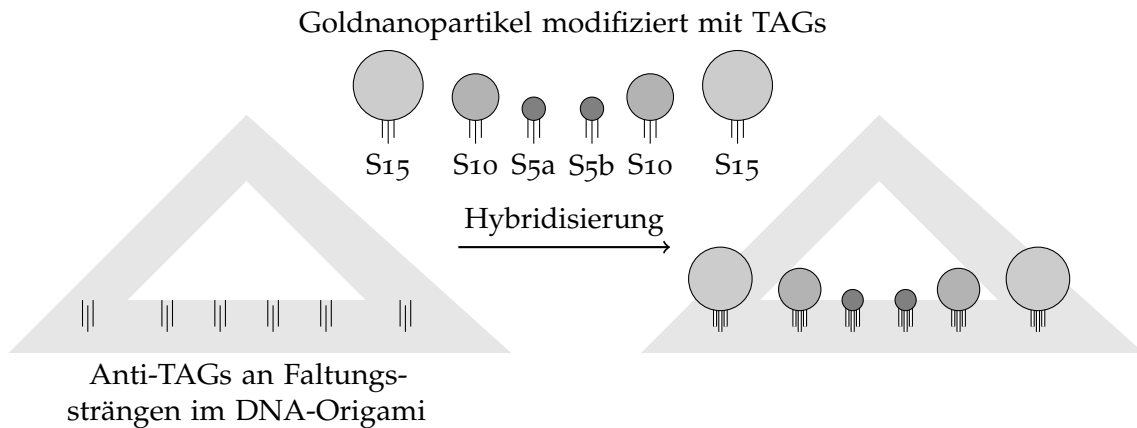


Abbildung 8.1: Anordnen der Goldnanopartikel auf einem dreiecksförmigen DNA-Origami. Die Faltungsstränge sind mit Einzelstrangüberhängen, Anti-TAGs, modifiziert.

8.1 TAGs für ein dreiecksförmiges DNA-Origami

DING *et al.* verwenden in ihrer Arbeit dreiecksförmiges DNA-Origami für die Anordnung der sechs Goldnanopartikel, die durch DNA-Hybridisierung gebunden werden (Abbildung 8.1) [181]. Die Partikel haben drei unterschiedliche Größen: 5, 10 und 15 nm. Jedes Partikel wird durch drei TAG/Anti-TAG-Paare auf dem DNA-Origami gebunden, wobei die M₁₃mp18-DNA als Gerüst dient. Zu diesem Zweck werden 18 Faltungsstränge mit Anti-TAGs modifiziert, welche 24 Basen lang sind. DING *et al.* entwarfen vier Sequenzen, um die 10 und 15 nm großen Partikel mit je einer Sequenz zu markieren und um zwei unterschiedlich modifizierte 5 nm große Partikel zu nutzen.

Es werden theoretisch mögliche Kreuzhybridisierungen der TAGs mit den Faltungssträngen und dem Gerüststrang analysiert. Im Ergebnis wird festgestellt, dass die 9 Basen lange Sequenz 5'-GAATCCTGA-3' identisch im Faltungsstrang „C28“ und im TAG „S5a“ der 5 nm großen Goldnanopartikel ist. Dies kann eine Kreuzhybridisierung der drei modifizierten Faltungsstränge mit dem nicht modifizierten „C28“-Strang ermöglichen. Es gibt zahlreiche 8 und 9 Basen lange Sequenzen, die zu Kreuzhybridisierungen mit dem Gerüststrang führen können. Zusätzlich konnten mögliche Haarnadelstrukturen mit der Stammlänge von 4 bp (5'-AGTC-3') gefunden werden, die in den Sequenzen Anti-TAG „S5b“ und dem entsprechenden TAG vorkommen. Haarnadelstrukturen senken die Hybridisierungseffizienz der TAGs mit den Anti-TAGs. Dies könnte eine mögliche Erklärung für fehlende 5 nm Partikel auf dem DNA-Origami sein. So beschreiben DING *et al.* dieses Problem,

Tabelle 8.1: Vergleich der Sequenzen, die mit EGNAS erzeugt wurden, mit denen, die von DING *et al.* zur Modifikation der Faltungsstränge verwendet werden [181]. Molare freie Enthalpien (ΔG , kcal/mol) der stabilsten Haarnadelstrukturen. Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 18 Sequenzen.

	nicht modifizierte Faltungsstränge	modifizierte Faltungsstränge	
		DING <i>et al.</i>	EGNAS
ΔG , Mittelwert	$-1,5 \pm 1,4$	$-3,2 \pm 1,7$	$-2,2 \pm 1,3$
ΔG , Minimum	-5,2	-6,8	-5,2

wenn nur zwei TAGs pro Partikel verwendet werden [181].

Die TAG- und Anti-TAG-Sequenzen werden mit EGNAS generiert. Die Sequenzen des Gerüststrangs und aller Faltungsstränge werden in die Berechnungen einbezogen. Im Einzelnen wird $L_c = 8$ gewählt und somit Kreuzhybridisierungen mit mehr als 7 aufeinanderfolgenden Basenpaaren vermieden, die durch Hybridisierung der TAGs mit den modifizierten und nicht modifizierten Faltungssträngen oder mit dem Gerüststrang auftreten. Indem $L_{hp} = 2$ gesetzt wird, werden Sekundärstrukturen umgangen. Die Anti-TAGs werden schrittweise generiert, indem die vorher entworfenen Sequenzen der modifizierten Faltungsstränge in die nächste Generierung einbezogen werden. Weiterhin werden bei der aktuellen Generierung der Anti-TAGs alle 4 Basen langen Sequenzen verboten ($L_{ni} = 4$), die teilweise komplementär zu den benachbarten Faltungssträngen sind. Das Risiko der Rückfaltungen wird mit diesem Vorgehen verkleinert.

Im Vergleich zu Sequenzen, die mit EGNAS erzeugt werden, zeigen die Sequenzen, welche DING *et al.* zur Modifikation der Faltungsstränge verwenden [181], die Möglichkeiten stabilerer Kreuzhybridisierungen und Sekundärstrukturen (Tabelle 8.1). Die Sequenzen der Faltungsstränge vor und nach ihrer Modifikation und ihre molaren freien Enthalpien der stabilsten Haarnadelstrukturen sind in einer Liste auf einer CD-ROM der Arbeit beigefügt.

8.2 TAGs für Sechs-Helixbündel-Nanoröhren

STEARNS *et al.* ordnen Peptid-DNA-Konjugate auf einem DNA-Origami an (Abbildung 8.2) [182]. Dieses DNA-Origami lag in Form der Sechs-Helixbündel-Nanoröhren vor. Das A₃-Peptid wird für eine *In-situ*-Keimbildung und das Wachstum der Goldnanopartikel verwendet, weil das A₃-Peptid Goldoberflächen erkennt

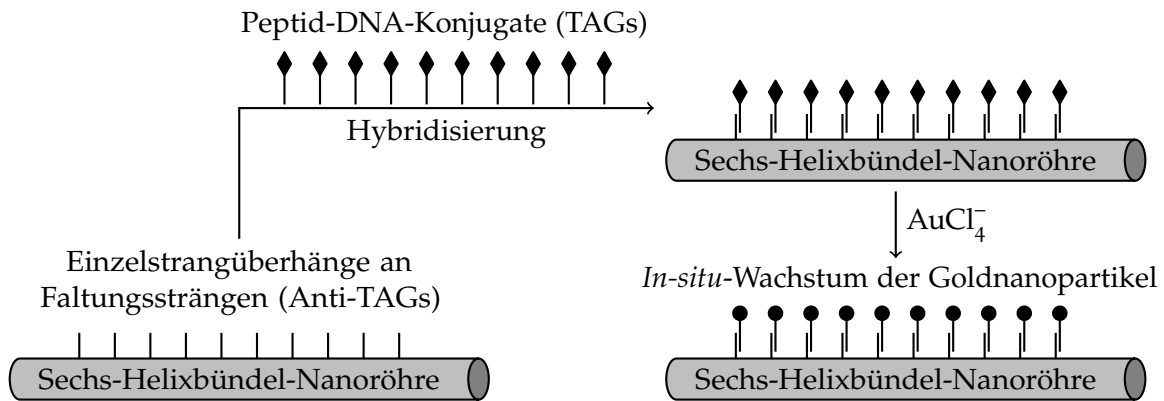


Abbildung 8.2: Prinzip der *In-situ*-Keimbildung und des Wachstums der Goldnanopartikel auf einer Sechshelixbündel-Nanoröhre.

und gelöste Goldionen reduzieren kann. Zehn Faltungsstränge werden mit nur einer Sequenz für einen Einzelstrangüberhang (Anti-TAG) modifiziert. Als Gerüst dient die M₁₃mp18-DNA. Es werden wieder die möglichen Kreuzhybridisierungen des TAGs mit den Faltungssträngen und dem Gerüststrang untersucht. Es kann nur eine mögliche Kreuzhybridisierung mit 8 aufeinanderfolgenden Basen gefunden werden. Dabei handelt es sich um die Sequenz 5'-GCCGTTGA-3' des Faltungsstrangs „70“, welche mit dem TAG des Peptid-DNA-Konjugats hybridisieren könnte. Es sind Haarnadelstrukturen mit der Stammlänge von 5 bp (5'-CGTTG-3') in der Sequenz des Anti-TAGs möglich. Außerdem ist das Risiko der Rückfaltungen gegeben, weil eine 5 Basen lange Subsequenz (5'-AACGG-3') des Anti-TAGs komplementär zum Faltungsstrang „122“ ist.

Mit Hilfe der EGNAS-Software werden die TAG- und Anti-TAG-Sequenzen optimiert. Dabei werden die gleichen Parameter wie in Abschnitt 8.1 für das dreiecksförmige DNA-Origami verwendet. Sofern Sekundärstrukturen in den modifizierten Einzelstrangüberhängen und den TAGs vermieden werden sollen, liefert EGNAS besser geeignete Sequenzen⁽³²⁾ als diejenigen, welche STEARNS *et al.* für die Modifizierung der Faltungsstränge verwenden, um Peptid-DNA-Konjugate zu binden (Tabelle 8.2).

Wahrscheinlich sind die Bildung der Haarnadelstrukturen sowie Rückfaltung die Gründe für eine geringe Anzahl der Nanopartikel auf dem DNA-Origami. Darüber hinaus berichten STEARNS *et al.* über Partikel, die nicht in den beabsichtigten

⁽³²⁾ Die Sequenzen der Faltungsstränge vor und nach ihrer Modifikation sowie ihre molaren freien Enthalpien der stabilsten Haarnadelstrukturen sind in einer Liste auf einer CD-ROM der Arbeit beigefügt.

