

**Hybridisierungsbasierte Multiplex-Detektion von microRNA
mit CMOS-Technologie
für die Anwendung in der Point-of-Care-Diagnostik**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Stefan Hofmann

geboren in Schweinfurt

Würzburg, 2017



Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Dandekar

Gutachter: Prof. Dr. Harald Schulze

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Zielsetzung der Arbeit.....	1
1.2 In-vitro-Diagnostik.....	2
1.3 miRNA als neuer Spieler in der Medizin.....	4
1.4 miRNA-Biologie	4
1.5 Zirkulierende miRNAs	6
1.6 <i>Point-of-Care</i> Diagnostik	8
1.7 Detektion von miRNAs	9
1.7.1 Elektrochemisches Detektionsverfahren	9
1.7.2 Der Biosensor: Siemens CMOS-Technologie.....	10
1.7.3 Biochemische Funktionalisierung der Sensorpositionen.....	10
1.7.4 Signalerzeugung/-transduktion.....	11
1.8 Überblick	13
2. Materialien	15
2.1 Messtechnik	15
2.1.1 CMOS-Chip.....	15
2.1.2 Gerätschaften zur Durchführung der Assays.....	16
2.1.3 Dichtungen und Messkartuschen	17
2.2 Puffer und Lösungen	17
2.3 Enzyme, Kits und Standards.....	19
2.4 Chemikalien.....	20
2.5 Einmal- und Plastikwaren	20
2.6 Laborgeräte	21
2.7 Oligonukleotide.....	22
2.8 Software.....	22
3. Methoden	23
3.1 Molekularbiologische Methoden.....	23
3.1.1 Phosphorylierung von 5'OH-Nukleinsäuren.....	23
3.1.2 <i>Annealing</i> komplementärer Nukleinsäure-Einzelstränge.....	23
3.1.3 Synthese von Esterase 2-Oligonukleotid-Konjugaten.....	23
3.1.4 Quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	25

3.2	Theoretische Kalkulationen.....	26
3.2.1	Berechnung von Schmelztemperaturen	26
3.2.2	Analyse von Sekundärstrukturen	27
3.3	CMOS-Chip Messungen.....	27
3.3.1	Vorbereitung der CMOS-Chips.....	27
3.3.1.1	Reinigung der Chipoberfläche	28
3.3.1.2	Vorbereitung der Immobilisierungslösungen	28
3.3.1.3	Immobilisierung von Fänger-molekülen.....	29
3.3.1.4	Fänger-Belegungsmuster der Chips.....	30
3.3.2	Herstellung der LockSpot-Dichtungen	31
3.3.3	Modulare Messapparatur für Messungen mit der FlowStop-Methode.....	32
3.3.3.1	Aufbau des Messsystems.....	32
3.3.3.2	Versuchsdurchführung und Messung.....	32
3.3.4	Modulare Messapparatur für Messungen mit der LockSpot-Methode.....	34
3.3.4.1	Aufbau des Messsystems.....	34
3.3.4.2	Versuchsdurchführung und Messung.....	34
3.3.5	Quicklab-Reader	35
3.3.5.1	Aufbau des Messsystems.....	36
3.3.5.2	Versuchsdurchführung und Messung.....	37
3.3.6	Auto-Reader	38
3.3.6.1	Aufbau des Messsystems.....	39
3.3.6.2	Vorbereitung der Messkartusche.....	39
3.3.6.3	Programmierung des Assay-Ablaufs.....	41
3.3.6.4	Versuchsdurchführung und Messung.....	42
3.3.7	Datenanalyse und Auswertung	43
3.4	Detektion von microRNA	45
3.4.1	2-Komponenten-Methode	46
3.4.1.1	Detektion einer biotinylierten Sonde.....	46
3.4.1.2	Detektion des Esterase-Konjugats (Konzentrationsreihe).....	46
3.4.2	3-Komponenten-Methode	47
3.4.2.1	Messung einer Konzentrationsreihe	47
3.4.2.2	Messung einer Schmelzkurve	47
3.4.3	4-Komponenten-Methode	48
3.4.3.1	1-Schritt-Variante	48
3.4.3.2	2-Schritte-Variante.....	49
3.4.3.2.1	Verwendung der modularen LockSpot-Apparatur	49
3.4.3.2.2	Verwendung des QuickLab-Geräts	49
3.4.3.3	3-Schritte-Variante (QuickLab-Gerät).....	50
3.4.3.4	Automatische Durchführung der 4-Komponenten-Methode.....	50
3.4.4	Sandwich-Ligations-Methode.....	51
3.4.4.1	Herstellung der doppelsträngigen Reporter-Komponenten.....	52
3.4.4.2	Manuelle Durchführung der Analyse	52
3.4.4.3	Automatische Durchführung der Analyse	52
3.4.4.4	Signalamplifikation mit bDNA	54
3.5	Analyse biologischer Proben	54
3.5.1	Gewinnung von Probenmaterial	54
3.5.1.1	Spenderblut	54
3.5.1.2	Patienten- und Kontrollproben.....	55
3.5.2	Extraktionsmethode	55
3.5.3	Analyse der RNA-Extrakte	56

4. Ergebnisse.....	57
4.1 Grundlegende Funktion des Messaufbaus und -prinzips	58
4.1.1 Hybridisierung, Markierung und Messung biotinylierter DNA-Sonden	58
4.1.2 Detektion einer EST2-gekoppelten Sonde (Konzentrationsreihe).....	60
4.2 Etablierung einer leistungsfähigen Methode zur Detektion von miRNA	62
4.2.1 3-Komponenten-Methode	62
4.2.1.1 Oligo-Design	63
4.2.1.2 Test des Detektionsprinzips	64
4.2.2 4-Komponenten-Methode	67
4.2.2.1 Oligo-Design	68
4.2.2.2 Etablierung des Messprinzips mit DNA als Ziel-Nukleinsäure	70
4.2.2.2.1 1-Schritt-Variante.....	70
4.2.2.2.2 2-Schritte-Variante.....	71
4.2.2.2.3 3-Schritte-Variante.....	72
4.2.2.3 Detektion von miRNA	76
4.2.2.3.1 Untersuchung zum Einsatz von RNA als Ziel-Nukleinsäure	77
4.2.2.3.2 Ermöglichung der Ligation am 5'-Ende der miRNA.....	78
4.2.2.4 Multiplexfähigkeit	84
4.2.2.4.1 Chimär-Fänger-Satz A.....	85
4.2.2.4.2 Chimär-Fänger-Satz B.....	87
4.2.2.5 Sensitivität	89
4.2.3 Sandwich-Ligations-Methode.....	90
4.2.3.1 Oligo-Design	92
4.2.3.2 Test und Performance des Detektionsprinzips.....	95
4.2.3.2.1 Sensitivität	95
4.2.3.2.2 Multiplexfähigkeit	96
4.2.3.2.3 Spezifität.....	97
4.2.3.3 Differenzierung von IsomiRs	99
4.2.3.4 Einsatz von bDNA zur Signalamplifikation	101
4.2.3.4.1 Oligo-Design	103
4.2.3.4.2 Test und Sensitivität der bDNA-Variante.....	103
4.3 Quantifizierung endogener miRNAs mit der Sandwich-Ligations-Methode	105
4.3.1 Etablierung und Optimierung eines kardialen miRNA-Panels.....	106
4.3.1.1 Test eines Teil-Panels aus sieben miRNAs	107
4.3.1.2 Variation der „Nick“-Position des Hybridisierungskonstrukts	109
4.3.1.3 Zuordnung der Fängersequenzen	112
4.3.1.4 Performance des optimierten miRNA-Detektionspanels	115
4.3.2 Analyse endogener miRNAs aus Blutproben	118
4.3.2.1 Untersuchung von Spenderblut	118
4.3.2.2 Vergleich mit quantitativer Polymerase-Kettenreaktion.....	122
4.3.2.3 Untersuchung von AMI-Patientenproben	123
5. Diskussion.....	125
5.1 Grundlegendes Detektionssystem	125
5.2 3-Komponenten-Methode	125
5.3 4-Komponenten-Methode	127
5.3.1 1-Schritt-Variante.....	127

5.3.2	2-Schritte-Variante.....	128
5.3.3	3-Schritte-Variante.....	128
5.4	Besonderheiten bei der Detektion von miRNA.....	130
5.5	Sandwich-Ligations-Methode.....	132
5.5.1	Entstehung und Konzept	132
5.5.2	Komponentendesign und Assay-Performance	133
5.5.3	Spezifität.....	135
5.5.3.1	Sequenzähnlichkeit.....	135
5.5.3.2	IsomiRs.....	136
5.5.3.3	miRNA-Vorstufen.....	138
5.5.4	Steigerung der Sensitivität durch Signalamplifikation mit bDNA	138
5.6	Detektion endogener miRNAs	139
5.6.1	Validierung der Detektionsmethode	139
5.6.2	Analyse von AMI-Patientenproben	141
5.7	Ausblick.....	143
6.	Zusammenfassungen	145
6.1	Deutsche Zusammenfassung.....	145
6.2	English Summary	147
7.	Literaturverzeichnis	149
8.	Anhang.....	162
8.1	Abkürzungsverzeichnis	162
8.2	Nukleinsäuresequenzen	165
8.3	Makrodateien.....	170
8.3.1	4-Komponenten1-TS50	170
8.3.2	4-Komponenten2-TS55	173
8.3.3	dsSandwichVar1-10µl.....	176
8.3.4	dsSandwichVar1-60µl.....	179
8.3.5	dsSandwichVar2	182
8.4	Eigene Veröffentlichungen	185
8.5	Danksagung	186
8.6	Erklärung an Eides statt	188

1. Einleitung

1.1 Zielsetzung der Arbeit

Angesichts des massiven Forschungsaufwandes, der aktuell zur Identifikation und Validierung geeigneter miRNA-Biomarker für den weitreichenden Einsatz in der Medizin betrieben wird, sollte in dieser Arbeit ein quantitativer, amplifikations- und markierungsfreier multiplex miRNA-Detektionsassay für ein bei Siemens in Jahre langer Forschung etabliertes elektrochemisches POC-Messsystem auf Basis eines CMOS-Biochips zunächst exploriert und dann ausführlich wissenschaftlich untersucht werden.

Die besonderen Anforderungen, die miRNA als Ziel-Nukleinsäure an einen solchen Detektionsassay stellt, sollten dabei berücksichtigt und die resultierenden Herausforderungen durch molekularbiologische und biochemische Ansätze gelöst werden. Dazu zählen zum Einen die geringe Länge und die hohe Variabilität des GC-Gehalts von miRNA-Sequenzen, die großen Einfluss auf das Hybridisierungsverhalten haben (de Planell-Saguer and Rodicio 2011). Zum Anderen zeigen miRNAs untereinander teilweise sehr hohe Sequenzähnlichkeiten, die vor allem innerhalb von miRNA-Familien wie let-7 auftreten und die bei der Detektion differenzierbar sein sollten. Weiterhin ist für eine genaue und vergleichbare Messung eine Unterscheidung zwischen fertig prozessierten miRNAs und den längeren Vorläufer-Molekülen (pri-miRNA und pre-miRNA) erforderlich, welche ebenfalls in der Gesamt-RNA biologischer Proben vorhanden sind. In diesem Zusammenhang ist auch die Möglichkeit, gezielt einzelne IsomiRs quantifizieren zu können, wünschenswert, um die Vielzahl potenzieller miRNA-Biomarker noch genauer auflösen zu können.

Weitere Vorgaben für den zu etablierenden Detektionsassay ergaben sich aus der beabsichtigten Anwendbarkeit in der POC-Diagnostik. Da miRNA-Biomarker erst durch die Quantifizierung eines Panels aus mehreren Kandidaten eine ausreichende medizinische Aussagekraft versprechen, wurden der Multiplexfähigkeit und der Dynamik des Messbereichs der in dieser Arbeit etablierten Methode besondere Bedeutung zugeschrieben. Auch die Sensitivität der Detektion wurde als entscheidender Faktor festgelegt, um bei Bedarf auch niedrig konzentrierte miRNAs analysieren zu können. Im POC-Bereich ist außerdem eine besonders schnelle

Durchführung des Assays bei einfacher Bedienung des Testequipments erforderlich. Daher sollte ein Protokoll etabliert werden, das speziell auch bei kurzen Inkubationszeiten gute Ergebnisse liefert. Gleichzeitig sollten die einzelnen Assayschritte möglichst einfach gehalten werden, um eine robuste Automatisierung der Abläufe zu ermöglichen. Die Kosteneffizienz der eingesetzten Materialien war ein weiterer Punkt, der im Hinblick auf einen diagnostischen Routineeinsatz der zu etablierenden Methode berücksichtigt werden sollte, da dieser translationale Forschungsansatz sonst nicht in der Klinik verankert werden wird.

Um zum Einen eine schnelle Durchführung des Detektionsassays zu gewährleisten und zum Anderen eine durch präanalytische Modifikationen verursachte Verzerrung der Messergebnisse zu vermeiden, sollte sowohl auf eine Amplifikation als auch auf eine vorgeschaltete Markierung der Ziel-Nukleinsäuren verzichtet werden. Zur optionalen Verbesserung der Sensitivität sollte jedoch eine Verstärkung des Messsignals durch die Verwendung von *branched* DNA (bDNA; verzweigte DNA) untersucht werden.

Schließlich war es Ziel, die diagnostische Anwendbarkeit des vielversprechendsten Ansatzes durch die Quantifizierung aus Spenderblut gewonnener endogener miRNAs eines Achtplex-Panels zu validieren. Da frühere Untersuchungen auf Dysregulationen der miRNAs des gewählten Panels im Zusammenhang mit Herzerkrankungen hindeuten, sollten abschließend entsprechende Patienten- und Kontrollproben mit der etablierten Methode untersucht und die Ergebnisse verglichen werden.

1.2 In-vitro-Diagnostik

Unter dem Begriff In-vitro-Diagnostik versteht man im Allgemeinen die Untersuchung von Probenmaterial, das dem menschlichen Körper entnommen wurde, zur Erkennung von Krankheiten. Dabei handelt es sich in der Regel um Körperflüssigkeiten, wie Blut oder Urin, oder entnommene Gewebeproben. Zu den bekanntesten Formen zählen das klassische Blutbild, das aus einer Blutprobe gewonnen wird und hauptsächlich Angaben über Zahl und Morphologie der weißen und roten Blutzellen liefert, und die Biopsie, bei der Gewebeproben entnommen und anschließend mit unterschiedlichen Verfahren (Färbungen, biochemische und

molekularbiologische Methoden) untersucht werden. Auch Stuhl-, Sperma- und Urinproben oder Abstriche kommen für In-vitro-Untersuchungen in Frage.

Bei der Entnahme von Blut handelt es sich um ein minimal invasives Routineverfahren, das relativ risikoarm für den Patienten ist und trotzdem ein großes Repertoire an relevanten diagnostischen Tests ermöglicht. Neben der Auswertung von Blutbildern bietet auch eine Vielzahl von immunologischen Tests, bei denen Antikörper zur Detektion aussagekräftiger Substanzen eingesetzt werden, zahlreiche diagnostische Möglichkeiten. Dabei können beispielsweise körpereigene Antikörper, die gegen einen bestimmten Erreger gebildet wurden, identifiziert werden (Beispiel: HIV-Test), oder der Spiegel von Hormonen im Blut quantifiziert werden, um Auswirkungen von Krankheiten erkennen zu können (Beispiel: Schilddrüsenhormone bei Hashimoto-Thyreoditis). Teilweise müssen zur Ermittlung eines konkreten Befunds mehrere solcher Tests durchgeführt und die Ergebnisse kombiniert werden.