Tabelle 8.2: Vergleich der Sequenzen, die mit EGNAS erzeugt wurden, mit denen, die von STEARNS *et al.* zur Modifikation der Faltungsstränge verwendet werden [182]. Molare freie Enthalpien (ΔG , kcal/mol) der stabilsten Haarnadelstrukturen. Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 10 Sequenzen.

	nicht modifizierte Faltungsstränge	modifizierte Faltungsstränge	
		STEARNNS <i>et al.</i>	EGNAS
Mittelwert ΔG	$-1,36 \pm 1,1$	$-5,9 \pm 1,3$	$-1,8 \pm 1,4$
Minimum ΔG	-3,0	-8,0	-4,2

Abständen von 27 nm angeordnet sind. Das Peptid wird nicht effizient auf dem DNA-Origami immobilisiert.

Kapitel 9

Zusammenfassung und Ausblick

Die Software EGNAS wird für den Entwurf einzigartiger Nucleobasen-Sequenzen entwickelt. Innerhalb einer akzeptablen Rechenzeit können, mit einem handelsüblichen PC, Sätze mit definierten Intra- und Interstrang-Eigenschaften generiert werden. Es kann eine maximale Satzgröße mit gegebenen Einschränkungen erreicht werden. Der vorgestellte erschöpfende Algorithmus erlaubt die Generierung größerer Sätze, als dies mit bisheriger Software bei gleichen Sequenzanforderungen möglich war.

Aktuell ist das entwickelte Programm geeignet für die Generierung der Sequenzen für DNA-TAGs, wobei Sekundärstrukturen und Kreuzhybridisierungen vermieden werden können. Weiterhin können vordefinierte Sequenzen einbezogen werden. Dies ist prinzipiell für Anwendungen von Nutzen, bei denen keine Wechselwirkungen der TAGs mit Templat-Strängen erwünscht sind. Die bereitgestellte Option der TAG-Primer-Paarung im Hinblick auf mögliche Rückfaltung unterstützt die Generierung der TAG-Sequenzen für Multiplex-Genotypisierung der Einzelbasenpolymorphismen. Diese Art der Genotypisierung kann mittels PCR und SBE-Reaktionen auf Mikroarrays oder Partikeloberflächen durchgeführt werden. Weiterhin ermöglicht EGNAS den rechnergestützten Entwurf der Sequenzen für die spezifische Anbindung der molekularen Konstrukte an DNA-Origami. In der zukünftigen Entwicklung kann der neue Algorithmus erweitert werden, um sehr große Gensequenzen einzubeziehen.

Fazit

Die vorliegende Dissertation beschreibt die Erarbeitung anwendbarer Methoden zum Aufbau SPR-basierter DNA-Mikroarrays. Es werden die Beziehungen zwischen allen Teilschritten der Entwicklung eines DNA-Biosensors aufgezeigt.

Die Sondendichte auf der Sensoroberfläche ist entscheidend für die Leistungsfähigkeit eines DNA-Chips. In dieser Arbeit werden thiolmodifizierte Sonden und solche mit Phosphorothioatgruppen verwendet und verglichen. Die abstoßende Ladung der DNA-Moleküle, die als Polyanionen angesehen werden können, wird durch Mg^{2+} des zugesetzten $MgCl_2$ abgeschirmt, um die DNA-Sonden in ausreichender Dichte zu immobilisieren. In Bezug darauf wird der Aufbau selbstorganisierender Monoschichten, bestehend aus Mercaptoalkoholen und thiolmodifizierten DNA-Einzelsträngen, mittels Röntgenphotoelektronenspektroskopie untersucht und der Mg^{2+} -Einfluss auf die Sondendichte bestätigt. Diese Beobachtung wird ebenso durch SPR-Experimente bestätigt, bei denen die Hybridisierung der PCR-Produkte detektiert wird und die Immobilisierung dazugehöriger Sonden bei unterschiedlichen $MgCl_2$ -Konzentration stattfindet. Während thiolmodifizierte DNA direkt an eine Goldoberfläche gebunden werden kann, hat DNA mit Phosphorothioatgruppen (PT-DNA) nur eine geringe Affinität zu Gold. Um PT-DNA in ausreichender Dichte zu immobilisieren, wird die Sensoroberfläche mit Iodalkylgruppen beschichtet und ermöglicht die Immobilisierung durch nucleophile Substitution des Iods durch den Schwefel der PT-DNA.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete SPR-Spektrometer läßt streifenförmige Bereiche des Mikroarrays aus. Die Spots werden daher aus 50- μ l-Tropfen mittels eines Mikropipettiersystems aufgebaut. Die Morphologie und Dynamik der Tropfen auf der Goldoberfläche wird durch Zusatz des Glycerins verändert. Damit werden bis zu 60 parallele, streifenförmige Spots auf einer 8 bis 9 mm breiten Goldoberfläche aufgebracht. Es werden bis zu 180 Spots auf einem SPR-Chip in Echtzeit analysiert. Eine weitere Erhöhung der Anzahl an Sondenorten pro Chip wird mit

einer hydrophil/hydrophoben Strukturierung der Arrayoberfläche erreicht. Dies erfolgt durch das Mikrokontaktdrucken mit Alkanthiolen.

Eine schnelle Detektion wird bei Hybridisierungen im mikrofluidischen Kanal innerhalb weniger Minuten erzielt. Dazu werden Probenmengen kleiner als 100 µl gebraucht. Es zeigt sich, dass im mikrofluidischen Fluss die TAG/Anti-TAG-Bindung, bei der Hybridisierung der PCR-Produkte mit den Sonden, zusätzlich stabilisiert wird.

Die Hybridisierungseffizienz hängt stark von der Sodenesequenz ab. SPR-Experimente zeigen, dass die Ausbildung der Haarnadelstrukturen die Ursache dafür ist. Ein Computerprogramm auf Grundlage eines neu entwickelten Nucleobasen-Sequenzentwurf-Algorithmus, ermöglicht die Generierung vollständiger Sequenzsätze. Die Intra- und Interstrangeigenschaften dieser Sequenzen können kontrolliert werden, um Haarnadelstrukturen und Kreuzhybridisierungen zu vermeiden. Dadurch können optimierte Sequenzen für Anwendungen auf DNA-Chips oder in der DNA-Nanobiotechnologie entworfen werden.

Im Ergebnis der vorliegenden Dissertation werden Methoden präsentiert, welche für die Herstellung der SPR-basierten DNA-Chips angewendet werden können. Diese bieten insbesondere die Vorteile einer schnellen, markierungsfreien Echtzeitanalyse spezifischer Hybridisierungen. Die Anwendbarkeit dieser Methoden wurde anhand der Mutationsanalyse der Fusionsgene *AML1-ETO* und *CBFB-MYH11* bei der akuten myeloischen Leukämie bestätigt. Aufbauend auf diesen Resultaten können weiterführende Entwicklungen auf dem Gebiet der Protein-Mikroarrays und aptamerbasierter Sensoren stattfinden.

Anhang A

Verwendung der EGNAS-Software

A.1 Ausführen des Programms

EGNAS ist in der Programmiersprache C++ geschrieben. Es ist ein Kommandozeilenprogramm, welches für die Betriebssysteme LINUX, MAC OS X und MICROSOFT WINDOWS kompiliert wurde. Nach dem Entpacken der ZIP-Datei für das gewünschte Betriebssystem, kann EGNAS durch das Aufrufen der ausführbaren Datei gestartet werden. Verbotene Subsequenzen können in einer Text-Datei mit dem Namen `forbidden.txt` angegeben werden. Diese Datei und die Text-Dateien mit den einbezogenen Sequenzen und Nachbarsequenzen müssen in dem Verzeichnis der ausführbaren EGNAS-Datei gespeichert werden. Alle Sequenzen und Subsequenzen müssen durch einen Zeilenumbruch getrennt werden und aus den Zeichen der Menge $\{A;T;C;G\}$ bestehen. Zusätzlich wird eine Konfigurationsdatei gebraucht, in der die Kriterien und Optionen für den Sequenztwurf festgelegt sind. Wenn keine Konfigurationsdatei angegeben wurde und auch keine `config.txt` im EGNAS-Verzeichnis existiert, wird EGNAS eine `config.txt` anlegen.

A.2 Sequenztwurf-Kriterien und Optionen

EGNAS bietet dem Benutzer folgende Kriterien und Optionen zur Generierung der Sequenzen:

1. Sequenzlänge L_s .
2. Länge der Basissequenzen (Criton-Länge L_c).

3. Genauer GC-Gehalt oder sein Bereich.
4. Kein terminales Adenin oder Thymin im Strang./Geforderte GC-Enden.
5. Verbotene Sequenzen./Einbezogene Sequenzen.
6. Länge der verbotenen selbstkomplementären Subsequenzen L_{sc} .
7. Verbotene Stammlänge der Haarnadelstrukturen L_{hp} .
8. Länge der Subsequenzen, die innerhalb ein und derselben Sequenz nicht wiederholt werden dürfen (Gleiten, L_{sl}).
9. Verbotene Länge der Subsequenzen, die mit komplementären Nachbarsequenzen wechselwirken könnten L_{ni} .

Optional wird die molare freie Enthalpie für die Bildung eines DNA-Doppelstrangs nach dem „Modell nächster Nachbarn“ berechnet [91, 92].

A.3 Konfigurationsdatei

Die Konfigurationsdatei enthält die Kriterien und Optionen für den Sequenzentwurf. Eine Beispieldatei ist unten gezeigt:

```
#Created with version: 1158
#Sequence length L_s.
L_s[bases]=24
#Length of basic sequences (criton length) 1 <= L_c <= 14.
L_c[bases]=5
#Forbidden stem length of hairpin structures L_hp (blank for any size).
L_hp[base pairs]=3
#Length of forbidden self-complementary subsequences L_sc (blank for any size).
L_sc[bases]=4
#Minimum number of G/C-bases per strand GC_min, minimum GC content (blank for
any number).
GC_min[bases]=11
#Maximum number of G/C-bases per strand GC_max, maximum GC content (blank for
any number).
GC_max[bases]=13
#Length of subsequences that are not allowed to be repeated within one and the
```

```
same sequence (sliding) L_sl (blank for any size).
L_sl[bases]=5
#No terminal adenine or thymine in the strand?/Demand on GC ends? [y/n]
GC_ends=n
#Maximum number of sequences to be generated per set.
SeqMax=1250
#Maximum number of sets to be generated.
SetMax=2
#Maximum number of attempts to restart the generation of one sequence.
MaxAttempt=50
#Termination factor to limit the number of combination attempts with basic
sequences for the generation of one strand.
TerminationFactor=1
#Name of the file with sequences to be included (blank, if no file exist).
Included=
#Name of the file with neighboring sequences (blank, if no file exist).
Neighboring=
#Forbidden stem length of hairpin structures with neighboring sequences L_ni
(neighbor interaction).
L_ni[base pairs]=
#Calculate deltaG? [y/n]
deltaG=n
```

A.4 Ausgabe der Ergebnisse

Die Ausgabe der Ergebnisse wird in einem separaten Verzeichnis gespeichert. Der Verzeichnisname ist das aktuelle Datum und die aktuelle Systemzeit. Die Datei `log.txt` enthält die Einstellungen und weitere Informationen zur Sequenzgenerierung. Jeder generierte Sequenzsatz wird in einer eigenen `txt`-Datei gespeichert.

Literaturverzeichnis

- [1] D. R. Thévenot, K. Toth, R. A. Durst, G. S. Wilson, Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification - (technical report), *Pure and Applied Chemistry* 71 (12) (1999) 2333–2348.
- [2] M. C. Pirrung, Die Herstellung von DNA-Chips, *Angewandte Chemie* 114 (8) (2002) 1326–1341.
- [3] M. C. Pirrung, How to make a DNA chip, *Angewandte Chemie, International Edition* 41 (8) (2002) 1276–1289.
- [4] A. Sassolas, B. D. Leca-Bouvier, L. J. Blum, DNA biosensors and microarrays, *Chemical Reviews* 108 (1) (2008) 109–139.
- [5] D. G. Wang, J. B. Fan, C. J. Siao, A. Berno, P. Young, R. Sapolsky, G. Ghandour, N. Perkins, E. Winchester, J. Spencer, L. Kruglyak, L. Stein, L. Hsie, T. Topaloglou, E. Hubbell, E. Robinson, M. Mittmann, M. S. Morris, N. P. Shen, D. Kilburn, J. Rioux, C. Nusbaum, S. Rozen, T. J. Hudson, R. Lipshutz, M. Chee, E. S. Lander, Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome, *Science* 280 (5366) (1998) 1077–1082.
- [6] D. J. Lockhart, H. L. Dong, M. C. Byrne, M. T. Follettie, M. V. Gallo, M. S. Chee, M. Mittmann, C. W. Wang, M. Kobayashi, H. Horton, E. L. Brown, Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays, *Nature Biotechnology* 14 (13) (1996) 1675–1680.
- [7] S. P. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas, Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis, *Science* 251 (4995) (1991) 767–773.

- [8] B. G. Moreira, Y. You, M. A. Behlke, R. Owczarzy, Effects of fluorescent dyes, quenchers, and dangling ends on DNA duplex stability, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 327 (2) (2005) 473–484.
- [9] B. P. Nelson, T. E. Grimsrud, M. R. Liles, R. M. Goodman, R. M. Corn, Surface plasmon resonance imaging measurements of DNA and RNA hybridization adsorption onto DNA microarrays, *Analytical Chemistry* 73 (1) (2001) 1–7.
- [10] M. Piliarik, L. Párová, J. Homola, High-throughput SPR sensor for food safety, *Biosensors and Bioelectronics* 24 (5) (2009) 1399–1404.
- [11] J. Homola, S. Yee, G. Gauglitz, Surface plasmon resonance sensors: review, *Sensors and Actuators B: Chemical* 54 (1-2) (1999) 3–15.
- [12] J. A. Ruemmele, M. S. Golden, Y. Gao, E. M. Cornelius, M. E. Anderson, L. Postelnicu, R. M. Georgiadis, Quantitative surface plasmon resonance imaging: A simple approach to automated angle scanning, *Analytical Chemistry* 80 (12) (2008) 4752–4756.
- [13] H. J. Lee, T. T. Goodrich, R. M. Corn, SPR imaging measurements of 1-D and 2-D DNA microarrays created from microfluidic channels on gold thin films, *Analytical Chemistry* 73 (22) (2001) 5525–5531.
- [14] J. Ladd, A. D. Taylor, M. Piliarik, J. Homola, S. Jiang, Hybrid surface platform for the simultaneous detection of proteins and DNAs using a surface plasmon resonance imaging sensor, *Analytical Chemistry* 80 (11) (2008) 4231–4236.
- [15] F. Sonntag, S. Schmieder, N. Danz, M. Mertig, N. Schilling, U. Klotzbach, E. Beyer, Novel lab-on-a-chip system for the label-free detection of DNA hybridization and protein-protein interaction by surface plasmon resonance (SPR), Vol. 7365, SPIE, 2009, p. 73650Q.
- [16] M. Mertig, A. Kick, M. Bönsch, B. Katzschner, J. Voigt, F. Sonntag, N. Schilling, U. Klotzbach, N. Danz, S. Begemann, A. Herr, M. Jung, A novel platform technology for the detection of genetic variations by surface plasmon resonance, in: *Sensors*, IEEE, 2009, pp. 392–395.
- [17] K. B. Mullis, F. A. Faloon, Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction, *Methods in Enzymology* 155 (1987) 335–350.

- [18] R. Saiki, D. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R. Higuchi, G. Horn, K. Mullis, H. Erlich, Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science* 239 (4839) (1988) 487–491.
- [19] H. Matsuzaki, H. Loi, S. Dong, Y. Tsai, J. Fang, J. Law, X. Di, W. Liu, G. Yang, G. Liu, J. Huang, G. Kennedy, T. Ryder, G. Marcus, P. Walsh, M. Shriver, J. Puck, K. Jones, R. Mei, Parallel genotyping of over 10,000 SNPs using a one-primer assay on a high-density oligonucleotide array, *Genome Research* 14 (3) (2004) 414–425.
- [20] Z. Guo, R. A. Guilfoyle, A. J. Thiel, R. Wang, L. M. Smith, Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports, *Nucleic Acids Research* 22 (24) (1994) 5456–5465.
- [21] X. Tang, S. Morris, J. Langone, L. Bockstahler, Simple and effective method for generating single-stranded DNA targets and probes, *BioTechniques* 40 (6) (2006) 759–763.
- [22] R. Wood, On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum, *Philosophical Magazine Series 6* 4 (21) (1902) 396–402.
- [23] U. Fano, The theory of anomalous diffraction gratings and of quasi-stationary waves on metallic surfaces (Sommerfeld's waves), *Journal of the Optical Society of America* 31 (3) (1941) 213–222.
- [24] A. Otto, Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection, *Zeitschrift für Physik* 216 (1968) 398–410.
- [25] E. Kretschmann, H. Raether, Radiative decay of nonradiative surface plasmons excited by light, *Zeitschrift für Naturforschung. Teil A, Astrophysik, Physik, Physikalische Chemie* 23 (12) (1968) 2135–2136.
- [26] E. Kretschmann, Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächenplasmaschwingungen, *Zeitschrift für Physik* 241 (4) (1971) 313–324.
- [27] A. Hofmann, N. Danz, Plasmon resonance sensor, Patent, WO/2008/025488.
- [28] R. G. Nuzzo, D. L. Allara, Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces, *Journal of the American Chemical Society* 105 (13) (1983) 4481–4483.

- [29] R. G. Nuzzo, B. R. Zegarski, L. H. Dubois, Fundamental studies of the chemisorption of organosulfur compounds on Au(111). Implications for molecular self-assembly on gold surfaces, *Journal of the American Chemical Society* 109 (3) (1987) 733–740.
- [30] C. D. Bain, E. B. Troughton, Y. T. Tao, J. Evall, G. M. Whitesides, R. G. Nuzzo, Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold, *Journal of the American Chemical Society* 111 (1) (1989) 321–335.
- [31] A. Ulman, Formation and structure of self-assembled monolayers, *Chemical Reviews* 96 (4) (1996) 1533–1554.
- [32] F. Schreiber, Structure and growth of self-assembling monolayers, *Progress in Surface Science* 65 (5–8) (2000) 151–257.
- [33] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, G. M. Whitesides, Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology, *Chemical Reviews* 105 (4) (2005) 1103–1170.
- [34] C. Vericat, M. E. Vela, G. Benitez, P. Carro, R. C. Salvarezza, Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system, *Chemical Society Reviews* 39 (5) (2010) 1805–1834.
- [35] C. J. Sandroff, D. R. Herschbach, Surface-enhanced raman study of organic sulfides adsorbed on silver: facile cleavage of sulfur-sulfur and carbon-sulfur bonds, *The Journal of Physical Chemistry* 86 (17) (1982) 3277–3279.
- [36] P. E. Laibinis, G. M. Whitesides, D. L. Allara, Y. T. Tao, A. N. Parikh, R. G. Nuzzo, Comparison of the structures and wetting properties of self-assembled monolayers of n-alkanethiols on the coinage metal surfaces, copper, silver, and gold, *Journal of the American Chemical Society* 113 (19) (1991) 7152–7167.
- [37] K. Shimazu, Y. Sato, I. Yagi, K. Uosaki, Packing state and stability of self-assembled monolayers of 11-ferrocenyl-1-undecanethiol on platinum electrodes, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 67 (3) (1994) 863–865.
- [38] J. A. Williams, C. B. Gorman, Alkanethiol reductive desorption from self-assembled monolayers on gold, platinum, and palladium substrates, *The Journal of Physical Chemistry C* 111 (34) (2007) 12804–12810.