Die molekulare In-vitro-Diagnostik beschäftigt sich dagegen mit der Detektion und Analyse von Nukleinsäuren. Große Anwendung findet sie bei der Erkennung und Behandlung von Infektionskrankheiten, die durch Viren und Bakterien hervorgerufen werden. Dabei ist nicht nur die Menge des jeweiligen Erregers interessant (Beispiel: Bestimmung der Viruslast bei HIV-Patienten), sondern auch eine genaue Genotypisierung des Pathogens (Beispiele: Resistenzanalyse bei Sepsis, Virusstamm bei HIV). Weiterhin wird die molekulare Diagnostik bei der Untersuchung vorliegender Erbkrankheiten und genetischer Prädispositionen, beispielsweise im Zusammenhang mit Krebserkrankungen, angewendet.

Wurde bereits eine Krebserkrankung diagnostiziert, kann die Spezifizierung bestimmter Schlüsselveränderungen der DNA im Tumorgewebe eine wichtige Rolle bei der Auswahl der individuellen Therapie spielen. Bei Patientinnen mit Brustkrebs wird beispielsweise die Expression des Wachstumsfaktor-Rezeptors HER2 in den Tumorzellen analysiert, um eine Entscheidung für die richtige Behandlung treffen zu können (Wolff *et al.* 2007). Dabei wird neben der immunohistochemischen Bestimmung des Expressionslevels des Proteins auch eine mögliche Amplifikation des HER2-Gens mit molekularbiologischen Methoden (In-situ-Hybridisierung) untersucht.

1.3 miRNA als neuer Spieler in der Medizin

Seit dem Einzug molekularer Testverfahren in das klinische Labor in den 1980er Jahren haben sich nicht nur die eingesetzten Methoden bei der Analyse geändert (Tsongalis and Silverman 2006), sondern auch die Zahl der bekannten genomischen Biomarker und Biomarkertypen ist gestiegen. Gerade die Entdeckung der miRNAs als wichtige Regulatoren der Genexpression im Jahre 1993 verspricht heute neue Möglichkeiten vor allem bei der frühzeitigen Erkennung nicht-infektiöser Erkrankungen wie Krebs oder Herzinfarkt (Lee *et al.* 1993, Meder *et al.* 2011, Cheng 2015). Im Jahr 2005 lag die Zahl der Veröffentlichungen, die Veränderungen in der Expression von miRNAs in Tumorgeweben aufzeigte, bei etwas mehr als einem Dutzend und erste miRNA-Signaturen konnten mit dem Verlauf von Krankheiten und deren Prognose in Verbindung gebracht werden (Couzin 2005). Inzwischen ist klar, dass miRNAs bei der Ausbildung aller sechs von Hanahan und Weinberg festgelegten Schlüsselmerkmale von Krebszellen relevant sind und daher vielversprechende Ziele bei der Diagnostik und Therapie von Tumorpatienten/-erkrankungen darstellen (Hanahan and Weinberg 2011, Hayes *et al.* 2014). Aber auch im Zusammenhang mit vielen anderen Krankheiten wurde die große medizinische Relevanz von miRNAs gezeigt. Dazu zählen auch kardiovaskuläre Erkrankungen, die mit mehr als 17 Millionen Opfern jährlich die weltweit häufigste Todesursache darstellen (Condorelli *et al.* 2014, Mozaffarian *et al.* 2015).

1.4 miRNA-Biologie

In ihrer Funktion in der Zelle sind miRNAs wichtige negative Regulatoren der Translation und der mRNA-Stabilität. Sie sind etwa 18-24 Nukleotide lang und kodieren nicht für Proteine, sondern binden hauptsächlich an die 3'UTR (*untranslated region*) von mRNAs. Als wesentlicher Teil der Genregulation sind miRNAs zwischen verwandten Organismen hoch konserviert (Bartel 2004). Schließlich sind sie von großer Bedeutung bei der Entwicklung, dem Gewebewachstum, der Zelldifferenzierung und der Apoptose (Xu *et al.* 2004, Boehm and Slack 2005, Chen and Hu 2012). In diesem Zusammenhang können sie auch als Onkogene oder Tumorsuppressoren wirken (Welch *et al.* 2007, Knackmuss *et al.* 2015). Die Gene für

die Transkription von miRNA-Sequenzen treten einzeln oder in Form von Clustern im Genom auf. Dabei können sie auch als Teile von Introns innerhalb proteinkodierender Abschnitte vorliegen (Rodriguez *et al.* 2004).

Das Transkript, die sogenannte primäre miRNA (pri-miRNA), wird im ersten Prozessierungsschritt von der Ribonuklease III ‚Drosha‘ in einzelne Haarnadelstrukturen (engl.: *hairpins*) gespalten, die als Vorläufer-miRNAs (pre-miRNA) bezeichnet werden (Lee *et al.* 2003). Die pre-miRNA wird in das Zytoplasma transportiert und von einer weiteren Ribonuklease III namens ‚Dicer‘ zu Stücken aus etwa 22 Nukleotiden prozessiert (Hutvagner *et al.* 2001). Der Multiproteinkomplex RISC (*RNA-induced silencing complex*) nimmt die fertige miRNA auf und vermittelt die Interaktion mit den passenden mRNAs (Abbildung 1). Dabei wird meist die Translation der Ziel-Nukleinsäure unterdrückt oder der Abbau der mRNA induziert (Pasquinelli 2012). Unter bestimmten Bedingungen konnte aber auch bereits eine miRNA-induzierte Hochregulierung der Expression einer Ziel-mRNA gezeigt werden (Mortensen *et al.* 2011).

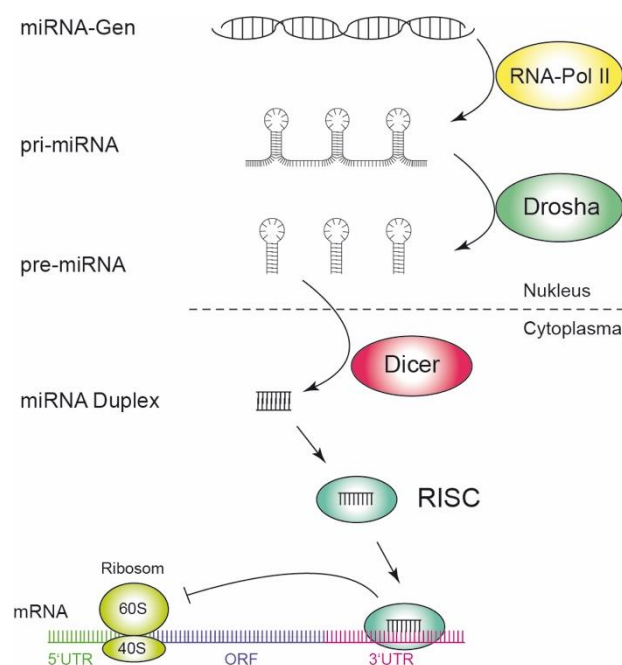


Abbildung 1: Prozessierung und Funktion der miRNA (stark vereinfacht). Das miRNA-Gen wird von der RNA-Polymerase II abgelesen. Das Primärtranskript (pri-miRNA) wird im Nucleus von der Ribonuklease Drosha in einzelne Haarnadelstrukturen (pre-miRNA) geschnitten, die anschließend ins Cytoplasma exportiert werden. Dort werden sie von der Ribonuklease Dicer prozessiert und es entstehen etwa 22 Nukleotide lange Duplex-miRNAs. Die Einzelstränge werden aufgetrennt, von RISC (RNA-induced silencing complex) gebunden und vermitteln schließlich die Bindung an die Ziel-mRNA. Der Komplex kann dort die Translation des Transkripts inhibieren oder den Abbau der mRNA induzieren. (Quelle: Entnommen aus eigener Diplomarbeit, S. 10.)

Durch die Verbreitung von Next-Generation-Sequencing-Verfahren bei der Analyse von miRNAs wurde außerdem aufgedeckt, dass in Zellen mehrere stabile Varianten der bekannten miRNAs vorhanden sind (Morin *et al.* 2008). Diese sogenannten IsomiRs weisen verschiedene Abweichungen zur kanonischen Sequenz auf, wie zusätzliche oder fehlende Basen am 3'- oder 5'-Ende (Nielsen *et al.* 2012). Durch *Ultra-deep*-Sequenzierung konnte gezeigt werden, dass es sich dabei nicht um Sequenzierungsartefakte handelt. Die Addition von Nukleotiden an das 3'-Ende von miRNAs wurde beispielsweise als physiologischer Prozess beschrieben, der durch verschiedene Nukleotidyltransferasen vermittelt wird und die Stabilität und Aktivität der miRNA beeinflussen kann (Jones *et al.* 2009, Katoh *et al.* 2009, Wyman *et al.* 2011). Als biologischen Zweck des Auftretens von IsomiRs schlagen Cloonan *et al.* vor, dass diese die Spezifität von miRNA-mRNA Interaktionen erhöhen, indem das Signal-Rausch-Verhältnis bei der Auswahl der Ziel-mRNAs durch das Zusammenwirken der verschiedenen miRNA-Varianten verbessert wird (Cloonan *et al.* 2011).

Obwohl in die Aufdeckung der genauen Mechanismen der miRNA-vermittelten Genregulation in den letzten zehn Jahren viel Arbeit investiert wurde, bestehen aufgrund ihrer Komplexität noch zahlreiche Unklarheiten (Breving and Esquela-Kerscher 2010, Chen *et al.* 2015). Es ist jedoch sicher, dass miRNAs wegen ihrer weitreichenden Wirkung auf zelluläre Vorgänge sowohl bei der Entwicklung neuer Therapeutika als auch in der Diagnostik eine entscheidende Rolle spielen werden.

1.5 Zirkulierende miRNAs

Im Jahr 2008 wurde erstmals von zellfreien miRNAs in Blutplasma und -serum berichtet (Chim *et al.* 2008). Dabei wurde nicht nur die generelle Anwesenheit zirkulierender miRNAs in Blutproben nachgewiesen, sondern es wurden auch Abweichungen in der Zusammensetzung und Konzentration der detektierten Nukleinsäuren zwischen Gesunden und Krebspatienten festgestellt (Lawrie *et al.* 2008, Mitchell *et al.* 2008). Weitere Untersuchungen zeigten, dass die zellfreien miRNAs nicht nur von Blutzellen, sondern auch aus anderen Geweben, die eventuell krankhaft verändert sind, stammen können (Chen *et al.* 2008). Im Gegensatz zu zirkulierender rRNA und mRNA, die nur in fragmentierter Form vorliegen, bleiben zellfreie miRNAs im Blutkreislauf erhalten und zeigen eine hohe Stabilität in der

entnommenen Probe. Es konnte gezeigt werden, dass miRNAs aus Serum nicht nur längeren Lagerzeiten, mehreren Einfrier-/Auftauzyklen sowie hohen und niedrigen pH-Werten standhalten, sondern auch eine beachtliche Resistenz gegen den Abbau durch RNasen aufweisen (Chen *et al.* 2008). Daher sind sie besonders gut als Biomarker geeignet. Als Gründe für die hohe Stabilität zirkulierender miRNAs wurden die Verpackung der Nukleinsäuren in Exosomen oder Mikrovesikeln sowie die Assoziation mit schützenden Proteinen wie Argonaute-2 vorgeschlagen (Hunter *et al.* 2008, Arroyo *et al.* 2011). Synthetische - und daher „nackte“ - miRNA, die zu Plasmaproben gegeben wurde, zeigte nämlich einen schnellen Abbau, bedingt durch die Vielzahl im Plasma enthaltener Nukleasen (Mitchell *et al.* 2008).

Diese Erkenntnisse über in Blutproben enthaltene miRNAs entfachten vor allem im Hinblick auf die minimal-invasive Diagnostik große Erwartungen und führten daher zu einer Welle von Untersuchungen, die neben Tumorerkrankungen auch eine Vielzahl weiterer Krankheitsbilder mit Veränderungen im Profil zirkulierender miRNAs in Verbindung bringen. Dazu zählen unter anderem neuronale Erkrankungen, Lungen- und Leberpathologien, Sepsis, Erkrankungen des Immunsystems wie Rheumatoide Arthritis oder verschiedene Formen kardiovaskulärer Erkrankungen (De Guire *et al.* 2013, Sheinerman and Umansky 2013, Salehi *et al.* 2015, Schulte and Zeller 2015). Dabei wurden nicht nur Studien mit miRNA aus Plasma oder Serum durchgeführt, sondern auch lysiertes Vollblut als Probenmaterial verwendet (Cox *et al.* 2010, Hausler *et al.* 2010, Meder *et al.* 2011).

Während bereits erste miRNA-basierte diagnostische Tests zur Untersuchung von Tumor-Gewebeproben verfügbar sind, die beispielsweise die Zuordnung von Metastasen zum primären Tumor ermöglichen oder den Subtyp von Lungen- oder Leberkarzinomen klassifizieren (Gilad *et al.* 2012, Meiri *et al.* 2012, Spector *et al.* 2013), beschäftigen sich Wissenschaftler bei der Entwicklung minimalinvasiver diagnostischer Tests auf der Basis von zirkulierenden miRNAs aktuell noch mit Problemen bei der Reproduzierbarkeit und Validierung von Studienergebnissen sowie der Spezifität dysregulierter miRNAs für bestimmte Krankheitsbilder (Witwer 2015). Zur Verbesserung der spezifischen Aussagekraft dysregulierter miRNAs wird inzwischen meist eine gleichzeitige Überprüfung mehrerer Marker in Form eines miRNA-Panels durchgeführt (Leidinger *et al.* 2013, Wang *et al.* 2015). Problematisch dabei scheinen die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit einzelner Studien zu

sein, was wohl hauptsächlich durch die Wahl des verwendeten Detektionsverfahrens und die präanalytische Handhabung der Proben bedingt ist (Tiberio *et al.* 2015).

Wenn es gelingt, diese Einschränkung durch die Entwicklung geeigneter Standards für die Validierung von Studien und den Einsatz im klinischen Umfeld zu überwinden, ist es sehr wahrscheinlich, dass zirkulierende miRNAs bald eine breite klinische Anwendung als vielseitige Biomarker für die minimalinvasive Diagnose, Prognose und Therapie verschiedenster Krankheiten finden.

1.6 Point-of-Care Diagnostik

Bei der sogenannten *Point-of-Care-Diagnostik* (POC-Diagnostik) werden entnommene Proben direkt am Ort der Entnahme untersucht, ohne zuvor an ein Labor mit spezieller Ausstattung und entsprechend geschultem Personal weitergegeben zu werden. Dazu wird ein robustes, eventuell sogar transportables System benötigt, das von Ärzten oder Pflegepersonal problemlos bedient werden kann und in möglichst kurzer Zeit hochwertige Ergebnisse liefert. Ein solches Detektionsverfahren bietet eine Reihe von Vorteilen. Zunächst werden die in Abschnitt 1.5 angesprochenen Probleme bei der präanalytischen Handhabung und Lagerung entnommener biologischer Proben, die letztlich zu nicht reproduzierbaren Messresultaten bei der Analyse potenzieller miRNA-Biomarker führen können, umgangen. Weiterhin wird die Durchführung von Routineuntersuchungen von miRNA-Werten zur Früherkennung schwerer Erkrankungen im asymptotischen Stadium erleichtert, indem ein entsprechender Test mit wenig Aufwand direkt in der Arztpraxis oder sogar bei einem Hausbesuch durchgeführt werden kann (Hausler *et al.* 2010). Während einer laufenden Therapie könnte außerdem eine Erfolgskontrolle auf der Basis zirkulierender miRNAs direkt vom behandelnden Arzt bei der Nachuntersuchung durchgeführt werden. Noch wichtiger ist die POC-Diagnostik jedoch in medizinischen Notfallsituationen, die eine schnelle Generierung aussagekräftiger Testergebnisse erfordern, wie bei Sepsis oder einem akuten Myokardinfarkt (AMI). Gerade im Zusammenhang mit Herz-Kreislaufkrankungen wurden bereits zahlreiche miRNA-Kandidaten für eine potenzielle Anwendung als Biomarker identifiziert (Meder *et al.* 2011, Li *et al.* 2013, Vogel *et al.* 2013b).

1.7 Detektion von miRNAs

Um zirkulierende miRNAs nicht nur im Forschungslabor, sondern auch in der medizinischen Routineanwendung auf breiter Basis einsetzen zu können, müssen in erster Linie geeignete, robuste Messverfahren etabliert werden. Aktuelle Detektionstechnologien werden nicht allen wichtigen Kriterien für den klinischen Einsatz gerecht. Etablierte Methoden, die für die Quantifizierung relevanter miRNA-Kandidaten in Frage kommen, wie Next-Generation Sequencing, quantitative Real-Time PCR oder Microarray-Systeme, sind zeit- oder arbeitsaufwändig, benötigen eine Amplifikation des Probenmaterials oder sind zu teuer für eine breite Anwendung im Gesundheitswesen (de Planell-Saguer and Rodicio 2011)

1.7.1 Elektrochemisches Detektionsverfahren

Elektrochemische Detektionsansätze versprechen eine gute Basis für die patientennahe miRNA-Diagnostik, da sie eine robuste, kosteneffiziente und kompakte Signalerfassung als Teil eines integrierten medizinischen Geräts ermöglichen (Chin *et al.* 2012). Als Grundprinzip dient bei diesen Biosensoren die Veränderung einer messbaren elektrischen Größe in Abhängigkeit von der Anwesenheit des zu detektierenden Ziel-Moleküls. Dabei können verschiedene elektrochemische Reaktionen verwendet werden, um ein elektrisches Signal zu erzeugen (Drummond *et al.* 2003). Dazu zählen beispielsweise die direkte Reduktion und Oxidation von DNA-Molekülen an den Sensorelektroden (Singhal and Kuhr 1997) oder die guaninvermittelte Reduktion eines freien Vermittlungsmoleküls, das durch anschließende Oxidation an der Messelektrode ein elektrisches Signal erzeugt (Yang and Thorp 2001). Bei einer anderen Methode wird durch die spezifische Bindung des Zielmoleküls auf der Oberfläche die Leitfähigkeit eines Halbleiters verändert (Ramnani *et al.* 2013).

Die meisten Nukleinsäuredetektionsverfahren arbeiten jedoch mit Reporterenzymen zur elektrochemischen Erfassung von Hybridisierungsereignissen (Elsholz *et al.* 2006, Johnson and Mutharasan 2014). Dabei wird die spezifische Bindung eines Reporterenzym an den Sensor durch die Ziel-Nukleinsäure vermittelt. Zur Generierung elektrischer Signale wird die Umwandlung eines Substrats in ein elektroaktives Produkt durch das Enzym katalysiert.

1.7.2 Der Biosensor: Siemens CMOS-Technologie

In dieser Arbeit wurde ein von Siemens Corporate Technology (CT) durch Forschung etablierter CMOS-Chip als Biosensor verwendet. Bei diesem Chip sind 128 individuell ansteuerbare Gold-Elektrodenpaare in Form eines Sensorarrays auf kleinster Fläche (4 mm x 2 mm) angeordnet (Abbildung 4A). Daher eignet sich die Technologie hervorragend für den Einsatz im POC-Bereich und ermöglicht eine kompakte, simultane Analyse einer Vielzahl von unterschiedlichen Biomarkern in derselben Probe (Multiplex). Zur Durchführung biologischer Assays mit dem CMOS-Biosensor stand neben verschiedenen technischen Aufbauten aus den jeweils notwendigen Einzelkomponenten auch ein Prototyp eines voll integrierten und programmierbaren Analysegeräts zur Verfügung, das von Siemens CT für den portablen und voll automatisierten Einsatz entwickelt wurde.

1.7.3 Biochemische Funktionalisierung der Sensorpositionen

Die Spezifität von Biosensoren für das gewünschte Zielmolekül wird durch die Immobilisierung eines selektiven Rezeptors innerhalb eines definierten Bereichs, der Sensorposition, auf der Sensoroberfläche erzielt. Auf dem in dieser Arbeit verwendeten Biochip könnte jede der 128 Positionen einen anderen Rezeptor erhalten, wodurch 128 verschiedene Zielmoleküle während eines Detektionslaufs analysiert werden könnten. Bei den meisten hybridisierungsbasierten Methoden zur Analyse von Nukleinsäuren ist das verwendete Rezeptormolekül ebenfalls eine Nukleinsäurekomponente, deren Sequenz die Zuordnung des Zielmoleküls zur jeweiligen Sensorposition entweder direkt oder indirekt festlegt. Das heißt, dass mindestens ein Teil des immobilisierten Nukleinsäurerezeptors – in dieser Arbeit auch Fänger genannt – mit der Ziel-Nukleinsäure (direkt) oder mit weiteren Assay-Komponenten, die ihrerseits die Ziel-Nukleinsäure binden, (indirekt) hybridisieren kann.

Die Beschaffenheit des verwendeten Biosensors bestimmt dabei die Möglichkeiten, die für die Immobilisierung der Fängermoleküle zur Verfügung stehen. Üblicherweise werden Interaktionen zwischen dem Oberflächenmaterial und einer funktionellen Gruppe am Fängermolekül, wie beispielsweise einer Amino- oder Carboxygruppe, ausgenutzt (Johnson and Mutharasan 2014). Da die Elektroden des in dieser Arbeit

verwendeten CMOS-Chips aus Gold bestehen, wurden thiolmodifizierte Oligonukleotide für die Immobilisierung verwendet. Die Wechselwirkungen zwischen Gold und Schwefel führen dabei zu einer stabilen Kopplung der Fänger-Oligonukleotide mit der Goldoberfläche und zur Ausbildung einer geordneten Monolage, die man als SAM (*self-assembled monolayer*) bezeichnet (Levicky *et al.* 1998). Die gezielte Funktionalisierung der einzelnen Sensorpositionen des Arrays wird durch eine definierte Benetzung der Elektroden mit den gelösten Fänger-Oligonukleotiden erreicht, wodurch eine gleichmäßige Adsorption auf der Oberfläche der Gold-Elektroden ermöglicht wird (Herne and Tarlov 1997). Dabei können sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige Oligonukleotide eingesetzt werden. Die Hybridisierungseigenschaften der immobilisierten Fänger-Oligonukleotide hängen hauptsächlich von deren Anordnungsdichte in der entstehenden SAM ab, die durch Variieren der Immobilisierungsbedingungen beeinflusst werden kann (Peterson *et al.* 2001).

1.7.4 Signalerzeugung/-transduktion

Zur spezifischen Erzeugung elektrochemischer Signale wurde als Reporterenzym in dieser Arbeit entweder Alkalische Phosphatase oder Esterase 2 (EST2) eingesetzt. Beide Enzyme können aus einem spezifischen Substrat das elektroaktive Produkt para-Aminophenol (pAP) generieren. Bei Verwendung von Alkalischer Phosphatase wurde bereits in früheren Studien para-Aminophenylphosphat (pAPP), bei Esterase 2 para-Aminophenylbutyrat (pAPB) als Substrat eingesetzt (Elsholz *et al.* 2006, Wang *et al.* 2007). Durch Redox-Cycling an den beiden Interdigitalelektroden der Sensorposition wird bei Anlegen eines Potentials amperometrisch ein Signal erzeugt, indem das Enzymprodukt pAP an der Anode zu Quinonimin oxidiert wird, welches an der Kathode wiederum zu pAP reduziert wird (Abbildung 2) (Nebling *et al.* 2004). Die an der jeweiligen Sensorposition gemessene Stromstärke I verändert sich dabei proportional zur Konzentration des Analyten. Die Geschwindigkeit, mit der das Substrat am Sensor zum elektroaktiven Produkt umgesetzt wird, ist bei Substratsättigung abhängig von der Menge des gebundenen Reporterenzym und kann als Steigung der Stromstärke (ΔI) erfasst werden.

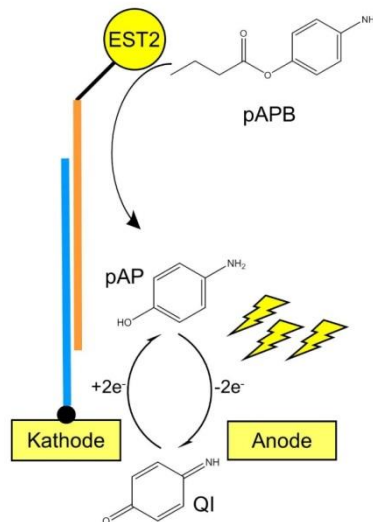


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Prinzips der Signalerzeugung bei Verwendung von Esterase 2 als Reporterenzym. Das Substrat pAPB wird von der Esterase 2 gespalten. Dabei entsteht das elektroaktive Produkt pAP, das an der Gold-Anode zu Quinonimin oxidiert und anschließend an der Gold-Kathode wieder reduziert wird und so weiter. Durch dieses Redox-Cycling wird an den Elektroden ein Stromfluss generiert, der abhängig von der vorhandenen Menge an pAP ist. Die stetige Umsetzung des im Überschuss vorhandenen Substrats erzeugt daher eine Steigung der Stromstärke, die proportional zur Menge des gebundenen Reporterenzym ist. EST2: Esterase 2; pAPB: para-Aminophenylbutyrat; pAP: para-Aminophenol; QI: Quinonimin.

Um einen diffusionsbedingten Verlust des Redox-Analyten und ein Übersprechen des Signals auf angrenzende Sensorpositionen zu verhindern, können die Reaktionsräume über den jeweiligen Sensorpositionen eines Arrays durch Aufdrücken einer Begrenzungsschicht während des Messvorgangs separiert werden (Gumbrecht *et al.* 2010, Gumbrecht *et al.* 2014). Dieses als LockSpot bezeichnete Verfahren führt zur Ausbildung geschlossener Reaktionskavitäten über den Messelektroden. Durch eine Minimierung des Volumens der Kavitäten wird dabei zusätzlich die Konzentration des Produkts der enzymatischen Reaktion erhöht, was zu einer Amplifikation des gemessenen Signals führt (Abbildung 3). Dieses Verfahren wurde in dieser Arbeit realisiert, indem eine spezielle Dichtung während der Messung auf die Chipoberfläche gedrückt wurde (siehe Abschnitt 3.3.4).

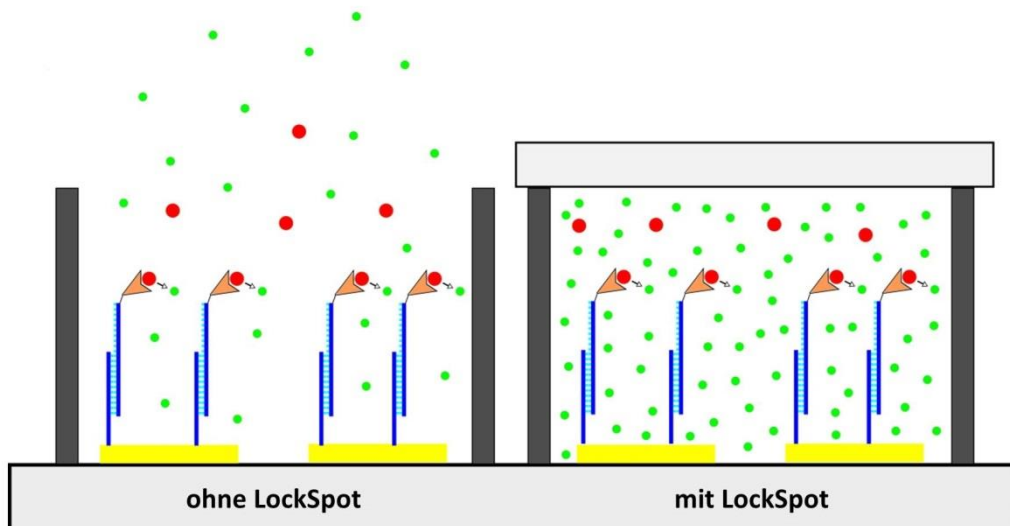


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Prinzips der LockSpot-Messung. Ohne LockSpot kann das bei der Umsetzung des Substrats (rot) durch das gebundene Reporterenzym (orange) entstehende elektroaktive Produkt pAP (grün) während der Messung aus der nur seitlich begrenzten Sensorposition durch Diffusion nach oben entweichen. Beim LockSpot wird die Substratlösung durch eine Begrenzungsschicht, die von oben auf das Array gedrückt wird, in einem kleinen Volumen vollständig über den Elektroden (gelb) eingeschlossen. Dies führt zu einer stärkeren Akkumulation des Enzymprodukts und einer Abschirmung der einzelnen Sensorpositionen während der Messung.

1.8 Überblick

Im folgenden Kapitel werden zunächst die in dieser Arbeit verwendeten Materialien dargelegt. Dazu gehörten neben kommerziell erhältlichen Produkten auch in der Siemens-Arbeitsgruppe entwickelte und erprobte Gerätschaften, Komponenten und Software.

Das Kapitel 3 führt neben den zur Vorbereitung und Durchführung der Experimente verwendeten molekularbiologischen Methoden und theoretischen Kalkulationen auch durch sämtliche Schritte, die der Vorbereitung der eigentlichen Detektionsassays mit dem CMOS-Chip dienen. Anschließend werden die einzelnen Messaufbauten und die zugehörigen Auswertungsverfahren vorgestellt, bevor im nächsten Abschnitt die genaue Durchführung der im späteren Ergebnisteil angeführten Detektionsexperimente ausführlich dokumentiert wird. Das Kapitel schließt mit der Vorstellung der zusätzlichen Methoden, die bei der Untersuchung biologischer Proben zum Einsatz kamen.

In Kapitel 4 werden die Ergebnisse dieser Arbeit in sinngemäßer Abfolge dargelegt. Dazu gehören die Überprüfung der grundlegenden Funktionen des Messaufbaus, die Ausarbeitung und Exploration verschiedener hybridisierungs- und ligationsbasierter

Methoden zur Detektion von miRNA und die Erprobung des vielversprechendsten Konzeptes in der praktischen Anwendung bei der Untersuchung von humanem Vollblut.

Im Diskusstionsteil (Kapitel 5) werden die Ergebnisse der Arbeit noch einmal erörtert, in wissenschaftlichen Kontext gesetzt und interpretiert. Ein abschließender Ausblick bewertet die gewonnenen Erkenntnisse und gibt Anstöße für weitere Forschungsaufgaben.

Zusammenfassungen auf Deutsch und Englisch (Kapitel 6), ein Literaturverzeichnis (Kapitel 7) und ergänzende Informationen im Anhang (Kapitel 8) komplementieren die vorliegende Ausarbeitung.

2. Materialien

2.1 Messtechnik

2.1.1 CMOS-Chip

Das CMOS-Chipmodul besteht aus mehreren funktionellen Elementen (Abbildung 4A). Das Array auf der Siliziumnitrid-Oberfläche ist aus 128 Kompartimenten, den sogenannten Sensorpositionen, mit je einem Gold-Interdigitalelektrodenpaar aufgebaut. Jedes Kompartiment ist durch einen Ring aus dem Polymer Polybenzoxazol (Sumitomo, Japan) begrenzt, wodurch eine sensorpositionsspezifische biochemische Funktionalisierung ermöglicht wird (Abbildung 4B). An den Interdigitalelektroden findet das Redox-Cycling in der flüssigen Phase auf der Chipoberfläche durch das Aufprägen einer entgegengesetzten Polarisierung auf die sogenannte Generator- bzw. Kollektor-Elektrode statt. Gleichzeitig wird der Stromfluss zwischen der positiv und negativ polarisierten Elektrode gemessen. Dieser Stromfluss dient als indirektes Maß für die Menge an Analyt in der Probe. Neben der Eigenschaft, elektrochemische Reaktionen an der Oberfläche durchführen zu können, bietet das gewählte Elektrodenmaterial Gold die Möglichkeit, biochemische Moleküle über Gold-Thiol-Bindungen gezielt zu immobilisieren (siehe Abschnitt 3.3.1).