- [39] Z. Mekhalif, J. Riga, J.-J. Pireaux, J. Delhalle, Self-assembled monolayers of n-dodecanethiol on electrochemically modified polycrystalline nickel surfaces, *Langmuir* 13 (8) (1997) 2285–2290.
- [40] C. W. Sheen, J. X. Shi, J. Maartensson, A. N. Parikh, D. L. Allara, A new class of organized self-assembled monolayers: alkane thiols on gallium arsenide (100), *Journal of the American Chemical Society* 114 (4) (1992) 1514–1515.
- [41] C. L. McGuinness, A. Shaporenko, C. K. Mars, S. Uppili, M. Zharnikov, D. L. Allara, Molecular self-assembly at bare semiconductor surfaces: Preparation and characterization of highly organized octadecanethiolate monolayers on GaAs(001), *Journal of the American Chemical Society* 128 (15) (2006) 5231–5243.
- [42] Y. Gu, Z. Lin, R. A. Butera, V. S. Smentkowski, D. H. Waldeck, Preparation of self-assembled monolayers on InP, *Langmuir* 11 (6) (1995) 1849–1851.
- [43] D. Zerulla, T. Chassé, Scanning tunneling microscopy and spectroscopy of uhv-deposited dodecanethiolate films on InP(110) surfaces at consecutive doses: A single domain system, *Langmuir* 18 (14) (2002) 5392–5399.
- [44] R. G. Nuzzo, L. H. Dubois, D. L. Allara, Fundamental studies of microscopic wetting on organic surfaces. 1. Formation and structural characterization of a self-consistent series of polyfunctional organic monolayers, *Journal of the American Chemical Society* 112 (2) (1990) 558–569.
- [45] G. M. Whitesides, P. E. Laibinis, Wet chemical approaches to the characterization of organic surfaces: self-assembled monolayers, wetting, and the physical-organic chemistry of the solid-liquid interface, *Langmuir* 6 (1) (1990) 87–96.
- [46] J. B. Schlenoff, M. Li, H. Ly, Stability and self-exchange in alkanethiol monolayers, *Journal of the American Chemical Society* 117 (50) (1995) 12528–12536.
- [47] D. Lavrich, S. Wetterer, S. Bernasek, G. Scoles, Physisorption and chemisorption of alkanethiols and alkyl sulfides on Au(111), *Journal of Physical Chemistry B* 102 (18) (1998) 3456–3465.
- [48] X. Torrelles, C. Vericat, M. E. Vela, M. H. Fonticelli, M. A. Daza Millone, R. Felici, T.-L. Lee, J. Zegenhagen, G. Muñoz, J. A. Martí-Gago, R. C. Salvarezza,

- Two-site adsorption model for the $(\sqrt{3} \times \sqrt{3})\text{-R}30^\circ$ dodecanethiolate lattice on Au(111) surfaces, *The Journal of Physical Chemistry B* 110 (11) (2006) 5586–5594.
- [49] I. I. Rzeżicka, J. Lee, P. Maksymovych, J. T. Yates, Nondissociative chemisorption of short chain alkanethiols on Au(111), *The Journal of Physical Chemistry B* 109 (33) (2005) 15992–15996.
- [50] P. E. Laibinis, G. M. Whitesides, ω -Terminated alkanethiolate monolayers on surfaces of copper, silver, and gold have similar wettabilities, *Journal of the American Chemical Society* 114 (6) (1992) 1990–1995.
- [51] H. Kimura-Suda, D. Y. Petrovykh, M. J. Tarlov, L. J. Whitman, Base-dependent competitive adsorption of single-stranded DNA on gold, *Journal of the American Chemical Society* 125 (30) (2003) 9014–9015.
- [52] L. M. Demers, M. Ostblom, H. Zhang, N. H. Jang, B. Liedberg, C. A. Mirkin, Thermal desorption behavior and binding properties of DNA bases and nucleosides on gold, *Journal of the American Chemical Society* 124 (38) (2002) 11248–11249.
- [53] L. K. Wolf, Y. Gao, R. M. Georgiadis, Sequence-dependent DNA immobilization: Specific versus nonspecific contributions, *Langmuir* 20 (8) (2004) 3357–3361.
- [54] M. Ostblom, B. Liedberg, L. M. Demers, C. A. Mirkin, On the structure and desorption dynamics of DNA bases adsorbed on gold: A temperature-programmed study, *Journal of Physical Chemistry B* 109 (31) (2005) 15150–15160.
- [55] S. Piana, A. Bilic, The nature of the adsorption of nucleobases on the gold [111] surface, *Journal of Physical Chemistry B* 110 (46) (2006) 23467–23471.
- [56] A. Opdahl, D. Y. Petrovykh, H. Kimura-Suda, M. J. Tarlov, L. J. Whitman, Independent control of grafting density and conformation of single-stranded DNA brushes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (1) (2007) 9–14.

- [57] H. Kimura-Suda, A. Opdahl, M. J. Tarlov, L. J. Whitman, D. Y. Petrovykh, Characterization and controlled properties of DNA immobilized on gold surfaces, *Kobunshi Ronbunshu* 65 (1) (2008) 46–57.
- [58] S. M. Schreiner, D. F. Shudy, A. L. Hatch, A. Opdahl, L. J. Whitman, D. Y. Petrovykh, Controlled and efficient hybridization achieved with DNA probes immobilized solely through preferential DNA-substrate interactions, *Analytical Chemistry* 82 (7) (2010) 2803–2810.
- [59] T. Herne, M. Tarlov, Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces, *Journal of the American Chemical Society* 119 (38) (1997) 8916–8920.
- [60] R. Levicky, T. M. Herne, M. J. Tarlov, S. K. Satija, Using self-assembly to control the structure of DNA monolayers on gold: A neutron reflectivity study, *Journal of the American Chemical Society* 120 (38) (1998) 9787–9792.
- [61] A. B. Steel, T. M. Herne, M. J. Tarlov, Electrochemical quantitation of DNA immobilized on gold, *Analytical Chemistry* 70 (22) (1998) 4670–4677.
- [62] R. Georgiadis, K. P. Peterlinz, A. W. Peterson, Quantitative measurements and modeling of kinetics in nucleic acid monolayer films using SPR spectroscopy, *Journal of the American Chemical Society* 122 (13) (2000) 3166–3173.
- [63] U. Rant, K. Arinaga, S. Fujita, N. Yokoyama, G. Abstreiter, M. Tornow, Structural properties of oligonucleotide monolayers on gold surfaces probed by fluorescence investigations, *Langmuir* 20 (23) (2004) 10086–10092.
- [64] E. L. S. Wong, E. Chow, J. J. Gooding, DNA recognition interfaces: The influence of interfacial design on the efficiency and kinetics of hybridization, *Langmuir* 21 (15) (2005) 6957–6965.
- [65] A. B. Steel, R. L. Levicky, T. M. Herne, M. J. Tarlov, Immobilization of nucleic acids at solid surfaces: Effect of oligonucleotide length on layer assembly, *Biophysical Journal* 79 (2) (2000) 975–981.
- [66] F. Eckstein, Phosphorothioatanaloga von Nucleotiden - Werkzeuge zur Untersuchung biochemischer Prozesse, *Angewandte Chemie* 95 (6) (1983) 431–447.
- [67] F. Eckstein, Phosphorothioate analogues of nucleotides - tools for the investigation of biochemical processes, *Angewandte Chemie, International Edition* 22 (6) (1983) 423–439.

- [68] Y. Yamamoto, H. Nishihara, K. Aramaki, Self-assembled layers of alkanethiols on copper for protection against corrosion, *Journal of The Electrochemical Society* 140 (2) (1993) 436–443.
- [69] M. Itoh, H. Nishihara, K. Aramaki, A chemical modification of alkanethiol self-assembled monolayers with alkyltrichlorosilanes for the protection of copper against corrosion, *Journal of The Electrochemical Society* 141 (8) (1994) 2018–2023.
- [70] K. Nozawa, K. Aramaki, One- and two-dimensional polymer films of modified alkanethiol monolayers for preventing iron from corrosion, *Corrosion Science* 41 (1) (1999) 57–73.
- [71] D. Y. Petrovykh, H. Kimura-Suda, L. J. Whitman, M. J. Tarlov, Quantitative analysis and characterization of DNA immobilized on gold, *Journal of the American Chemical Society* 125 (17) (2003) 5219–5226.
- [72] A. Kick, M. Bönsch, K. Kummer, D. V. Vyalikh, S. L. Molodtsov, M. Mertig, Controlling structural properties of self-assembled oligonucleotide-mercaptohexanol monolayers, *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* 172 (1-3) (2009) 36–41.
- [73] A. Kumar, G. M. Whitesides, Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an elastomeric stamp and an alkanethiol “ink” followed by chemical etching, *Applied Physics Letters* 63 (14) (1993) 2002–2004.
- [74] A. Kumar, H. A. Biebuyck, G. M. Whitesides, Patterning self-assembled monolayers: Applications in materials science, *Langmuir* 10 (5) (1994) 1498–1511.
- [75] A. Kumar, G. M. Whitesides, Patterned condensation figures as optical diffraction gratings, *Science* 263 (5143) (1994) 60–62.
- [76] R. Singhvi, A. Kumar, G. Lopez, G. Stephanopoulos, D. Wang, G. Whitesides, D. Ingber, Engineering cell shape and function, *Science* 264 (5159) (1994) 696–698.
- [77] T. Young, An essay on the cohesion of fluids, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 95 (1805) 65–87.

- [78] M. K. Chaudhury, G. M. Whitesides, How to make water run uphill, *Science* 256 (5063) (1992) 1539–1541.
- [79] F. Brochard, Motions of droplets on solid surfaces induced by chemical or thermal gradients, *Langmuir* 5 (2) (1989) 432–438.
- [80] P. Lenz, R. Lipowsky, Morphological transitions of wetting layers on structured surfaces, *Physical Review Letters* 80 (9) (1998) 1920–1923.
- [81] H. Gau, S. Herminghaus, P. Lenz, R. Lipowsky, Liquid morphologies on structured surfaces: From microchannels to microchips, *Science* 283 (5398) (1999) 46–49.
- [82] R. Lipowsky, Morphological wetting transitions at chemically structured surfaces, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 6 (1) (2001) 40–48.
- [83] Q. Chang, J. Alexander, Analysis of single droplet dynamics on striped surface domains using a lattice boltzmann method, *Microfluidics and Nanofluidics* 2 (2006) 309–326.
- [84] H. P. Jansen, O. Bliznyuk, E. S. Kooij, B. Poelsema, H. J. W. Zandvliet, Simulating anisotropic droplet shapes on chemically striped patterned surfaces, *Langmuir* 28 (1) (2012) 499–505.
- [85] O. Bliznyuk, H. P. Jansen, E. S. Kooij, H. J. W. Zandvliet, B. Poelsema, Smart design of stripe-patterned gradient surfaces to control droplet motion, *Langmuir* 27 (17) (2011) 11238–11245.
- [86] E. Kooij, H. Jansen, O. Bliznyuk, B. Poelsema, H. Zandvliet, Directional wetting on chemically patterned substrates, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 413 (2012) 328–333.
- [87] F. Götze, Mikrokontakt drucken zur hochdichten Präparation biologischer Mikroarray-Sensoroberflächen, Diplomarbeit, Technische Universität Dresden, Fakultät Maschinenwesen Institut für Werkstoffwissenschaft, Professur für Biomaterialien (2010).
- [88] J. D. Watson, F. H. Crick, Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid, *Nature* 171 (4356) (1953) 737–738.