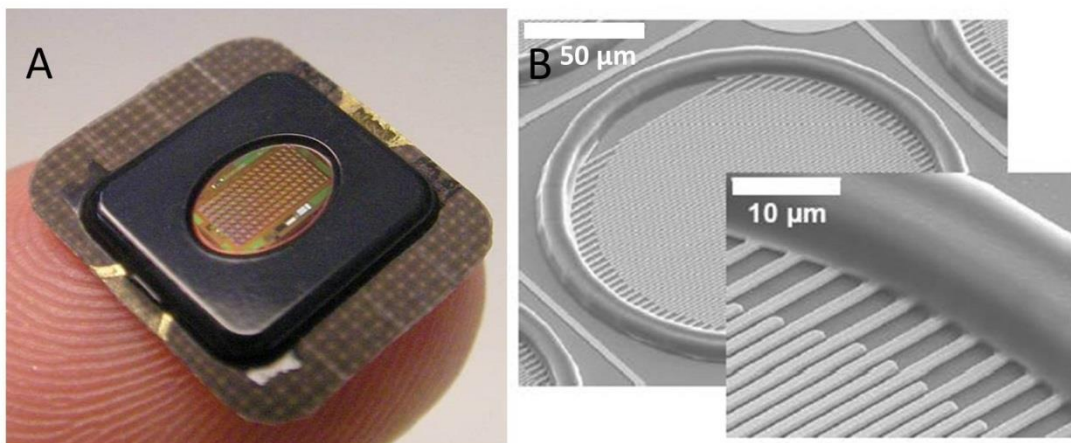


Abbildung 4: Das Chipmodul und die Sensorpositionen. A: Chipmodul im Größenvergleich. Die sensorische Oberfläche zeigt nach oben. Darunter ist das Smartcard-Modul mit den Kontaktpads (nicht zu sehen, da auf der Rückseite), das den elektrischen Kontakt zum Reader herstellt, zu erkennen. Die elliptische, von der schwarzen Vergussmasse umgebene Vertiefung in der Mitte bildet die Chipkavität mit den Sensorpositionen. B: Einzelne Sensorposition in starker Vergrößerung. Der Polymerring umschließt das interdigitale Gold-Elektrodenpaar, dessen Feinstruktur in der Detailansicht zu erkennen ist.

Die Ansteuerung der Sensorpositionen sowie die Analog/Digital-Wandlung der erfassten Signale werden in der zweiten funktionellen Chipebene, der CMOS-

Schaltung, realisiert. Über entsprechende integrierte Schaltungen ist der Datenfluss von den einzelnen Sensorpositionen zum Steuergerät und umgekehrt realisiert. So können beispielsweise die Messdaten aller 128 Sensorpositionen gleichzeitig verarbeitet und, wegen der implementierten Multiplexfähigkeit, über einen einzigen Chipkontakt, den Datenausgang, ausgegeben werden. Insgesamt werden für die vollständige Sensorfunktionalität fünf elektrische Anschlüsse benötigt: Neben dem bereits erwähnten digitalen Datenausgang gehören dazu der Dateneingang, der Signale an den Chip überträgt, ein *clock*-Anschluss für die Taktung und zwei Kontakte für die Versorgungsspannung. Ein zusätzlicher Anschluss bietet die Option, Temperaturdaten von der Chipoberfläche abzufragen. Um eine massenfertigungstaugliche und preiswerte halbleitertechnologiekonforme Standard-Lösung bereits in der Entwicklung zu implementieren, ist der CMOS-Chip auf einem Smartcard-Tape montiert, über das die Kontaktierung mit dem Auslesegerät (Reader) erfolgt. (siehe auch Abbildung 11).

Da mit dem CMOS-Chip Analysen in wässriger Lösung durchgeführt werden, muss neben der sensorischen und elektrischen Funktionalität auch ein fluidisches Interface realisiert werden. Die Ausbildung einer entsprechenden Kavität wird durch das Aufbringen einer Vergussmasse erreicht. Diese schützt zum einen die Oberfläche des CMOS-Chips und die Verdrahtung mit dem Smartcard-Interface vor mechanischen Schäden und direktem Kontakt mit der wässrigen Lösung. Zum anderen definiert sie den Bereich, der während der Messungen mit der Probe und den verschiedenen Pufferlösungen und Reagenzien, die für die Durchführung des Assays notwendig sind, in Kontakt kommt. Dieser für Flüssigkeiten zugängliche Raum wird als Chipkavität bezeichnet und dient als Reaktionskammer, in der Moleküle aus der flüssigen Phase mit den Elektroden und den daran gekoppelten, stationären Komponenten interagieren. Je nach Vergussmasstyp fasste die Kavität ein Volumen von 3,8 - 4,5 μl .

2.1.2 Gerätschaften zur Durchführung der Assays

Für die Durchführung der molekularbiologischen Assays und der elektrochemischen Messungen wurden unterschiedliche Aufbauten verwendet, die von einem modularen Aufbau, bestehend aus den verschiedenen Einzelkomponenten, bis zum

vollintegrierten Messgerät reichten (siehe Abschnitt 3.3). Die grundlegenden Prinzipien dieser Aufbauten werden im Folgenden kurz erläutert.

Die Einbindung des CMOS-Chips in das Messsystem erfolgte durch eine Klemm-Montage des Moduls in einer speziellen Vorrichtung, die einerseits den Anschluss der Kontakte an die Elektronik des Gerätes ermöglichte, andererseits mit Hilfe einer Dichtung eine Reaktionskammer mit Zu- und Ablauf für Flüssigkeiten auf dem Sensorarray ausbildete (siehe z.B. Abbildung 6). Ein zugehöriges Peltier-Element ermöglichte außerdem eine Thermostatisierung des Chipmoduls und damit der Reaktionskammer. Die Geräteelektronik war mit einem Computer verbunden, dessen Software dem Benutzer die Ansteuerung des Chips und das Auslesen der Messdaten ermöglichte. Die Zuführung von Flüssigkeiten erfolgte entweder mit einer Pipette oder durch die Verwendung einer Peristaltikpumpe.

Bei vielen Teilen der Aufbauten (inklusive Software) handelte es sich nicht um kommerziell erhältliche Produkte, sondern um spezielle Anfertigungen und Technologiemuster, die von der Siemens AG bereitgestellt wurden. Die Einzelheiten werden in Abschnitt 3.3 (CMOS-Chip Messungen) beschrieben.

2.1.3 Dichtungen und Messkartuschen

Die verwendeten Messkartuschen (siehe z.B. Abbildung 11) wurden aus dem Polycarbonat Makrolon® 2458 (Bayer MaterialScience AG, Leverkusen) hergestellt, entweder durch Einfräsen der jeweiligen Strukturen, oder im Spritzgussverfahren (Buck Spritzgußteile Formenbau GmbH, Flachslanden).

Die Dichtungen zum Verschluss der Reaktionskammer wurden entweder aus einem thermoplastischen Elastomer (Santoprene; ExxonMobil, Hamburg), Silikonkautschuk oder Polydimethylsiloxan (PDMS) hergestellt (siehe Abschnitt 3.3.2).

2.2 Puffer und Lösungen

Carosche Säure	2 Teile Wasserstoffperoxid (35%)
(Peroxomonoschwefelsäure)	3 Teile Schwefelsäure (konzentriert)

Materialien

Hybridisierungspuffer S	50 mM Tris-HCl pH 7,5 300 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ 5 mM EDTA 0,025% (v/v) Tween 20
Hybridisierungspuffer Y	50 mM Tris-HCl pH 7,6 300 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ 0,02% (v/v) Tween 20
Niedrigsalzpuffer	2 mM Tris-HCl pH 7,6 2 mM NaCl
pAPB-Substratlösung	20 mM Tris-HCl pH 7,6 20 mM NaCl 1 mM pAPB
pAPP-Substratlösung	50 mM AMP-HCl pH 10,2 2 mM pAPP 20 mM NaCl 0,67 mM MgCl ₂ 0,1% (v/v) Tween 20
Quick Ligation Buffer	66 mM Tris-HCl pH 7,6 50 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ 1 mM DTT 1 mM ATP 7,5% (w/v) PEG 6000
SDS-Niedrigsalzpuffer	2 mM Tris-HCl pH 7,6 2 mM NaCl 0,01% (v/v) Tween 20 0,09% SDS

Materialien

Spotting-Puffer	3x SSC 1,5 M Betain 100 µM Tris(2-chlorethyl)phosphat (TCEP)
T4 DNA Ligase Puffer (Thermo Scientific, Schwerte)	40 mM Tris-HCl pH 7,8 10 mM MgCl ₂ 10 mM DTT 0,5 mM ATP
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA
UltraPure SSC Puffer, 20x (Invitrogen/Life Technologies, Darmstadt)	0,3 M Natriumcitrat pH 7,0 3 M NaCl
Waschpuffer 1	20 mM Tris-HCl pH 7,6 20 mM NaCl
Waschpuffer 2	50 mM Tris-HCl pH 8,0 150 mM NaCl

2.3 Enzyme, Kits und Standards

Esterase 2-Mutante (EST2E118C)	AG Sprinzi, Universität Bayreuth
miRNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
PAXgene Blood RNA-Röhrchen	PreAnalytiX, Hombrechtikon, Schweiz
RNase Inhibitor (40 U/µl)	Peqlab/VWR International, Erlangen
Streptavidin-AP-Konjugat (1000 U/ml)	Roche Diagnostics, Mannheim
T4 DNA Ligase (5 U/µl)	Thermo Scientific, Schwerte

Materialien

T4 Polynukleotidkinase (10000 U/ml)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
T4 RNA Ligase 2 (10000 U/ml)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
TaqMan MicroRNA Assays (Inventoried)	Life Technologies, Darmstadt
TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit	Life Technologies, Darmstadt
TaqMan Universal PCR Master Mix II, With UNG	Life Technologies, Darmstadt
The Blocking Solution	Candor Bioscience, Wangen
VERSANT HBV bDNA 3.0 Assay	Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, USA

2.4 Chemikalien

Wenn nicht anders aufgeführt, wurden Chemikalien in Analysequalität oder in Qualität für die Molekularbiologie von Merck Millipore (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (München) und VWR International (Darmstadt) bezogen. Das Enzymsubstrat pAPB wurde vom Lehrstuhl für Biochemie der Universität Bayreuth bereitgestellt (Wang *et al.* 2007).

2.5 Einmal- und Plastikwaren

Reaktionsröhrchen, -gefäße und anderes Verbrauchsmaterial wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Greiner (Frickhausen) und Corning (Corning, USA) verwendet.

2.6 Laborgeräte

Feinwaage	Denver Instrument Company (Sartorius, Göttingen)
Peristaltikpumpe	Watson-Marlow 202 Kassettenpumpe (Watson-Marlow, Rommerskirchen/Anstel)
Plasma-Anlage	Femto PCCE (Diener Electronic, Ebhausen)
qPCR System	Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies, Böblingen)
Spectrophotometer	Nanodrop-1000 (Peqlab, Erlangen)
Spotter	SciFlexArrayer S5 (Scienion, Berlin)
Sterilwerkbank	Ultraviolet Sterilizing PCR Workstation (Peqlab, Erlangen)
ThermoCycler	MJ Mini (Bio-Rad, München)
Ultrareinstwasser-Reinigungsanlage	Synergy UV-R (Merck Millipore, Darmstadt)
Ultraschallbad	Bransonic 221 (Branson, Dietzenbach)
Vakuum-Pumpe	Laboport (KNF, Freiburg)
Waage	Explorer EX6202 (OHAUS, Nänikon, Schweiz)
Zentrifugen	MiniSpin (Eppendorf, Hamburg) Mikrozentrifuge 5415R (Eppendorf, Hamburg) Rotations-Vakuum-Konzentrator RVC 2-25 (Christ, Osterode am Harz)

2.7 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten synthetischen Oligonukleotide wurden von den Firmen Biomers (Ulm) und Metabion (Martinsried) bezogen. Die Qualität der hergestellten Nukleinsäuren wurde firmenseitig durch HPLC und MALDI-TOF überprüft. Die Sequenzdaten können dem Anhang (Abschnitt 8.2) entnommen werden. Von den im VERSANT HBV bDNA 3.0 Assay enthaltenen Nukleinsäure-Komponenten wurden konzentrierte Stocklösungen direkt beim Hersteller angefordert.

2.8 Software

Die Steuerung der Messapparaturen erfolgte mit Hilfe verschiedener in einer LabVIEW-Umgebung (National Instruments Germany, München) entwickelter Computerprogramme, die von Siemens CT zur Verfügung gestellt wurden. Für die Analyse der ermittelten Rohdaten wurden ebenfalls bereitgestellte LabVIEW-Programme im Rahmen dieser Arbeit modifiziert und erweitert.

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

Alle Versuche und Verfahren wurden in DNase- und RNase-freier Umgebung durchgeführt. Für die Herstellung von Lösungen wurde Reinstwasser verwendet. Bei der Verdünnung von Ribonukleinsäuren wurde außerdem generell 0,1% RNase-Inhibitor zugesetzt. DNA wurde in TE-Puffer gelöst und verdünnt.

3.1.1 Phosphorylierung von 5'OH-Nukleinsäuren

Für die Ligation von Nukleinsäuren mittels T4 DNA Ligase muss der zu ligierende 5'-Terminus eine Phosphat-Gruppe aufweisen. Um Oligonukleotide mit 5'-OH-Gruppen zu phosphorylieren, wurde die T4 Polynukleotidkinase verwendet. Der 10 µl Ansatz beinhaltete 1x T4 DNA Ligase Puffer, 5 U T4 Polynukleotidkinase und 1,7 µM des zu phosphorylierenden Oligonukleotids. Der Phosphorylierungsmix wurde im Thermocycler für 1 h bei 37°C inkubiert, für 20 min bei 75°C inaktiviert und danach auf 4°C abgekühlt.

3.1.2 *Annealing* komplementärer Nukleinsäure-Einzelstränge

Zur Herstellung von Nukleinsäure-Doppelsträngen aus komplementären einzelsträngigen Oligonukleotiden wurde ein sogenanntes *Annealing* im Thermocycler durchgeführt. Dazu wurden die zu hybridisierenden Einzelstränge entweder in 10 µl 1x Hybridisierungspuffer Y oder in 10 µl 1x T4 DNA Ligase Puffer angesetzt. Im Thermocycler wurde die Lösung anschließend für 2 min auf 60°C erhitzt, langsam in 5°C-Schritten zu je zwei Minuten auf 30°C abgekühlt und anschließend bei 4°C gelagert. Während des Abkühlvorgangs hybridisieren die komplementären Einzelstränge bei der jeweils dafür notwendigen Temperatur und liegen schließlich als Doppelstränge in der fertigen Lösung vor.

3.1.3 Synthese von Esterase 2-Oligonukleotid-Konjugaten

Alle EST2-Oligonukleotid-Konjugate wurden nach einem modifizierten Protokoll von Wang *et al.* hergestellt (Wang *et al.* 2007). Dabei wurde das Oligonukleotid über

einen bifunktionellen Linker (Sulfo-SMCC, Sigma-Aldrich) mit der EST2-Mutante EST2E118C kovalent verbunden.

Dazu wurde zunächst die Aminogruppe am zu konjugierenden Ende des Oligonukleotids an Sulfo-SMCC gekoppelt, indem 250 μ M Oligonukleotid und 12,5 mM Sulfo-SMCC in 50 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,9 und 25% Dimethylformamid (DMF) für 2 h in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Anschließend wurden ein Zehntel Volumen 3 M Natriumacetat-Puffer pH 5,2 und das dreifache Volumen Ethanol zum Reaktionsgemisch gegeben, um die Nukleinsäuren zu fällen. Nach Lagerung bei -20°C über Nacht wurde das Präzipitat abzentrifugiert und das Pellet in 0,5 M Natriumacetat-Puffer pH 5,2 mit 150 mM NaCl resuspendiert. Mittels Ionenaustauschchromatographie wurde das Reaktionsprodukt in einer DEAE-Säule (Sephadex A-25) aufgereinigt. Dazu wurde es in der mit 0,5 M Natriumacetat-Puffer pH 5,2, 150 mM NaCl äquilibrierten Säule gebunden, der Überschuss an sulfo-SMCC durch Erhöhung der Salzkonzentration auf 450 mM NaCl entfernt und das aktivierte Oligonukleotid bei einer NaCl-Konzentration von 1 M eluiert. Das gesammelte Eluat wurde mittels Ethanol-Fällung aufkonzentriert (siehe oben) und in 50 mM Natriumphosphat-Puffer pH 6,5 mit 150 mM NaCl resuspendiert.