- [89] J. Marmur, P. Doty, Heterogeneity in deoxyribonucleic acids: I. dependence on composition of the configurational stability of deoxyribonucleic acids, *Nature* 183 (4673) (1959) 1427–1429.
- [90] J. Marmur, P. Doty, Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature, *Journal of Molecular Biology* 5 (1) (1962) 109–118.
- [91] K. J. Breslauer, R. Frank, H. Blöcker, L. A. Marky, Predicting DNA duplex stability from the base sequence, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (11) (1986) 3746–3750.
- [92] J. SantaLucia, Jr., H. T. Allawi, P. A. Seneviratne, Improved nearest-neighbor parameters for predicting DNA duplex stability, *Biochemistry* 35 (11) (1996) 3555–3562.
- [93] R. Levicky, A. Horgan, Physicochemical perspectives on DNA microarray and biosensor technologies, *Trends in Biotechnology* 23 (3) (2005) 143–149.
- [94] K. A. Peterlinz, R. M. Georgiadis, T. M. Herne, M. J. Tarlov, Observation of hybridization and dehybridization of thiol-tethered DNA using two-color surface plasmon resonance spectroscopy, *Journal of the American Chemical Society* 119 (14) (1997) 3401–3402.
- [95] A. Peterson, R. Heaton, R. Georgiadis, The effect of surface probe density on DNA hybridization, *Nucleic Acids Research* 29 (24) (2001) 5163–5168.
- [96] V. Chan, D. Graves, S. McKenzie, The biophysics of DNA hybridization with immobilized oligonucleotide probes, *Biophysical Journal* 69 (6) (1995) 2243–2255.
- [97] A. Halperin, A. Buhot, E. B. Zhulina, On the hybridization isotherms of DNA microarrays: the langmuir model and its extensions, *Journal of Physics: Condensed Matter* 18 (18) (2006) S463–S490.
- [98] D. Irving, P. Gong, R. Levicky, DNA surface hybridization: Comparison of theory and experiment, *The Journal of Physical Chemistry B* 114 (22) (2010) 7631–7640.

- [99] P. W. Stevens, M. R. Henry, D. M. Kelso, DNA hybridization on microparticles: Determining capture-probe density and equilibrium dissociation constants, *Nucleic Acids Research* 27 (7) (1999) 1719–1727.
- [100] Y. Gao, L. K. Wolf, R. M. Georgiadis, Secondary structure effects on DNA hybridization kinetics: a solution versus surface comparison, *Nucleic Acids Research* 34 (11) (2006) 3370–3377.
- [101] L. Poulsen, M. J. Søe, D. Snakenborg, L. B. Møller, M. Dufva, Multi-stringency wash of partially hybridized 60-mer probes reveals that the stringency along the probe decreases with distance from the microarray surface, *Nucleic Acids Research* 36 (20) (2008) e132.
- [102] D. Erickson, D. Li, U. J. Krull, Modeling of DNA hybridization kinetics for spatially resolved biochips, *Analytical Biochemistry* 317 (2) (2003) 186–200.
- [103] J. Fiche, A. Buhot, R. Calemczuk, T. Livache, Temperature effects on DNA chip experiments from surface plasmon resonance imaging: Isotherms and melting curves, *Biophysical Journal* 92 (3) (2007) 935–946.
- [104] R. Owczarzy, B. G. Moreira, Y. You, M. A. Behlke, J. A. Walder, Predicting stability of DNA duplexes in solutions containing magnesium and monovalent cations, *Biochemistry* 47 (19) (2008) 5336–5353.
- [105] T. Špringer, H. Šípová, H. Vaisocherová, J. Štěpánek, J. Homola, Shielding effect of monovalent and divalent cations on solid-phase DNA hybridization: surface plasmon resonance biosensor study, *Nucleic Acids Research* 38 (20) (2010) 7343–7351.
- [106] T. M. Squires, S. R. Quake, Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale, *Reviews of Modern Physics* 77 (2005) 977–1026.
- [107] T. Gervais, K. F. Jensen, Mass transport and surface reactions in microfluidic systems, *Chemical Engineering Science* 61 (4) (2006) 1102–1121.
- [108] J. H.-S. Kim, A. Marafie, X.-Y. Jia, J. V. Zoval, M. J. Madou, Characterization of DNA hybridization kinetics in a microfluidic flow channel, *Sensors and Actuators, B: Chemical Sensors and Materials* 113 (1) (2006) 281–289.

- [109] O. Hofmann, G. Voirin, P. Niedermann, A. Manz, Three-dimensional microfluidic confinement for efficient sample delivery to biosensor surfaces. Application to immunoassays on planar optical waveguides, *Analytical Chemistry* 74 (20) (2002) 5243–5250.
- [110] K. L. Jiménez-Monroy, Immobilization of structured oligonucleotides on the gold surface of DNA chips based on surface plasmon resonance (SPR), Master-Arbeit, Technische Universität Dresden, Biotechnologisches Zentrum (BIOTEC) (2010).
- [111] K. Kummer, D. V. Vyalikh, G. Gavrila, A. Kade, M. Weigel-Jech, M. Mertig, S. L. Molodtsov, High-resolution photoelectron spectroscopy of self-assembled mercaptohexanol monolayers on gold surfaces, *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* 163 (1-3) (2008) 59–64.
- [112] A. Kick, M. Bönsch, S. Begemann, F. Sonntag, N. Schilling, J. Voigt, B. Katzschner, A. Herr, N. Danz, S. Howitz, U. Klotzbach, M. Jung, W. Brabetz, M. Mertig, SPR-basierte DNA-mikroarrays, in: 9. Dresdner Sensor-Symposium: 7.–9. Dezember, 2009, pp. 183–186.
- [113] L. McFail-Isom, C. C. Sines, L. D. Williams, DNA structure: cations in charge?, *Current Opinion In Structural Biology* 9 (3) (1999) 298–304.
- [114] T. K. Chiu, R. E. Dickerson, 1 Å crystal structures of B-DNA reveal sequence-specific binding and groove-specific bending of DNA by magnesium and calcium, *Journal of Molecular Biology* 301 (4) (2000) 915–945.
- [115] N. V. Hud, M. Polak, DNA-cation interactions: the major and minor grooves are flexible ionophores, *Current Opinion In Structural Biology* 11 (3) (2001) 293–301.
- [116] H. Asanuma, H. Noguchi, K. Uosalki, H. Z. Yu, Metal cation-induced deformation of DNA self-assembled monolayers on silicon: Vibrational sum frequency generation spectroscopy, *Journal of the American Chemical Society* 130 (25) (2008) 8016–8022.
- [117] B. Tinland, A. Pluen, J. Sturm, G. Weill, Persistence length of single-stranded DNA, *Macromolecules* 30 (19) (1997) 5763–5765.

- [118] Y. Ishige, M. Shimoda, M. Kamahori, Immobilization of DNA probes onto gold surface and its application to fully electric detection of DNA hybridization using field-effect transistor sensor, *Japanese Journal of Applied Physics Part 1-regular Papers Brief Communications & Review Papers* 45 (4B) (2006) 3776–3783.
- [119] S. D. Keighley, P. Li, P. Estrela, P. Mighorato, Optimization of DNA immobilization on gold electrodes for label-free detection by electrochemical impedance spectroscopy, *Biosensors and Bioelectronics* 23 (8) (2008) 1291–1297.
- [120] Y. Sakao, N. Ueno, F. Nakamura, F. Nakamura, E. Ito, J. Hayasi, M. Hara, Formation of DNA self-assembled monolayer on a gold substrate, *Molecular Crystals and Liquid Crystals* 407 (2003) 537–542.
- [121] Y. Sakao, F. Nakamura, N. Ueno, M. Hara, Hybridization of oligonucleotide by using DNA self-assembled monolayer, *Colloids and Surfaces B-biointerfaces* 40 (3-4) (2005) 149–152.
- [122] I. Koltover, K. Wagner, C. R. Safinya, DNA condensation in two dimensions, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (26) (2000) 14046–14051.
- [123] A. Halperin, A. Buhot, E. Zhulina, Sensitivity, specificity, and the hybridization isotherms of DNA chips, *Biophysical Journal* 86 (2) (2004) 718–730.
- [124] G. Bonnet, Thermodynamic basis of the enhanced specificity of structured DNA probes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (11) (1999) 6171–6176.
- [125] A. Tsourkas, M. A. Behlke, G. Bao, Structure-function relationships of shared-stem and conventional molecular beacons, *Nucleic Acids Research* 30 (19) (2002) 4208–4215.
- [126] A. Tsourkas, M. A. Behlke, S. D. Rose, G. Bao, Hybridization kinetics and thermodynamics of molecular beacons, *Nucleic Acids Research* 31 (4) (2003) 1319–1330.

- [127] D. D. Shoemaker, D. A. Lashkari, D. Morris, M. Mittmann, R. W. Davis, Quantitative phenotypic analysis of yeast deletion mutants using a highly parallel molecular bar-coding strategy, *Nature Genetics* 14 (4) (1996) 450–456.
- [128] J. N. Hirschhorn, P. Sklar, K. Lindblad-Toh, Y.-M. Lim, M. Ruiz-Gutierrez, S. Bolk, B. Langhorst, S. Schaffner, E. Winchester, E. S. Lander, SBE-TAGS: An array-based method for efficient single-nucleotide polymorphism genotyping, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (22) (2000) 12164–12169.
- [129] P. Gong, R. Levicky, DNA surface hybridization regimes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (14) (2008) 5301–5306.
- [130] L. L. H. Christensen, Theoretical analysis of protein concentration determination using biosensor technology under conditions of partial mass transport limitation, *Analytical Biochemistry* 249 (2) (1997) 153–164.
- [131] Y. Chung, Y. Lin, M. Shiu, W. T. Chang, Microfluidic chip for fast nucleic acid hybridization, *Lab on a Chip* 3 (4) (2003) 228.
- [132] M. P. B. Nagata, K. Yamashita, M. Miyazaki, H. Nakamura, H. Maeda, Enhanced thermal stability and mismatch discrimination of mutation-carrying DNA duplexes and their kinetic and thermodynamic properties in microchannel laminar flow, *Analytical Biochemistry* 390 (1) (2009) 38–45.
- [133] A. Kick, F. Götze, M. Mertig, Mikrokontaktdruck zur Kontrolle von Flüssigkeitsmorphologien bei der Herstellung von DNA-Mikroarrays, in: 7. Deutsches BioSensor-Symposium 2011, Heilbad Heiligenstadt, 3.–6. April, 2011, pp. 66–67.
- [134] A. Kumar, S. Phadtare, R. Pasricha, P. Guga, K. Ganesh, M. Sastry, Assembling gold nanoparticles in solution using phosphorothioate DNA as structural interconnects, *Current Science* 84 (1) (2003) 71–74.
- [135] L. Jiang, H. Zhang, J. Zhuang, B. Yang, W. Yang, T. Li, C. Sun, Sterically mediated two-dimensional architectures in aggregates of Au nanoparticles directed by phosphorothioate oligonucleotide-DNA, *Advanced Materials* 17 (17) (2005) 2066–2070.