Die EST2-Mutante EST2E118C besitzt ein für die Konjugation notwendiges Cystein statt Glutaminsäure an Position 118, welches vor der Kopplung reduziert werden muss. Dazu wurde die gewünschte Menge EST2E118C mit der zehnfachen Menge TCEP in 50 mM Natriumphosphat-Puffer pH 6,5 mit 150 mM NaCl für 30 min bei 37°C inkubiert und das gewünschte Produkt anschließend durch eine Gelpermeationschromatographie in einer Biogel P6 Säule (Bio-Rad, München) vom überschüssigen TCEP getrennt. Die Säule war zuvor mit 50 mM Natriumphosphat-Puffer pH 6,5, 150 mM NaCl äquilibriert worden.

Für die Konjugation wurden aktiviertes Oligonukleotid und reduzierte EST2 im Verhältnis 1:2 in 50 mM Natriumphosphat-Puffer pH 6,5, 150 mM NaCl für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die überschüssige Esterase in einer mit Natriumphosphat-Puffer pH 6,5, 150 mM NaCl äquilibrierten DEAE-Säule (Ionenaustauschchromatographie, Sephadex A-25) im Durchbruch verworfen und die enthaltenen Nukleinsäuren bei einer NaCl-Konzentration von 600 mM eluiert und aufgefangen. Die Fraktion wurde durch Ultrafiltration mit einem Amicon Ultra-15 Filter (10 kDa; Merck, Darmstadt) aufkonzentriert. Nicht-konjugiertes Oligonukleotid wurde

mittels FPLC entfernt. Dazu wurde das Konzentrat in 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 ml NaCl, 5 mM EDTA mit einer Superdex-75 Säule in Einzelfractionen aufgetrennt, deren zugehörige zeitliche Abschnitte im Chromatogramm markiert wurden. Die Fraktionen, die dem früheren der beiden im Chromatogramm zu erkennenden Peaks zugeordnet werden konnten, enthielten das Konjugat und wurden per 15%-iger SDS-PAGE (Laemmli 1970) mit anschließender Esterase-Aktivitätsfärbung (Higerd and Spizzen 1973) und Coomassie-Färbung (G-250; unspezifische Proteindarstellung) analysiert. Die Konjugat-Fractionen wurden vereinigt und per Ultrafiltration aufkonzentriert (siehe oben).

Die Konzentration des Konjugats wurde durch einen klassischen Bradford-Test mit BSA als Standard bestimmt (Zor and Selinger 1996) und die Lösung anschließend mit 50% Glycerin und 0,05% Natriumazid bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

3.1.4 Quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Zur Ermittlung von miRNA-Konzentrationen in Gesamt-RNA-Proben unter Verwendung einer etablierten PCR-basierten Methode wurde eine Kombination aus Reverser Transkription mit spezifischen Haarnadelstruktur-Primern (engl. *stem-loop*) und der TaqMan-qPCR-Methode eingesetzt (Chen *et al.* 2005).

Die Versuche wurden mit von Life Technologies bezogenen Kits, Reagenzien und Primern (*TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit; TaqMan Universal PCR Master Mix II, With UNG; Taqman MicroRNA Assays INV 002299, 000480, 000389, 001516, 000419*) nach dem zugehörigen Protokoll für *TaqMan Small RNA Assays* durchgeführt. Dazu wurde zunächst ein 15 µl Ansatz für die Reverse Transkription aus 100 mM dNTPs, 50 U/ml MuL_v-RTase, 20 U/µl RNase-Inhibitor, 3 µl des jeweiligen 5x RT-Primers und 5 µl RNA-Probe im zugehörigen RT-Puffer für 30 min bei 16°C inkubiert. Nach der dabei erfolgten Anlagerung der verwendeten *Stemloop*-Primer an die Ziel-miRNAs wurde die Reverse Transkription für 30 min bei 42°C durchgeführt. Gestoppt wurde die Reaktion durch eine Inaktivierung der Reversen Transkriptase bei 85°C für 5 min. Das Produkt wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Die quantitative Polymerase-Kettenreaktion wurde in einem Stratagene MX-3005p qPCR System durchgeführt. Entsprechend dem Protokoll von Life Technologies

wurden 1,33 µl des Produkts der Reversen Transkription für einen 20 µl Ansatz aus Master Mix und den jeweiligen qPCR-Primern verwendet. Nach einer zweiminütigen Inkubationszeit bei 50°C zur Aktivierung der im Reaktionsansatz enthaltenen Uracil-N-Glycosylase (UNG) und einer Denaturierungsphase von 10 min bei 95°C wurden 40 Thermozyklen, bestehend aus 15 s Denaturierung bei 95°C und 1 min Primeranlagerung/-verlängerung bei 60°C, ausgeführt. Die im Master-Mix enthaltene UNG verhindert bei Verwendung von dUTP statt dTTP die Amplifikation von möglicherweise störenden Kontaminationen durch DNA aus vorherigen Experimenten.

Um die erhaltenen Ergebnisse mit denen aus Messungen mit dem CMOS-Chip vergleichen zu können, wurden für die zu untersuchenden miRNAs Standardkurven unter Verwendung von 1 pM bis 10 nM synthetischer Ziel-Nukleinsäure erstellt. Mit Hilfe einer linearen Trendlinie konnte anschließend die gemessene, ursprünglich in der endogenen Probe enthaltene miRNA-Konzentration ermittelt werden.

3.2 Theoretische Kalkulationen

3.2.1 Berechnung von Schmelztemperaturen

Die Schmelztemperaturen von DNA-Sequenzen wurden mit dem webbasierten Programm OligoAnalyzer 3.1 von Integrated DNA Technologies berechnet (<https://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>). Generell wurden folgende Parameter für die Kalkulationen eingesetzt: *Target Type* DNA, Oligo-Konzentration 0,01 µM, dNTPs-Konzentration 0 mM. Wenn nicht anders angegeben, wurden Ionenkonzentrationen von 100 mM Na⁺ und 10 mM Mg²⁺ gewählt (vgl. Ionenstärke des Quick Ligation Buffer). Der Algorithmus berechnet die Schmelztemperatur nach dem „*nearest-neighbor two-state*“-Modell mit den Parametern von Allawi und SantaLucia für DNA/DNA-Paarungen (Allawi and SantaLucia 1997). Der Einfluss der im Puffer enthaltenen Salzkonzentrationen wird durch Verwendung der Korrekturfunktionen für mono- und divalente Kationen (Na⁺ und Mg²⁺, siehe oben) von Owczarzy et al einbezogen (Owczarzy et al. 2004, Owczarzy et al. 2008). Die so ermittelten Werte dienten als Orientierungshilfe beim Design der Assay-Komponenten.

3.2.2 Analyse von Sekundärstrukturen

Mögliche Sekundärstrukturen wurden mit Hilfe des *RNAfold*-Webserver der Universität Wien prognostiziert, welcher Teil der *Vienna RNA websuite* ist (Gruber *et al.* 2008). Die zugehörigen RNA Parameter können bei Mathews *et al.* nachgeschlagen werden (Mathews *et al.* 2004).

3.3 CMOS-Chip Messungen

3.3.1 Vorbereitung der CMOS-Chips

Für die Funktionalisierung der CMOS-Chips wurde zunächst die Chipmodul-Oberfläche mit den Sensorpositionen mechanisch, physikalisch und chemisch gereinigt. Anschließend wurden die einzelnen Sensorpositionen unter Verwendung eines Spotters (Scienion) mit der jeweiligen Fängerkomponente zur Ausbildung einer funktionellen SAM benetzt. Für den kontrollierten Aufbau einer SAM aus Einzelsträngen mit optimaler Dichte ist es nötig, unspezifisch adsorbierte DNA, die die Hybridisierung mit korrekt angeordneten Strängen behindern könnte, nach der Immobilisierung von der Goldoberfläche zu entfernen. Dies kann laut Literatur beispielsweise durch einen zweiten Immobilisierungsschritt mit einer 1 mM Lösung 6-Mercaptohexanol (MCH) erreicht werden (Herne and Tarlov 1997). Eine solche Behandlung führte bei den in dieser Arbeit verwendeten Sensoren jedoch zu einem nahezu vollständigen Verlust der Redox-Cycling-Fähigkeit, was wohl durch eine zu starke Belegung und eine daraus resultierende elektrische Isolierung der Oberfläche der Gold-Elektroden verursacht wurde (Daten nicht gezeigt). Als Kompromiss wurden daher niedrige Konzentrationen MCH als hybridisierungsinaktiver Verdünner direkt zu den Immobilisierungslösungen mit den einzelsträngigen Nukleinsäuren gegeben (siehe Abschnitt 3.3.1.2). Bei der Immobilisierung von doppelsträngigen Oligonukleotiden war dies nicht notwendig, da die Helix-Strukturen einen größeren Durchmesser besitzen, relativ starr sind und durch die vom DNA-Rückgrat nach außen gerichteten negativ geladenen Zucker-Phosphate eine gleichmäßige Abstoßung untereinander bewirken (Peterson *et al.* 2001, Zhang *et al.* 2002).

Mit Hilfe eines Blockierungsschrittes wurden abschließend freie Bindungsstellen auf der Chipoberfläche abgesättigt, um unspezifischen Wechselwirkungen während des Detektionsassays zu verhindern.

3.3.1.1 Reinigung der Chipoberfläche

Nach dem Fertigungsprozess lagen die CMOS-Chipmodule in zwei Reihen angeordnet auf einem Kontaktband vor. Das Band wurde für die Reinigung und den Immobilisierungsprozess in Blöcke mit je vier (2x2) Modulen geschnitten. Diese wurden zunächst in einem mit Isopropanol gefüllten Becherglas für eine Minute im Ultraschall-Bad vorgereinigt. Anschließend wurden die Chips gründlich mit VE-Wasser gespült, um das Isopropanol vollständig zu entfernen, und in einem Stickstoff-Luftstrom getrocknet. Zur ersten Grobreinigung wurde die Chipoberfläche mit je 10 µl frisch angesetzter Caroscher Säure bedeckt und nach 30 s Inkubation bei Raumtemperatur gründlich mit VE-Wasser gespült. Nach vollständiger Trocknung der Chip-Blöcke im Stickstoff-Luftstrom wurden diese in der Plasma-Reinigungsanlage in zwei Schritten behandelt. Dazu wurden die Module zunächst bei einem Niederdruck von 0,65 mbar einem 100%igen Sauerstoff-Plasma bei 300 W ausgesetzt. Beim anschließenden zweiten Reinigungsschritt wurde das Sauerstoff-Plasma durch ein 100%iges Argon-Plasma ersetzt. Bei diesem Verfahren wird die Chipoberfläche durch das Plasma nicht nur physikalisch gereinigt, sondern eventuell vorhandene Verschmutzungen chemisch umgesetzt und in die Gasphase abgesaugt. Nach der Plasma-Behandlung ist die Oberfläche der Module stark hydrophil und daher mit wässrigen Lösungen gut benetzbar. Zur Entfernung noch eventuell verbliebener Rückstände wurde anschließend eine weitere Reinigung mit je 10 µl frisch angesetzter Caroscher Säure durchgeführt. Nach 30 s Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Chips nochmals gründlich mit VE-Wasser abgespült und bis zur weiteren Verarbeitung unter VE-Wasser gelagert, um Reaktionen mit Bestandteilen der Raumluft zu vermeiden. Erst unmittelbar vor Beginn der Fänger-Immobilisierung wurden die Chip-Blöcke im Stickstoff-Luftstrom getrocknet.

3.3.1.2 Vorbereitung der Immobilisierungslösungen

Wenn nicht anders angegeben wurden für die Immobilisierung von Einzelsträngen 10 µM des thiolmodifizierten Fänger-Oligonukleotids in Spotting-Puffer eingesetzt. Der 20 µl Ansatz wurde zur Reduktion der Thiol-Gruppen durch TCEP für mindestens 30 min bei 4°C inkubiert. Kurz vor der Immobilisierung auf der Chipoberfläche wurden optional 50-75 µM 6-Mercaptohexanol (MCH) als Thiol-Spacer zur Lösung hinzugefügt.

Zu immobilisierende Doppelstränge wurden zunächst aus je 20 μM spezifischem Fängerstrang und passendem, thiolmodifiziertem Immobilisierungsstrang in 10 μl Hybridisierungspuffer Y hybridisiert (siehe Abschnitt 3.1.2). Nach Zugabe von 10 μl 2x Spotting-Puffer wurde die Lösung vor der Immobilisierung für mindestens 30 min zur Reduktion der Thiol-Gruppen bei 4°C inkubiert.

Für Kontrollspots ohne immobilisierte Fänger-Oligonukleotide (SP) wurde 1x Spotting-Puffer mit der den anderen Lösungen entsprechenden Menge MCH (0-75 μM) vorbereitet (Ausnahme: 3-Komponenten-Methode; Fänger-Lösungen 50 μM MCH, SP-Lösung ohne MCH).

3.3.1.3 Immobilisierung von Fängermolekülen

Die gereinigten Chip-Blöcke wurden entsprechend ihrer späteren Position im Spotter nummeriert, in das Gerät eingelegt und mit Hilfe einer Vakuum-Pumpe fixiert. Maximal 48 Chips finden in der vorhandenen Vorrichtung Platz. Die Immobilisierungslösungen für den Spotting-Vorgang wurden in einer 384er Mikrotiterplatte bereitgestellt. In der Spotting-Kammer herrschte Raumtemperatur und die Luftfeuchtigkeit wurde auf 50% reguliert. Bei der Kalibrierung des Gerätes unter Verwendung der zugehörigen Software wurde das Volumen der von der Kapillare (=Nozzle) piezoelektrisch erzeugten Tropfen mit einer Kamera vermessen. Dieser Wert unterscheidet sich von Nozzle zu Nozzle und ist außerdem von verschiedenen weiteren Faktoren abhängig (z.B. Alter der Nozzle, Spannung und Pulslänge bei der Tropfenerzeugung), weshalb er vor jedem Spotting-Durchlauf erneut bestimmt wurde. Die Menge an Reagenz, die pro Spot von der Nozzle aufgebracht werden sollte, konnte dann über die jeweilige Anzahl an Tropfen eingestellt werden.

Um eine vollständige Benetzung der Spots unter den angegebenen Bedingungen (Luftfeuchtigkeit, Pufferzusammensetzung) bei gleichzeitiger Verhinderung eines Überlaufens der Flüssigkeit zu erreichen, wurde ein Maximalvolumen von 1,2 nl pro Spot ermittelt.

Die Belegung der Spots, d.h. welches Reagenz an welcher Position dispensiert wird, wurde in der Scienion Software eingestellt und der Spotting-Vorgang schließlich gestartet. Nachdem das Gerät alle Spots mit der vorgesehenen Flüssigkeit benetzt

hatte, wurde von jedem Chipmodul automatisch ein Kontrollbild erstellt, das über den Dateinamen später der zugehörigen Position und damit der Chipnummer (siehe oben) zugeordnet werden kann.

Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei 50% Luftfeuchtigkeit und Raumtemperatur wurden die Chips zunächst mit Reinstwasser abgespült und getrocknet. Bei der Immobilisierung von Einzelsträngen wurden die Blöcke anschließend in 8 M Harnstoff bei 50°C für 15 min inkubiert, dann mit Reinstwasser abgespült und getrocknet. Das Array wurde mit 10 µl *The Blocking Solution* (BS) benetzt und die Chipmodule schließlich in einer Feuchtekammer für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Blocklösung mit Reinstwasser entfernt worden war, wurden die getrockneten Chipmodule mit einer Stanze aus dem Kontaktband gelöst und in Stickstoff-Atmosphäre bis zum Gebrauch gelagert.

3.3.1.4 Fänger-Belegungsmuster der Chips

Wenn nicht anders angegeben, wurde die vorgegebene Anordnung der 128 Sensoren in 16 Spalten genutzt um jeder Spalte einen eigenen, mit dem jeweils gleichen Fänger versehenen Cluster zuzuordnen. Jeder der Fänger wurde zumindest auf einer Spalte des Arrays immobilisiert (Abbildung 5). Jede Immobilisierungslösung besetzte mindestens eine Spalte des Arrays. Obwohl grundsätzlich alle Sensorpositionen bei der Immobilisierung benetzt wurden, wurden häufig nur die mittleren Spalten für die Auswertung der Daten berücksichtigt, da die Messergebnisse der Sensoren in randständigen Positionen aufgrund technischer Schwierigkeiten (Form und Platzierung der Kavität, sowie deren Zusammenspiel mit Dichtung und Stempel) häufig durch Luftblasen oder LockSpot-Artefakte verfälscht wurden (Daten nicht gezeigt). Die bei der Auswertung verwendeten Cluster können den Bildunterschriften des jeweiligen Messergebnisses entnommen werden.

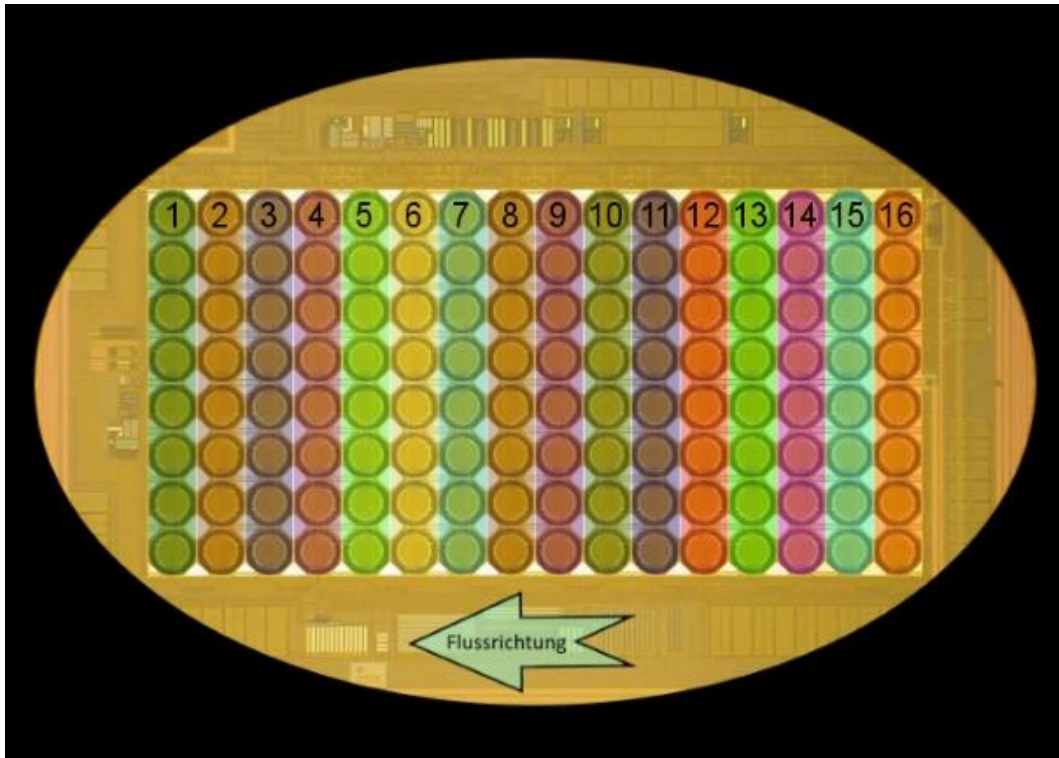


Abbildung 5: Array mit markierten Sensorclustern. Das Array mit den 128 Sensorpositionen ist in 16 Spalten mit je 8 Sensorpositionen angeordnet. Die Spalten wurden als einzelne Sensorcluster definiert (farbige Kennzeichnung), die von 1-16 wie dargestellt durchnummeriert wurden. Der Pfeil gibt die Flussrichtung der Substratlösung vor der Messung an.

3.3.2 Herstellung der LockSpot-Dichtungen

Je nach Vergussmassentyp des verwendeten Chips und nach eingesetzter Messkartusche wurden unterschiedliche Dichtungen gefertigt. Dazu wurde die entsprechende Gussform aus Polyvinylchlorid (Trovidur; Röchling, Mannheim) oder Aluminium mit Silikonkautschuk (RTV NV; Hobby time Glorex, Rheinfelden) gefüllt, das unmittelbar zuvor mit 4% Härtungsmittel vermischt worden war. Alternativ wurde das *Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit* (Dow Corning, Wiesbaden) verwendet, um PDMS-Dichtungen zu fertigen. Um Luftblasen aus dem Material zu entfernen, wurde die gefüllte Form in einen Exsiccator gelegt, der anschließend evakuiert wurde, bis sich keine Luftblasen mehr an der Oberfläche des Materials bildeten. Danach wurde die Form entnommen, der Deckel aufgelegt und mit Hilfe von mindestens einer Schraubzwinge fixiert. Das Silikon härtete über Nacht bei Raumtemperatur aus, das PDMS 2 h im Ofen bei 65°C. Dann wurde die fertige Dichtung aus der Form gelöst. Vor Verwendung der hergestellten Silikon-Dichtungen wurden diese für mindestens 10 min bei Raumtemperatur in BS inkubiert, um eine möglichst passivierte Oberfläche zu erhalten. Da es sich bei PDMS bereits um ein chemisch inertes

Material handelt, war dieser Schritt bei Einsatz der PDMS-Dichtungen nicht notwendig.

3.3.3 Modulare Messapparatur für Messungen mit der FlowStop-Methode

3.3.3.1 Aufbau des Messsystems

Die erste Version des in dieser Arbeit verwendeten Messaufbaus bestand aus einer Metallplatte mit einer Chiphalterung, bei der von unten ein Keramikblock zur Temperaturübertragung von einem zugehörigen Peltier-Element an das Smartcard-Interface des Chipmoduls gepresst wurde. Darin eingebettet lagen die Kontaktstifte zum Anschluss der CMOS-Schaltung an eine externe Elektronik (Abbildung 6A). Das Modul wurde zu Beginn des Versuchs mit einer Kunststoffplatte fixiert, die in Verbindung mit einer ovalen Silikonringdichtung eine Reaktionskammer mit Zu- und Ablauf für Flüssigkeiten über dem Sensorarray ausbildete (Abbildung 6B). Die Kontaktierung des Chips und das Peltier-Element wurden per Kabel mit einer externen Steuerungselektronik verbunden, die ihrerseits mit einem Computer mit der zugehörigen Bedienungssoftware verbunden war. Die fluidische Schnittstelle zum Messaufbau wurde mit einer Peristaltikpumpe verbunden, um die Reaktionslösungen per Unterdruck auf die Chipoberfläche ziehen zu können. Die Pumpe, das Peltier-Element für die Thermostatisierung der Reaktionskammer und die Chip-Elektronik konnten mit der Software auf dem Computer angesteuert werden. Zusätzlich wurden die von den Sensoren gemessenen Signale am Bildschirm dargestellt und konnten aufgezeichnet werden.

3.3.3.2 Versuchsdurchführung und Messung

Nach Einbau des Chipmoduls wurde die Bedienungssoftware gestartet. Während des Versuchs wurden verschiedene Reaktionslösungen auf und über die Chipoberfläche gepumpt. Zur Inkubation von Reagenzien auf der Array-Oberfläche wurde der Flüssigkeitsstrom nach Befüllung der Reaktionskammer (Volumen 3,8 - 4,5 μl) für definierte Zeitintervalle unterbrochen. Die bei den einzelnen Inkubations- und Waschschritten notwendigen Temperaturen wurden über die Software eingestellt und durch Auslesen des chipinternen Temperatursensors überprüft.

Um Signale in Form von Redox-Cycling bedingten Steigungen des Stromflusses zwischen den Interdigitalelektroden zu messen, wurde bei diesem Aufbau eine intern als *FlowStop-Methode* bezeichnete Vorgehensweise verwendet. Dabei wurde die Substratlösung (pAPP oder pAPB) zunächst mit hoher Geschwindigkeit (6,4 $\mu\text{l/s}$) über den Chip gepumpt, bis sich die Signale auf allen Sensoren des Arrays stabilisiert hatten. Die Messung, d.h. die Erfassung der Daten durch die Software, wurde dann gleichzeitig mit dem Stopp der Pumpe gestartet. Der registrierte Stromfluss an den Interdigitalelektroden wurde während der Messung im 0,5 s Takt für jede Sensorposition digital aufgezeichnet. Nach einem Messintervall von wenigen Sekunden wurde die Sammlung der Messdaten softwareseitig beendet und die Pumpe wieder eingeschaltet, das heißt erneut Substratlösung über den Chip gezogen. Dieser Vorgang wurde üblicherweise mehrfach wiederholt, um die Messstatistik signifikant zu verbessern.

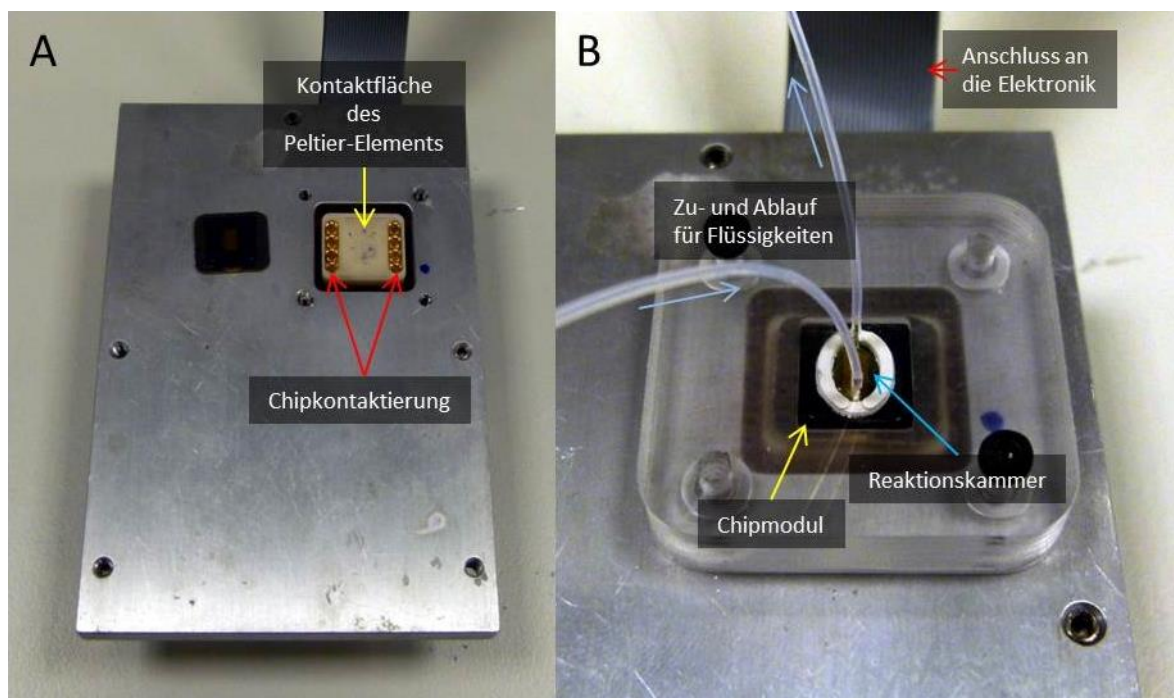


Abbildung 6: Modulare Apparatur für Messungen mit der FlowStop-Methode. A: Vorrichtung für die Integration des CMOS-Chips in den Messaufbau vor Einbau des Chipmoduls. B: Detailansicht der Chiphalterung nach Einbau des Chipmoduls. Die Kunststoffplatte wurde zur Fixierung des Moduls und zur Abdichtung der Reaktionskammer mit der Metallplatte verschraubt.

3.3.4 Modulare Messapparatur für Messungen mit der LockSpot-Methode

3.3.4.1 Aufbau des Messsystems

Der Messaufbau wurde um die Möglichkeit, mit der LockSpot-Methode zu messen erweitert. Dazu wurde das Chipmodul auf dem Keramikblock eines Peltier-Elements inklusive eingebetteter Kontaktierung fixiert. Die Abgrenzung der Reaktionskammer erfolgte mit einer Santoprene-Dichtung, welche die Chipkavität abdeckte und über zwei Löcher verfügte, die die Kammer mit der Zu- und Ablauföffnung einer aufgeschraubten Kunststoffplatte verband. In diese Platte war ein Stempel integriert, der mit Hilfe eines Servomotors die Dichtung auf die Chipoberfläche drücken konnte (Abbildung 7). Der Motor war mit der Steuerungselektronik verbunden und konnte mit Hilfe der Bedienungssoftware des angeschlossenen Computers betätigt werden. Der Einsatz der LockSpot-Technik führt zu einer Verstärkung des Messsignals und verhindert ein Übersprechen auf benachbarte Sensorpositionen (siehe Abschnitt 1.7.4). Die Zufuhr von Flüssigkeit in die Reaktionskammer erfolgte mit einer Pipette und die ablaufende Flüssigkeit wurde in einem Reservoir aufgefangen. Alternativ wurde eine Peristaltikpumpe an den Zulauf angeschlossen, um einen kontinuierlichen Fluss realisieren zu können. Der übrige Versuchsaufbau entsprach dem der FlowStop-Apparatur.

3.3.4.2 Versuchsdurchführung und Messung

Wie bei der Messung mit der FlowStop-Apparatur wurde zunächst das Chipmodul in die Halterung eingebaut und die Bedienungssoftware gestartet. Bei diesem Aufbau wurden die Reaktionslösungen jedoch mit einer Pipette in die Reaktionskammer gegeben. Kontinuierlicher Flüssigkeitszustrom durch Anschluss einer Peristaltikpumpe wurde nur für längere Waschschriffe verwendet. Um eine gleichmäßige Verteilung der Lösungsbestandteile in der Chipkavität zu erreichen und um eventuell auftretende Luftblasen zu entfernen, wurde der Servomotor des LockSpot-Stempels zeitweise im sogenannten Mischmodus betrieben. Dabei wechselte die Position des Stempels in einem eingestellten Zeitintervall (0,5-8 s) zwischen zwei definierten Höhen, sodass die Dichtung minimal eingedrückt und wieder entspannt wurde. Die dadurch induzierte pulsartige Bewegung sorgte für eine Durchmischung der Flüssigkeit auf der Chipoberfläche.

Zur Messung der Sensorsignale wurde die Substratlösung in die Reaktionskammer pipettiert und unmittelbar danach per Software der Servomotor des Stempels in die Position „geschlossen“ gefahren, so dass der Stempel die Dichtung auf die Chipoberfläche drückte (Abbildung 7B). Die Bewegung des Stempels in die „geschlossen“-Position startete gleichzeitig die Aufzeichnung der Messdaten durch den Computer. Zum Beenden der Erfassung des Redox-Stromes wurde nach wenigen Sekunden der Stempel wieder geöffnet. Auch bei dieser Variante wurden Wiederholungsmessungen durchgeführt um die Messstatistik signifikant zu verbessern.