- [136] B.-Q. Yang, L. Jiang, J.-Q. Zhuang, Y.-C. Liu, W. Xu, T.-J. Li, Assembly of Au nanoparticles with anisotropic optical property directed by 2'-phosphorothioate oligo-DNA, *Chinese Journal of Chemistry* 23 (9) (2005) 1143–1145.
- [137] J. H. Lee, D. P. Wernette, M. V. Yigit, J. Liu, Z. Wang, Y. Lu, Site-specific control of distances between gold nanoparticles using phosphorothioate anchors on DNA and a short bifunctional molecular fastener, *Angewandte Chemie, International Edition* 46 (47) (2007) 9006–9010.
- [138] I. Lubitz, A. Kotlyar, G4-DNA-coated gold nanoparticles: Synthesis and assembly, *Bioconjugate Chemistry* 22 (10) (2011) 2043–2047.
- [139] J. Ghabboun, M. Sowwan, H. Cohen, T. Molotsky, N. Borovok, B. Dwir, E. Kapon, A. Kotlyar, D. Porath, Specific and efficient adsorption of phosphorothioated DNA on Au-based surfaces and electrodes, *Applied Physics Letters* 91 (17) (2007) 173101.
- [140] H. Ceretti, B. Ponce, S. A. Ramírez, J. M. Montserrat, Adenosine reagentless electrochemical aptasensor using a phosphorothioate immobilization strategy, *Electroanalysis* 22 (2) (2010) 147–150.
- [141] P. V. Riccelli, F. Merante, K. T. Leung, S. Bortolin, R. L. Zastawny, R. Janeczko, A. S. Benight, Hybridization of single-stranded DNA targets to immobilized complementary DNA probes: comparison of hairpin versus linear capture probes, *Nucleic Acids Research* 29 (4) (2001) 996–1004.
- [142] C. Thiede, M. Bornhäuser, U. Oelschlägel, C. Brendel, R. Leo, H. Daxberger, B. Mohr, M. Florek, F. Kroschinsky, G. Geissler, R. Naumann, M. Ritter, G. Prange-Krex, T. Lion, A. Neubauer, G. Ehninger, Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell transplantation (BSCT) using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers, *Leukemia* 15 (2) (2001) 293–302.
- [143] J. van Dongen, E. Macintyre, J. Gabert, E. Delabesse, V. Rossi, G. Saglio, E. Gottardi, A. Rambaldi, G. Dotti, F. Griesinger, A. Parreira, P. Gameiro, M. Díaz, M. Malec, A. Langerak, J. San Miguel, A. Biondi, Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease - Report of the

- BIOMED-1 Concerted Action: Investigation of minimal residual disease in acute leukemia, *Leukemia* 13 (12) (1999) 1901–1928.
- [144] P. W. K. Rothmund, Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns, *Nature* 440 (7082) (2006) 297–302.
- [145] L. M. Adleman, Molecular computation of solutions to combinatorial problems, *Science* 266 (5187) (1994) 1021–1024.
- [146] A. Kick, M. Bönsch, B. Katzschner, J. Voigt, A. Herr, W. Brabetz, M. Jung, F. Sonntag, U. Klotzbach, N. Danz, S. Howitz, M. Mertig, DNA microarrays for hybridization detection by surface plasmon resonance spectroscopy, *Biosensors and Bioelectronics* 26 (4) (2010) 1543–1547.
- [147] A. Kick, M. Bönsch, M. Mertig, EGNAS: an exhaustive DNA sequence design algorithm, *BMC Bioinformatics* (2012) 13:138.
- [148] N. C. Seeman, Nucleic acid junctions and lattices, *Journal of Theoretical Biology* 99 (2) (1982) 237–247.
- [149] N. C. Seeman, N. R. Kallenbach, Design of immobile nucleic acid junctions, *Biophysical Journal* 44 (2) (1983) 201–209.
- [150] N. C. Seeman, De novo design of sequences for nucleic acid structural engineering, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 8 (3) (1990) 573–581.
- [151] R. Deaton, M. Garzon, R. C. Murphy, J. A. Rose, D. R. Franceschetti, S. E. Stevens, Jr., Genetic search of reliable encodings for DNA-based computation, in: J. R. Koza (Ed.), *Late Breaking Papers at the Genetic Programming 1996 Conference Stanford University July 28–31, 1996*, Stanford Bookstore, Stanford University, CA, USA, 1996, pp. 9–15.
- [152] M. Arita, A. Nishikawa, M. Hagiya, K. Komiyama, H. Gouzu, K. Sakamoto, Improving sequence design for DNA computing, in: *Proceedings of Genetic and Evolutionary Computation Conference 2000*, Morgan Kaufmann, 2000, pp. 875–882.
- [153] D. Faulhammer, A. R. Cukras, R. J. Lipton, L. F. Landweber, Molecular computation: RNA solutions to chess problems, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (4) (2000) 1385–1389.

- [154] U. Feldkamp, S. Saghafi, W. Banzhaf, H. Rauhe, DNasequencegenerator: A program for the construction of DNA sequences DNA computing, in: N. Jonoska, N. Seeman (Eds.), DNA Computing, Vol. 2340 of Lecture Notes in Computer Science, Springer Berlin / Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2002, Ch. 3, pp. 23–32.
- [155] S.-Y. Shin, D.-M. Kim, I.-H. Lee, B.-T. Zhang, Evolutionary sequence generation for reliable DNA computing, in: Proceedings of the 2002 Congress on Evolutionary Computation, 2002. CEC '02, Vol. 1, 2002, pp. 79–84.
- [156] F. Tanaka, M. Nakatsugawa, M. Yamamoto, T. Shiba, A. Ohuchi, Towards a general-purpose sequence design system in DNA computing, in: Proceedings of the 2002 Congress on Evolutionary Computation, 2002. CEC '02, Vol. 1, 2002, pp. 73–78.
- [157] F. Tanaka, M. Nakatsugawa, M. Yamamoto, T. Shiba, A. Ohuchi, Developing support system for sequence design in DNA computing, in: N. Jonoska, N. Seeman (Eds.), DNA Computing, Vol. 2340 of Lecture Notes in Computer Science, Springer Berlin / Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2002, Ch. 12, pp. 129–137.
- [158] L. Kaderali, A. Deshpande, J. P. Nolan, P. S. White, Primer-design for multiplexed genotyping, *Nucleic Acids Research* 31 (6) (2003) 1796–1802.
- [159] U. Feldkamp, H. Rauhe, W. Banzhaf, Software tools for DNA sequence design, *Genetic Programming and Evolvable Machines* 4 (2) (2003) 153–171.
- [160] P. Yin, B. Guo, C. Belmore, W. Palmeri, E. Winfree, T. H. LaBean, J. H. Reif, TileSoft: Sequence optimization software for designing DNA secondary structures (2004) <http://www.cs.duke.edu/~reif/paper/peng/TileSoft/TileSoft.pdf>, 18. März 2012.
- [161] U. Feldkamp, Computer aided DNA sequence design, Dissertation, Universität Dortmund, Fachbereich Informatik (2005).
- [162] U. Feldkamp, C. M. Niemeyer, Rationaler Entwurf von DNA-Nanoarchitekturen, *Angewandte Chemie* 118 (12) (2006) 1888–1910.
- [163] U. Feldkamp, C. M. Niemeyer, Rational design of DNA nanoarchitectures, *Angewandte Chemie, International Edition* 45 (12) (2006) 1856–1876.

- [164] J. Seiffert, Ein Sequenzdesign-Algorithmus für verzweigte DNA-Strukturen, Dissertation, Technischen Universität Dresden, Fakultät Informatik (2008).
- [165] J. Seiffert, A. Huhle, A full-automatic sequence design algorithm for branched DNA structures, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 25 (5) (2008) 453–466.
- [166] J. Zhu, B. Wei, Y. Yuan, Y. Mi, UNIQUIMER 3D, a software system for structural DNA nanotechnology design, analysis and evaluation, *Nucleic Acids Research* 37 (7) (2009) 2164–2175.
- [167] U. Feldkamp, CANADA: Designing nucleic acid sequences for nanobiotechnology applications, *Journal of Computational Chemistry* 31 (3) (2010) 660–663.
- [168] A. Brenneman, A. Condon, Strand design for biomolecular computation, *Theoretical Computer Science* 287 (1) (2002) 39–58.
- [169] L. A. Marky, L. Canuel, R. A. Jones, K. J. Breslauer, Calorimetric and spectroscopic investigation of the helix-to-coil transition of the self-complementary deoxyribonucleotide ATGCAT, *Biophysical Chemistry* 13 (2) (1981) 141–149.
- [170] D. Sen, W. Gilbert, Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis, *Nature* 334 (6180) (1988) 364–366.
- [171] W. I. Sundquist, A. Klug, Telomeric DNA dimerizes by formation of guanine tetrads between hairpin loops, *Nature* 342 (6251) (1989) 825–829.
- [172] T. A. Kunkel, Misalignment-mediated DNA synthesis errors, *Biochemistry* 29 (35) (1990) 8003–8011.
- [173] N. R. Markham, M. Zuker, DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction, *Nucleic Acids Research* 33 (Web Server issue) (2005) W577–W581.
- [174] U. Feldkamp, R. Wacker, H. Schroeder, W. Banzhaf, C. M. Niemeyer, Microarray-based in vitro evaluation of DNA oligomer libraries designed in silico, *ChemPhysChem* 5 (3) (2004) 367–372.
- [175] R. Penchovsky, J. Ackermann, DNA library design for molecular computation, *Journal of Computational Biology* 10 (2) (2003) 215–229.