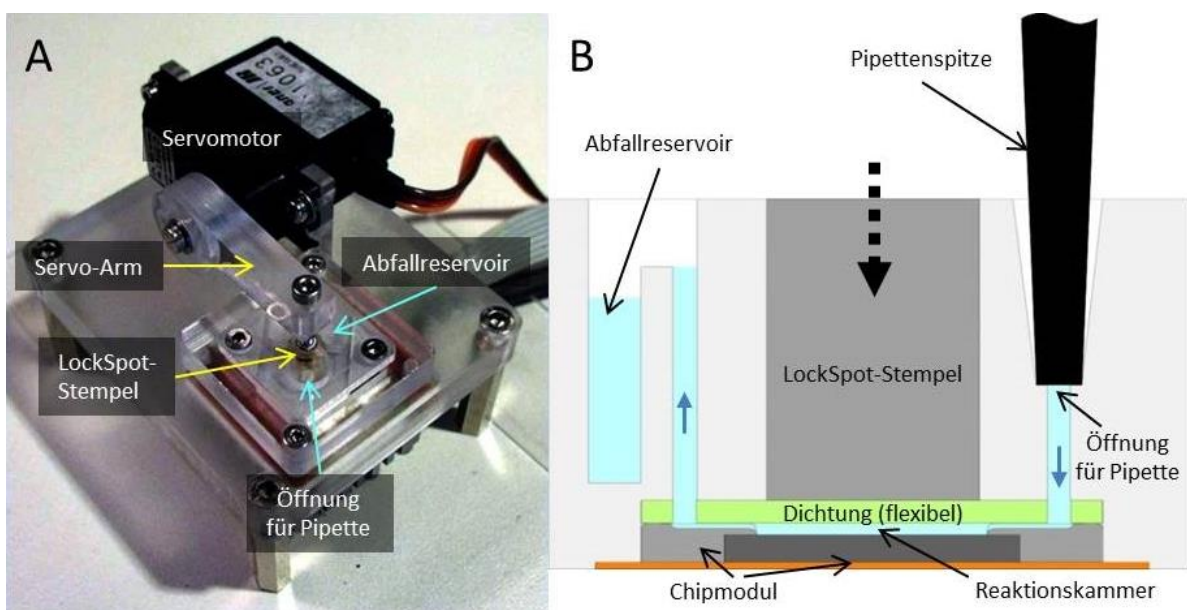


Abbildung 7: Modulare Apparatur für Messungen mit der LockSpot-Methode. A: Versuchsvorrichtung nach Einbau des Chipmoduls. Die Kabel für den Servomotor, das Peltier-Element an der Unterseite der Hauptplatte und die Chipkontaktierung sind mit einer externen Elektronik verbunden, die an den Computer mit der Bedienungssoftware angeschlossen ist. Flüssigkeiten werden mit einer Pipette an der vorgesehenen Öffnung in die Reaktionskammer einpipettiert und auf der gegenüberliegenden Seite der Vorrichtung in einem Abfallreservoir aufgefangen. B: Schematische Darstellung des Aufbaus im Längsschnitt. Der gestrichelte Pfeil symbolisiert die Bewegung des Stempels, die durch den Servomotor über den Servo-Arm bei Aktivierung des LockSpots zu Beginn einer Signal-Messung induziert wird. Der Stempel drückt dabei die flexible Dichtung auf die Array-Oberfläche des Chipmoduls und minimiert das Volumen der Reaktionskammer.

3.3.5 Quicklab-Reader

Der Quicklab-Reader ist ein automatisiertes System, das mit Hilfe einer entsprechenden Messkartusche und der passenden Software jedoch auch manuell gesteuerte Messungen erlaubt. Die dadurch gegebene Flexibilität eignete sich besonders für die Ausarbeitung neuer Testprotokolle oder die Erstellung von Schmelzkurven und Konzentrationsreihen auf einem einzelnen Chip.

3.3.5.1 Aufbau des Messsystems

Der Messaufbau für die manuelle Durchführung von Assays mit dem Quicklab-Aufbau bestand aus einer Peristaltikpumpe, einer Messkartusche mit Dichtung, dem Quicklab-Gerät und einem Computer mit der zugehörigen Bedienungssoftware (Abbildung 8A).

Das Messgerät umfasste unter anderem eine Halterung für die Messkartusche, Kontakte für die Kommunikation mit dem CMOS-Chip, ein Peltier-Element zur Thermostatisierung des Chips, eine servogesteuerte Lockspot-Vorrichtung und die Elektronik zur Ansteuerung der enthaltenen Elemente (Abbildung 8B).

In die Messkartusche war eine Chiphalterung mit Aussparung für die Dichtung (siehe Abschnitt 3.3.2) und einer Öffnung für den LockSpot-Stempel sowie ein Zu- und Abflusskanal für Flüssigkeiten eingefräst. In die Kanäle wurden Teflon-Schläuche eingeklebt und die offenen Bereiche mit selbstklebender Mikrotiterplattenfolie (HJ Bioanalytik, Erkelenz) versiegelt.

Der Computer mit der Labview-Steuerungssoftware wurde über eine serielle Schnittstelle mit der Elektronik des Messgeräts verbunden. Die grafische Benutzeroberfläche des Programms ermöglichte unter anderem das Öffnen und Schließen der Kartuschenhalterung, die Einstellung der Peltier-Temperatur, die Steuerung des LockSpot-Servos und die Aufzeichnung von Messdaten. Zusätzlich konnten die Ströme an den einzelnen Sensor-Elektroden während des gesamten Assays grafisch dargestellt werden.

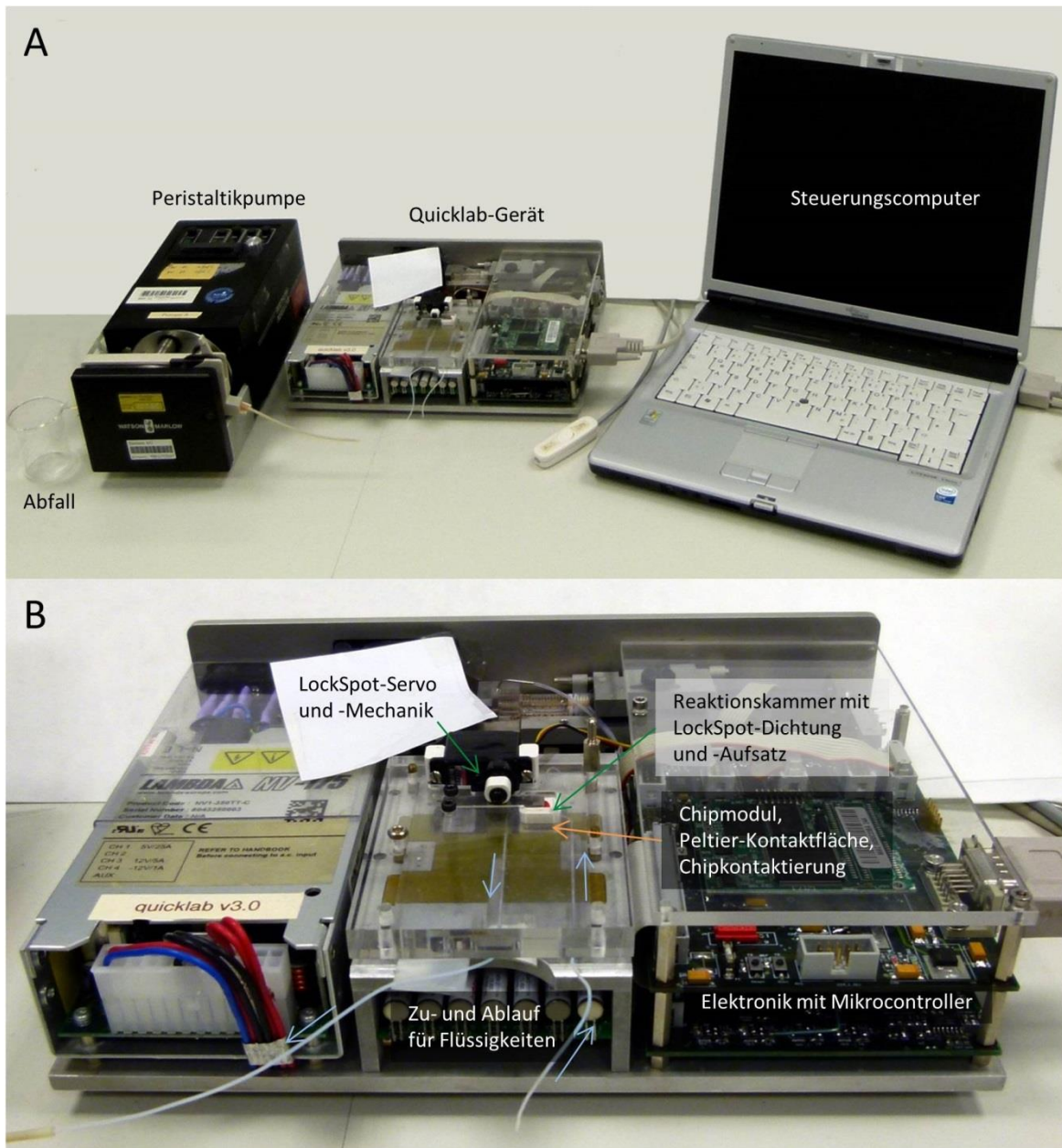


Abbildung 8: Versuchsaufbau für Messungen mit dem Quicklab-Gerät. A: Bestandteile des Versuchsaufbaus im Überblick. B: Detailansicht des Quicklab-Geräts mit eingelegter Messkartusche. Über die Teflonschläuche werden die verschiedenen Lösungen mit der Peristaltikpumpe zur und aus der Reaktionskammer transportiert.

3.3.5.2 Versuchsdurchführung und Messung

Die Dichtung und der verwendete Chip wurden zunächst in die Messkartusche eingelegt und fixiert, sodass eine Reaktionskammer über dem Array gebildet wurde (Volumen 3,8 - 4,5 μl), die über die Kanäle der Kartusche befüllt und entleert werden konnte. Diese Anordnung wurde anschließend in das Quicklab-Gerät eingeführt und der Kartuschenhalter geschlossen. Einer der beiden Schläuche, die als Zu- und Ablauf für Flüssigkeiten auf dem Sensorarray dienen, wurde mit der Peristaltikpumpe

verbunden. Durch Erzeugung eines Unterdrucks konnte so Flüssigkeit durch den anderen Schlauch in die Messkartusche und auf die Chipoberfläche gezogen werden. Die während der Versuchsdurchführung durch die Messkartusche gezogenen Reagenzien wurden in einem Abfallbehälter am Ausgang der Pumpe gesammelt. Die für den jeweiligen Assayschritt vorgesehene Pumpgeschwindigkeit wurde, genauso wie Start und Stopp des Reagenzienflusses, über einen Regler an der Pumpe eingestellt.

Der CMOS-Chip befindet sich im Quicklab-Gerät in einer Vorrichtung, die eine Weiterentwicklung des nicht integrierten LockSpot-Aufbaus darstellt (siehe Abschnitt 3.3.4) und die gleichen Funktionen erfüllt (Kontaktierung, Temperaturübertragung vom Peltier-Element, LockSpot-Stempel). Zur Durchführung eines Experiments wurden die verwendeten Puffer und Reaktionsgemische in verschiedenen Eppendorf-Gefäßen bereitgestellt und nacheinander durch die Reaktionskammer zwischen Array-Oberfläche und Dichtung geleitet. Zum Durchmischen der Flüssigkeiten in der Reaktionskammer wurde auch bei diesem Aufbau eine leichte Auf und Ab-Bewegung des LockSpot-Stempels verwendet (siehe Abschnitt 3.3.4.2).

Zur Messung der Sensorsignale wurde die Substratlösung mit moderater Geschwindigkeit ($0,8 \mu\text{l/s}$) bis zur Stabilisierung des Stromflusses an den Elektroden über das Array gepumpt. Dann wurde die Peristaltikpumpe gestoppt und gleichzeitig per Software die Dichtung durch den Stempel auf die Chipoberfläche gedrückt. Hierbei wurde eine zuvor eingestellte Position des Stempelmotors überschritten, was die Aufzeichnung der Messdaten startete. Nach wenigen Sekunden wurde der Stempel wieder geöffnet, die Erfassung der Daten beendet und die Pumpe wieder gestartet. Dieser Vorgang wurde üblicherweise mehrfach wiederholt um die Statistik der Messungen zu verbessern.

3.3.6 Auto-Reader

Der Auto-Reader ermöglicht eine voll automatische Durchführung eines Assays inklusive Messung und Datenaufzeichnung. Nach Konfiguration der jeweils passenden Programmdatei (Makro) und Inbetriebnahme des Gerätes (Kalibrierung, Aufnahme der Systemflüssigkeit) mussten vor jeder Messung lediglich die Messkartusche und die zu messende Probelösung vorbereitet werden. Nach

Beendigung der Assay-Routine konnten die vorformatierten und auf einer SD-Karte gespeicherten Messdaten auf einem externen Rechner ausgewertet werden.

3.3.6.1 Aufbau des Messsystems

Das Messsystem zur automatischen Durchführung von CMOS-Chip-Messungen bestand aus dem voll integrierten Auto-Reader und einer Spritzguss-Messkartusche (Abbildung 9). Das Messgerät bietet wie der Quicklab-Reader die Möglichkeiten der Kontaktierung und Thermostatisierung des Chips, eine integrierte Elektronik mit Mikrocontroller, einen Messkartuschenhalter und eine LockSpot-Vorrichtung. Zusätzlich sind Steuerungselemente für die Fluidik (Pumpe, Ventile, Sensoren) und ein Systemflüssigkeits-Reservoir sowie ein Mini-Computer (PDA) mit grafischer Benutzerschnittstelle integriert.

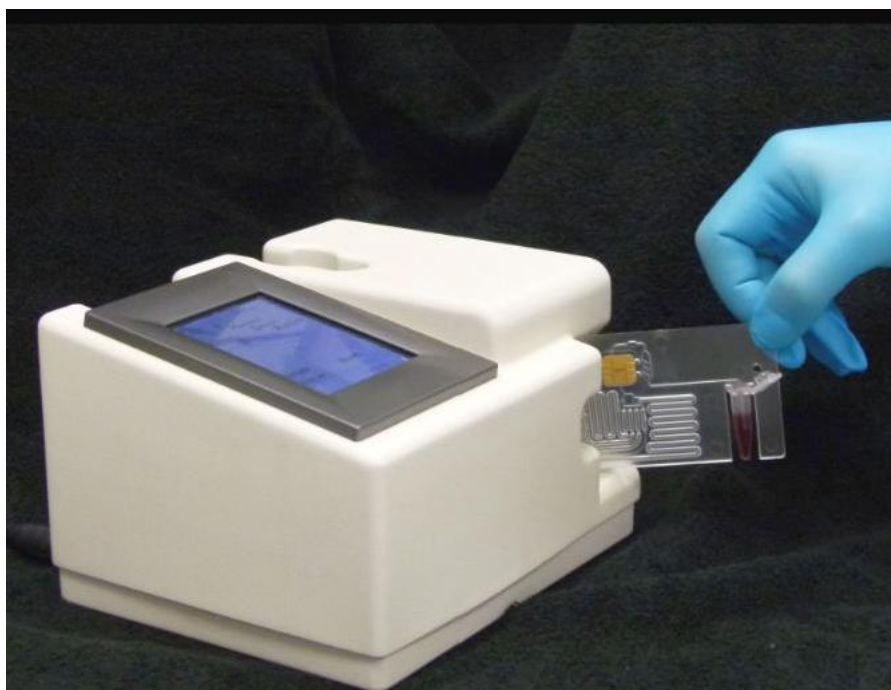


Abbildung 9: Messkartusche beim Einführen in den Kartuschenhalter des Auto-Readers. Nach Start des Messprogramms über das PDA (Personal Digital Assistant) öffnet sich der Kartuschenhalter und die vorbereitete Messkartusche wird zusammen mit der Probe (0,5 ml Reaktionsgefäß) eingeschoben. Die Halterung schließt automatisch und nach Eingabe der Versuchs-Identifikationsbezeichnung startet die Messroutine.