- [176] S. A. Dunbar, Applications of Luminex[®] xMAP[™] technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection, *Clinica Chimica Acta* 363 (2006) 71–82.
- [177] J.-B. Fan, X. Chen, M. K. Halushka, A. Berno, X. Huang, T. Ryder, R. J. Lipshutz, D. J. Lockhart, A. Chakravarti, Parallel genotyping of human SNPs using generic high-density oligonucleotide tag arrays, *Genome Research* 10 (6) (2000) 853–860.
- [178] T. Tørring, N. V. Voigt, J. Nangreave, H. Yan, K. V. Gothelf, DNA origami: a quantum leap for self-assembly of complex structures, *Chemical Society Reviews* 40 (12) (2011) 5636–5646.
- [179] S. M. Douglas, A. H. Marblestone, S. Teerapittayanon, A. Vazquez, G. M. Church, W. M. Shih, Rapid prototyping of 3D DNA-origami shapes with caDNAno, *Nucleic Acids Research* 37 (15) (2009) 5001–5006.
- [180] C. Yanisch-Perron, J. Vieira, J. Messing, Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors, *Gene* 33 (1) (1985) 103–119.
- [181] B. Ding, Z. Deng, H. Yan, S. Cabrini, R. N. Zuckermann, J. Bokor, Gold nanoparticle self-similar chain structure organized by DNA origami, *Journal of the American Chemical Society* 132 (10) (2010) 3248–3249.
- [182] L. A. Stearns, R. Chhabra, J. Sharma, Y. Liu, W. T. Petuskey, H. Yan, J. C. Chaput, Template-directed nucleation and growth of inorganic nanoparticles on DNA scaffolds, *Angewandte Chemie, International Edition* 48 (45) (2009) 8494–8496.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Charakteristische Größen eines Mikroarrays.	9
1.2	Anzahl der Publikationen zum Thema SPR.	11
1.3	Anzahl der Publikationen zum Thema SPR und Nucleinsäuren. . . .	12
1.4	Anzahl der Publikationen zum Thema SPR und Nucleinsäuren, ge- ordnet nach Kategorien.	13
1.5	Prinzip der Detektion der PCR-Produkte mittels SPR.	16
1.6	SPR-Anordnungen nach OTTO sowie nach KRETSCHMANN und RAETHER. .	18
1.7	Aufbau des in der vorliegenden Arbeit verwendeten SPR-Sensors. . .	21
1.8	Mesomere Grenzstrukturen eines Phosphorothioatbausteins der PT- DNA.	24
1.9	Reaktionen bei der Beschichtung von Goldsubstraten mit einer MCU- SAM und bei der anschließenden Silanisierung mit 3-(Iodpropyl)tri- methoxysilan.	26
1.10	Nucleophile Substitution am Iodoalkyl-Rest durch eine Phosphoro- thioatgruppe.	26
1.11	Kontaktwinkel θ eines Tropfens auf einer Oberfläche.	29
1.12	Wasserstoffbrücken der Paarungen Adenin-Thymin und Guanin- Cytosin.	31
1.13	Das Blocken der freien Goldoberfläche bei der Herstellung eines DNA-Mikroarrays.	34
2.1	SPR-Einheit, mikrofluidischer Kanal und TOPAS [®] -Chip.	40
2.2	Optische Messkanäle.	40
2.3	Aufbau linienförmiger Sondenorte durch die Tropfenabgabe in zwei Durchgängen.	43
2.4	Aufbau der Mikroarrays mittels Nano Plotter 2.1.	45
2.5	Herstellung der PDMS-Stempel und schematischer Ablauf des μ CP. .	51

3.1	Steigerung der Sondendichte durch Zugabe des MgCl_2	56
3.2	Abhängigkeit der SPR-Signale von der MgCl_2 -Konzentration.	58
3.3	SPR-Signale beim Blocken gegen unspezifische Adsorption.	60
3.4	Mikroskopische Aufnahme der Rückstände nach dem Auftragen der Immobilisierungslösungen.	61
3.5	Einfluss der TAG/Anti-TAG-Sequenzen auf die Signalstärke.	62
3.6	Zusammenstellung der Fluoreszenzbilder auf einem DNA-Mikroarray nach der Hybridisierung und Einfärbung mit YOYO [®] -1-iodid.	63
3.7	Abhängigkeit der Hybridisierungssignale von der MgCl_2 -Konzentration in der Immobilisierungslösung und vom Pitch innerhalb der Spot-Linien, P_l	64
3.8	Abhängigkeit der Hybridisierungssignale von der Sondenkonzentration in der Immobilisierungslösung und vom Pitch innerhalb der Spot-Linien, P_l	65
3.9	Abhängigkeit der Hybridisierungssignale von den Additiven in der Immobilisierungslösung und vom Pitch innerhalb der Spot-Linien, P_l . Referenziert gegen eine geblockte Goldoberfläche. Das Signal auf dem Sondenort mit Anti-TAG ₁₃ als Kontrolle ist gezeigt.	66
3.10	Fluoreszenzbild zur Untersuchung des Glycerins als Zusatz.	66
3.11	SPR-Signale nach Hybridisierungen mit steigenden Konzentration der 300 bp langen PCR-Produkte.	67
3.12	Örtliche Auflösung der SPR-Signale auf vier ausgewählten Sondenorten eines DNA-Mikroarrays.	68
3.13	SPR-Signale nach der Hybridisierung mit 60, 100 oder 300 bp langen PCR-Produkten.	70
3.14	Kinetik der relativen SPR-Signale bei der Hybridisierung mit 60, 100 oder 300 bp langen PCR-Produkten.	71
3.15	Test auf Kreuzhybridisierungen. SPR-Signale auf dem Mikroarray eines TAG/Anti-TAG-Systems nach der Hybridisierung mit PCR-Produkten.	73
3.16	Hybridisierungskinetik in Abhängigkeit vom mikrofluidischen Fluss.	76
3.17	Endwerte der Hybridisierung nach etwa 90 min im Fluss.	77
3.18	Hybridisierungskinetik in Abhängigkeit vom mikrofluidischen Fluss. Lineare Regressionen bei gestoppter Pumpe.	78

3.19	Mikroskopbild der Rückstände einzelner 50- μ l-Tropfen auf hydrophob/hydrophil strukturierter Goldoberfläche eines Si-Wafers. . . .	79
3.20	Mikroskopische Aufnahme überbrückter, hydrophober Bereiche. . .	80
3.21	Mikroskopische Aufnahme der Rückstände auf hydrophob/hydrophil strukturierter SPR-Chipoberfläche.	80
3.22	SPR-Signale und fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach der Hybridisierung auf hydrophob/hydrophil strukturiertem SPR-Chip.	81
3.23	SPR-Signale nach 30 min Hybridisierung mit dem TAG ₁₇ -PCR-Produkt und Anti-TAG ₁₇ -Sonden, welche über Thiol- und Phosphorothioatgruppen direkt an die Goldoberfläche gebunden sind.	82
3.24	Kinetik der Hybridisierung des TAG ₁₇ -PCR-Produktes auf einem SPR-Chip, welcher mit 11-Mercapto-1-undecanol und 3-(Iodpropyl)-trimethoxysilan funktionalisiert ist.	86
5.1	Gleiten eines komplementären Sequenzpaares.	98
5.2	Vereinfachter Programmablaufplan einer Software auf Grundlage des erschöpfenden EGNAS-Algorithmus.	101
6.1	Satzgrößen bei eingeschränktem GC-Gehalt.	105
6.2	Histogramm der Satzgrößen.	107
6.3	L_{sl} -Einfluss auf die Satzgröße.	109
7.1	Prinzip der TAG-SBE-Genotypisierung.	120
8.1	Anordnen der Goldnanopartikel auf einem dreiecksförmigen DNA-Origami.	124
8.2	Prinzip der <i>In-situ</i> -Keimbildung und des Wachstums der Goldnanopartikel auf einer Sechs-Helixbündel-Nanoröhre.	126

Tabellenverzeichnis

1.1	Parameter zur Berechnung der molaren freien Enthalpie der Hybridisierung.	33
2.1	Primer-Sequenzen zur Synthese definierter PCR-Produkte.	42
2.2	TAG- und Kontroll-Sequenzen.	44
2.3	Verwendete Anti-TAG-Sequenzen bei der Optimierung der Immobilisierungsparameter.	46
2.4	Spots des Mikroarrays auf dem SPR-Chip zur Optimierung der Immobilisierungslösungen.	47
2.5	Sondensequenzen zur Untersuchung des Einflusses der Konzentration, Länge und Struktur der PCR-Produkte.	48
2.6	Sequenzen und Modifikationen der Phosphorothioat-DNA-Sonden.	53
3.1	TAG/Anti-TAG-System mit Kreuzhybridisierungen.	74
3.2	Theoretischer Gyrationradius der Sonden und deren Einfluss auf die SPR-Signale.	84
5.1	Satz 10 Basen langer Sequenzen mit $L_c = 3$, $L_{hp} = 4$, $L_{sc} = 8$, $L_{sl} = 4$	99
6.1	Einfluss des GC-Gehaltes und der GC-Enden auf die Satzgröße.	105
6.2	Sätze 10 Basen langer Sequenzen mit $L_c = 4$ für eine globale Criton-Regel.	106
6.3	Satzgrößen in Abhängigkeit von der Sequenzlänge (L_s) und Criton-Länge.	108
6.4	Vergleich 22 Basen langer Sequenzen, die von FELDKAMP <i>et al.</i> oder mit EGNAS generierter sind.	111
6.5	L_{hp} -Einfluss auf die Satzgröße bei 20 Basen langen Sequenzen.	111

6.6	Vergleich 20 Basen langer Sequenzen, die von TANAKA <i>et al.</i> , FELDKAMP <i>et al.</i> und mit EGNAS generiert werden.	112
6.7	Vergleich der 15 und 20 Basen langen Sequenzen, die von ARITA <i>et al.</i> , FELDKAMP <i>et al.</i> und mit EGNAS generiert werden.	114
6.8	Vergleich zwischen Sätzen der 15 Basen langen Sequenzen, die durch FAULHAMMER <i>et al.</i> , FELDKAMP <i>et al.</i> und EGNAS erstellt sind.	116
6.9	Vergleich der 20 Basen langen Sequenzen, die von SHIN <i>et al.</i> , FELDKAMP <i>et al.</i> und mit EGNAS generiert werden.	117
6.10	Rechenzeit in Abhängigkeit von der maximal geforderten Satzgröße.	118
7.1	Vergleich der von FAN <i>et al.</i> verwendeten TAGs mit denen durch EGNAS generierten.	121
7.2	Vergleich der von FAN <i>et al.</i> verwendeten SBE-TAGs mit den durch EGNAS generierten.	121
8.1	Vergleich der Sequenzen, die mit EGNAS erzeugt werden, mit denen, die von DING <i>et al.</i> zur Modifikation der Faltungsstränge verwendet werden.	125
8.2	Vergleich der Sequenzen, die mit EGNAS erzeugt werden, mit denen, die von STEARNS <i>et al.</i> zur Modifikation der Faltungsstränge verwendet werden.	127

Eigene wissenschaftliche Veröffentlichungen

Artikel in Fachzeitschriften

1. **A. Kick**, M. Bönsch, K. Kummer, D. V. Vyalikh, S. L. Molodtsov, M. Mertig, Controlling structural properties of self-assembled oligonucleotide-mercaptohexanol monolayers, *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* 172 (1-3) (2009) 36–41.
2. **A. Kick**, M. Bönsch, B. Katzschner, J. Voigt, A. Herr, W. Brabetz, M. Jung, F. Sonntag, U. Klotzbach, N. Danz, S. Howitz, M. Mertig, DNA microarrays for hybridization detection by surface plasmon resonance spectroscopy, *Biosens. Bioelectron.* 26 (4) (2010) 1543–1547.
3. K. Kummer, D. V. Vyalikh, G. Gavrila, A. B. Preobrajenski, **A. Kick**, M. Bönsch, M. Mertig, S. L. Molodtsov, Electronic structure of genomic DNA: A photoemission and X-ray absorption study, *The Journal of Physical Chemistry B* 114 (29) (2010) 9645–9652.
4. N. Danz, **A. Kick**, F. Sonntag, S. Schmieder, B. Höfer, U. Klotzbach, M. Mertig, Surface plasmon resonance platform technology for multi-parameter analyses on polymer chips, *Engineering in Life Sciences* 11 (4) (2011) 566–572.
5. **A. Kick**, M. Bönsch, M. Mertig, EGNAS: an exhaustive DNA sequence design algorithm, *BMC Bioinformatics* (2012) 13:138.
6. K.L. Jiménez-Monroy, **A. Kick**, K. Eersels, B. van Grinsven, P. Wagner, M. Mertig, Surface plasmon resonance-based DNA microarrays: Comparison of thiol and phosphorothioate modified oligonucleotides, zur Publikation angenommen bei: *Physica Status Solidi (a)*, 2013.

Vorträge und Beiträge in Tagungsbänden

7. W. Brabetz, S. Begemann, M. Bönsch, A. Herr, **A. Kick**, U. Klotzbach, S. Lehmann, K. Loewenbrück, M. Mertig, S. Pönschen, N. Schilling, F. Sonntag, M. Storch, C. Thiede, J. Voigt, G. Vollmer, J. Wober, M. Jung, Nachweis von DNA- und Proteininteraktionen auf dem SPR-Biochip, in: 7. Max-Bergmann-Symposium, Dresden, 16. November, 2010, S. 2.
8. **A. Kick**, M. Bönsch, A. Herr, W. Brabetz, M. Jung, F. Sonntag, M. Mertig, Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie für die Echtzeitanalyse von DNA-Mikroarrays, in: 7. Deutsches BioSensor Symposium 2011, Heilbad Heiligenstadt, 3.–6. April, 2011, S. 34.
9. **A. Kick**, C. Hiller, M. Müller, M. Bönsch, D. Appelhans, M. Jung, M. Mertig, Beschichtung von Glassubstraten für die enzymatisch unterstützte Genotypisierung, in: 16. Heiligenstädter Kolloquium, Technische Systeme für die Lebenswissenschaften, Heilbad Heiligenstadt, 24.–26. September, 2012, S. 213–218.
10. **A. Kick**, W. Brabetz, A. Herr, C. Hiller, M. Mertig, DNA-Chips – Forschung und Anwendung, in: 4. Dresdner Medizintechnik-Symposium, 3.–5. Dezember 2012, S. 99–102.

Poster und Beiträge in Tagungsbänden

10. **A. Kick**, S. Begemann, F. Sonntag, N. Schilling, J. Voigt, B. Katzschner, M. Bönsch, A. Herr, N. Danz, A. Benke, U. Klotzbach, M. Jung, M. Mertig, Development of a platform technology for the detection of genetic variations by surface plasmon resonance, in: EUROSENSORS XXII, Dresden, 7.–10. September, 2008, S. 1216–1219.
11. **A. Kick**, S. Begemann, F. Sonntag, N. Schilling, M. Bönsch, B. Katzschner, J. Voigt, A. Herr, N. Danz, S. Howitz, U. Klotzbach, M. Jung, M. Mertig, Development of a novel platform technology for the label-free detection of genetic variations by surface plasmon resonance, in: 4. Max-Bergmann-Symposium, Dresden, 4.–6. November, 2008, S. E::74.

12. K. Kummer, **A. Kick**, M. Bönsch, D. V. Vyalikh, M. Mertig, S. L. Molodtsov, Controlling structural properties of self-assembled oligonucleotide - mercaptohexanol monolayers, in: DPG Frühjahrstagung, Dresden 22.–27. März, 2009.
13. M. Mertig, **A. Kick**, M. Bönsch, B. Katzschner, J. Voigt, F. Sonntag, N. Schilling, U. Klotzbach, N. Danz, S. Begemann, A. Herr, M. Jung, A novel platform technology for the detection of genetic variations by surface plasmon resonance, in: Sensors, IEEE, 2009, S. 392–395.
14. **A. Kick**, M. Bönsch, S. Begemann, F. Sonntag, N. Schilling, J. Voigt, B. Katzschner, A. Herr, N. Danz, S. Howitz, U. Klotzbach, M. Jung, W. Brabetz, M. Mertig, SPR-basierte DNA-mikroarrays, in: 9. Dresdner Sensor-Symposium: 7.–9. Dezember, 2009, S. 183–186.
15. M. Bönsch, **A. Kick**, W. Brabetz, M. Mertig, Spezifischer Nachweis von Antikörpern aus Geflügelseren mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie, in: 39. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Stuttgart-Hohenheim, 20.–22. September, 2010.
16. N. Danz, F. Sonntag, **A. Kick**, S. Schmieder, B. Höfer, U. Klotzbach, M. Mertig, SPR Plattformtechnologie zur Multi-Parameter-Analyse auf polymeren Chips, in: 15. Heiligenstädter Kolloquium, Technische Systeme für die Lebenswissenschaften, Heilbad Heiligenstadt, 27.–29. September, 2010, S. 177–183.
17. M. Bönsch, **A. Kick**, W. Brabetz, M. Mertig, Spezifischer Nachweis von Mycoplasma synoviae aus Geflügelseren mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie, in: 7. Max-Bergmann-Symposium, Dresden, 16. November, 2010.
18. **A. Kick**, M. Bönsch, M. Mertig, A. Herr, W. Brabetz, M. Jung, F. Sonntag, Rapid detection of DNA hybridization on surface plasmon resonance based microarrays, in: Sensors, IEEE, 2010, S. 1636–1639.
19. **A. Kick**, M. Bönsch, A. Herr, W. Brabetz, M. Jung, F. Sonntag, M. Mertig, Plattformtechnologie basierend auf Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie für DNA-Mikroarrays zur schnellen Detektion von Hybridisierungen, in: 7. Max-Bergmann-Symposium, Dresden, 16. November, 2010, S. 16.

20. M. Bönsch, **A. Kick**, W. Brabetz, M. Mertig, Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie für den spezifischen Nachweis von Antikörpern gegen Mycoplasma Synoviae aus Geflügelseren, in: 7. Deutsches BioSensor Symposium 2011, Heilbad Heiligenstadt, 3.–6. April, 2011, S. 65.
21. **A. Kick**, F. Götze, M. Mertig, Mikrokontaktdrucke zur Kontrolle von Flüssigkeitsmorphologien bei der Herstellung von DNA-Mikroarrays, in: 7. Deutsches BioSensor Symposium 2011, Heilbad Heiligenstadt, 3.–6. April, 2011, S. 66–67.
22. **A. Kick**, M. Mertig, Hybridisierungskinetik und Massentransport auf DNA-Chips basierend auf Oberflächenplasmonenresonanz, in: Vortrags- und Diskussionstagung: Bioverfahrenstechnik an Grenzflächen, Potsdam, 30. Mai–1. Juni, 2011.
23. N. Danz, **A. Kick**, F. Sonntag, S. Schmieder, M. Mertig, U. Klotzbach, SPR-Technologie zur Multi-Parameter-Analyse auf polymeren Chips, in: Mikrosystemtechnik, Kongress, Darmstadt, 10.–12. Oktober, 2011.
24. **A. Kick**, M. Mertig, DNA-Sequenzauswahl und ihr Einfluss auf die Hybridisierung auf SPR-Mikroarrays, in: 10. Dresdner Sensor-Symposium, 5.–7. Dezember, 2011, S. 359–362.
25. C. Hiller, **A. Kick**, B. Katzschner, M. Müller, M. Bönsch, J. Voigt, D. Appelhans, W. Brabetz, M. Jung, M. Mertig, Entwicklung polymerbeschichteter DNA-Chip-Oberflächen für enzymatisch unterstützte Genotypisierungen, in: 10. Dresdner Sensor-Symposium, 5.–7. Dezember, 2011, S. 355–358.
26. **A. Kick**, C. Hiller, M. Müller, M. Bönsch, D. Appelhans, M. Jung, M. Mertig, Polymer coatings of DNA chips for enzyme-supported genotyping, in: 13th Dresden Polymer Discussion and 8th Max-Bergmann-Symposium, Meißen, 1.–4. April, 2012.
27. **A. Kick**, W. Brabetz, M. Bönsch, A. Herr, C. Hiller, M. Mertig, Sequenzgenerierung für DNA-Chips, in: 8. Deutsches BioSensor-Symposium 2013, Wildau, 10.–13. März, 2013, S. 90.

Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. rer. nat. et Ing. habil. MICHAEL MERTIG für die Bereitstellung des Themas meiner Dissertation, für die Unterstützung und das Vertrauen bei der freien Gestaltung dieser Arbeit.

Mitarbeiter der Technischen Universität Dresden haben an der Entstehung dieser Dissertation mitgewirkt. Ich danke MARTIN BÖNSCH für die ausgezeichnete und intensive Zusammenarbeit. Insbesondere ist ihm die Programmierung der EGNAS-Software zu verdanken. Ich bedanke mich bei Dr. rer. nat. KURT KUMMER für die Durchführung der XPS-Messungen und die dazugehörige Datenanalyse. Für die experimentelle Mitarbeit bedanke ich mich bei BEATE KATZSCHNER, JAN VOIGT, FRANK GÖTZE und KATHIA LORENA JIMÉNEZ-MONROY. FRANK GÖTZE beteiligte sich in Form seiner Diplomarbeit an der Entwicklung der Methoden zur hydrophil/hydrophoben Strukturierung der Goldoberflächen. KATHIA LORENA JIMÉNEZ-MONROY untersuchte in ihrer Master-Arbeit die Immobilisierung der Phosphorothioat-DNA und lieferte wichtige Beiträge zum Aufbau entsprechender DNA-Biosensoren, welche in der vorliegenden Dissertation beschrieben sind.

Weiterhin wurde die vorliegende Arbeit im Rahmen von Projekten angefertigt, in denen besonders die Biotype Diagnostic GmbH, das Fraunhofer-Institut für Angewandte Optik und Feinmechanik IOF, das Fraunhofer-Institut für Werkstoff- und Strahltechnik IWS sowie die GeSiM mbH an der Umsetzung der für die Dissertation relevanten Vorhaben beteiligt waren. Diese Projekte wurden durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (Förderkennzeichen: 03WKBH2) und die Sächsische Aufbaubank (Förderkennzeichen: 14119/2447, 14120/2447) gefördert.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Die Dissertation wurde durch Prof. Dr. rer. nat. et Ing. habil. MICHAEL MERTIG wissenschaftlich betreut und wurde an der Technischen Universität Dresden, Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften, Fachrichtung Chemie und Lebensmittelchemie, Professur für Physikalische Chemie, Mess- und Sensortechnik sowie am Kurt-Schwabe-Institut für Mess- und Sensortechnik e. V. Meinsberg angefertigt.

Dresden, 28. März 2013

ALFRED KICK