3.3.6.2 Vorbereitung der Messkartusche

Die Spritzgusskarte wurde zunächst mit einer Mikrotiterplattenfolie (HJ Bioanalytik, Erkelenz) versiegelt, um die offene Seite des Kanalsystems zu verschließen. Dazu

wurde die Folie zunächst ganzflächig mit einem Plastikwerkzeug aufgerollt. Mit einem Skalpell wurde anschließend vom Rand der Karte überstehendes Folienmaterial entfernt und das LockSpot-Fenster freigeschnitten, um ein problemloses Einführen des Probenrüssels in das Reaktionsgefäß, der Kartusche in das Messgerät und des Stempels in die Kartusche zu gewährleisten. Im nächsten Schritt wurde die Dichtung in die Chipkammer eingelegt und der Chip in korrekter Orientierung darüber eingerastet. Über die Befüllungslöcher auf der Kontaktseite der Kartusche wurden die Reservoirs anschließend mit den Reagenzien befüllt, die für den durchzuführenden Versuch benötigt wurden (Abbildung 10). Schließlich wurden die Anschlusslöcher zum Messgerät und die Befüllungslöcher mit einem *Scotch Magic Tape* Klebeband versiegelt (Abbildung 11).

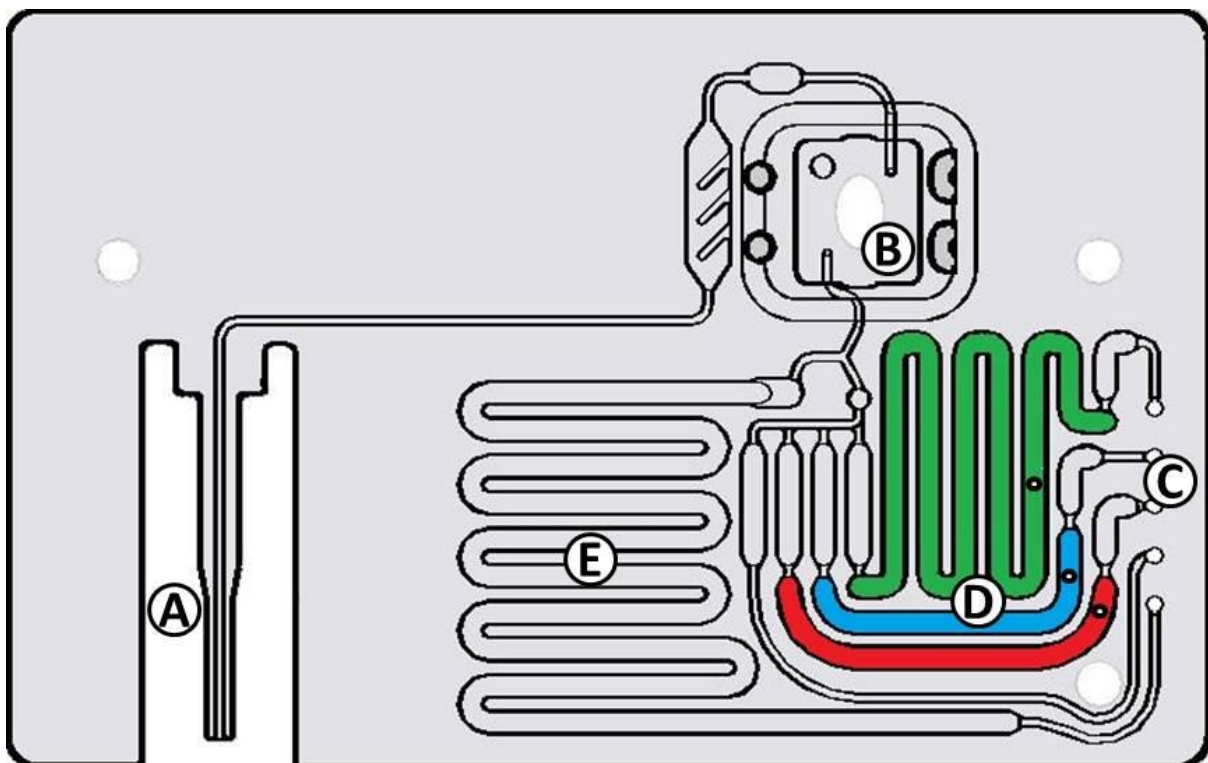


Abbildung 10: Die wichtigsten funktionellen Bereiche der Messkartusche. A: Probenrüssel für das Probengefäß. B: Einlegestelle für Dichtung und Chipmodul. C: Anschlusslöcher der Fluidik zum Messgerät. D: Reagenzienreservoirs mit Befüllungslöchern; rot, Kanal 1; blau, Kanal 2; grün, Kanal 3 (Substratkanal). E: Abfallreservoir.

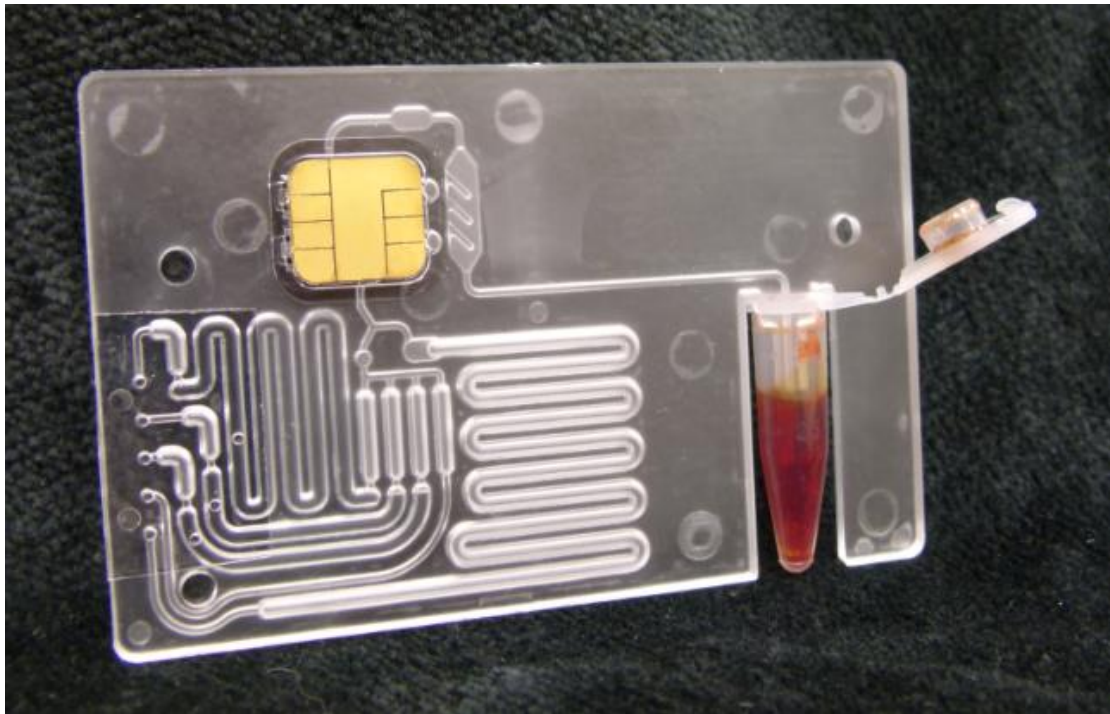


Abbildung 11: Messkartusche nach abgeschlossener Vorbereitung und mit eingesetztem Probegefäß. Auf der fotografierten Seite der Kartusche befinden sich die Befüllungsöffnungen der Reagenzienreservoirs, die Anschlussöffnungen der fluidischen Kanäle und das Smartcard-Kontaktpad des eingesetzten Chipmoduls (vgl. **Abbildung 10**). Die Befüllungs- und Anschlussöffnungen sind mit einem Klebeband versiegelt.

3.3.6.3 Programmierung des Assay-Ablaufs

Die für den jeweiligen Assay-Ablauf notwendigen Befehle und Parameter für z.B. Temperatur, Pumpgeschwindigkeit, Inkubationszeit liest die Gerätesoftware aus einer sogenannten Makrodatei aus. Sie ist aus acht Spalten aufgebaut und wird Zeile für Zeile vom Messgerät abgearbeitet (Tabelle 1). Die erste Spalte enthält eine Ziffer, die einem bestimmten Befehl zugeordnet ist. Für dessen Ausführung können bis zu drei Parameterwerte festgelegt werden, die in den folgenden drei Spalten (Spalte 2-4) notiert sind. In der fünften Spalte kann ein Zeitwert in Sekunden angegeben werden, der die Wartezeit bis zur Verarbeitung des nächsten Befehls festlegt („Wait“). Der Zeitwert in Spalte 6 liefert der Software die vorkalkulierte Dauer bis die Aktion, die in der Zeile definiert wird, beendet ist. Bei Angabe des Wertes Null ist das reale Intervall kleiner als eine Sekunde. Durch Addition aller Daten aus Spalte 6 ermittelt die Software außerdem die Gesamtdauer des Versuchs und informiert während des Durchlaufs über die verbleibende Zeit bis zum Ergebnis. Die Spalte 7 wird im Augenblick nicht genutzt und steht für zukünftig notwendige Parameter zur Verfügung. In der letzten Spalte findet sich schließlich eine Kurzbeschreibung des Assay-Schrittes, zu dem die jeweilige Zeile gehört. Um den Anwender über den

aktuellen Stand des Tests zu informieren, wird diese Information auf dem Display des PDA ausgegeben.

Tabelle 1: Anfang einer Makro-Textdatei zur Definition des Programmablaufs auf dem Auto-Reader mit Beispielbefehlen. Zeilen, die mit „Note:“ beginnen, werden von der Software ignoriert und dienen der Übersichtlichkeit.

Note:	Wert1	Wert2	Wert3	Wait	Zeit	Leer	Beschriftung
90	7000	0	0	0	0	0	Assay Start
25	0	1	37	1	1	0	Assay Start
Note:							
:							
Note:							
72	1	1000	0	0	0	0	Waste filling
50	1	2	500	0	0	0	Waste filling
30	850	1	0	0	4	0	Waste filling
:							
etc.							

Zur Erstellung und Bearbeitung der Makrodateien für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurde eine Excel-Tabellendatei verwendet, die zur Kalkulation der Dauer des jeweiligen Schrittes und zur Kontrolle der Position der Flüssigkeitspumpe genutzt wurde. Die entwickelten Programme enthalten u.a. Befehle zur Steuerung der Fluidik, zur Temperaturregelung in der Chipkammer, zur Polarisierung der Elektroden, zur Kontrolle des LockSpot-Stempels und zum Sammeln von Messdaten. Der genaue Inhalt der in dieser Arbeit verwendeten Makrodateien ist in Abschnitt 8.3 des Anhangs dargestellt.

3.3.6.4 Versuchsdurchführung und Messung

Für die Durchführung des Versuchs wurden 60 µl der zu messenden Probe in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß bereitgestellt, welches anschließend an den Probenanschluss der Messkartusche gesteckt wurde. Nach Start der Versuchsroutine über den Touchscreen des Messgerätes wurde die Kartusche in den nun geöffneten

Kartuschenhalter geschoben. Nachdem das Gerät die Messkartusche fixiert hatte, wurde ein Name für die am Ende der Messung erzeugte Datei, die die gemessenen Werte enthält, eingegeben. Anschließend führte das Messgerät das Assay-Programm entsprechend den Konfigurationswerten der zugehörigen Makrodatei aus, dessen Befehle dabei der Reihe nach abgearbeitet wurden. Am Ende wurde die Kartusche aus dem Gerät genommen und neu aufbereitet oder entsorgt. Die Messdaten, die auf die Speicherkarte geschrieben worden waren, wurden auf einen Computer übertragen und mit der zugehörigen Datenanalysesoftware ausgewertet.

3.3.7 Datenanalyse und Auswertung

Die von den verschiedenen Analysegeräten ausgegebenen Messdaten lagen in zwei unterschiedlichen Formaten vor, konnten jedoch alle mit der gleichen Software ausgewertet werden. Die Dateien der manuellen Messapparaturen enthielten sowohl die gemessenen absoluten Ströme I an der Generator- als auch die an der Kollektor-Elektrode. Vor der Berechnung der Steigungen ΔI wurden für jeden Datenpunkt Generator- und Kollektorstrom eines Elektrodenpaares durch die Software addiert. Die vom Auto-Reader ausgegebenen Messdateien enthielten bereits nur die addierten Werte. Unabhängig von der verwendeten Messapparatur lag zwischen zwei aufeinanderfolgenden digital aufgezeichneten Messwerten eines Sensors immer ein Intervall von 0,5 Sekunden (Abbildung 12).

Zur Auswertung der Messdaten wurde eine mit Labview 2011 (National Instruments, Texas, USA) programmierte Auswertungssoftware verwendet. Die vom Messgerät aufgezeichnete Datei wurde eingelesen und die zur Berechnung der Steigung des Stromflusses (ΔI) zu verwendenden Messpunkte wurden ausgewählt. Bei allen in dieser Arbeit aufgeführten Ergebnissen wurden drei Messpunkte ab 0,5 s nach Beginn der Aufzeichnung für die Berechnung der Steigungen ΔI herangezogen (Abbildung 12). Die Steigung wurde anschließend für jede Sensorposition durch eine lineare Regression mit der Methode der kleinsten Quadrate von der Software ermittelt.

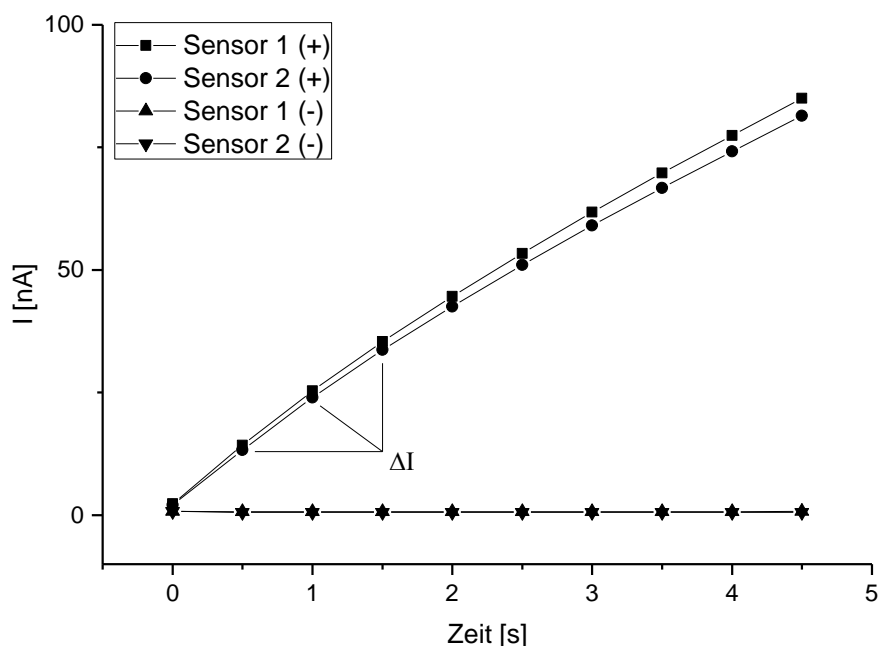


Abbildung 12: Beispiel für den Verlauf des elektrochemischen Signals während des Messvorgangs. Die Datenpunkte des elektrischen Stromflusses (I), die von zwei Sensoren während eines positiven (+, Ziel-Nukleinsäure vorhanden) und während eines negativen (-, keine Ziel-Nukleinsäure) Versuchsdurchlaufs aufgezeichnet wurden, sind in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Der Startpunkt der Messung ist durch das Auslösen des LockSpot-Prozesses zum Zeitpunkt 0 s definiert. Die Messwerte zum Zeitpunkt 0,5 s, 1,0 s und 1,5 s wurden bei der Analyse der Daten zur Kalkulation der Steigung ΔI verwendet.

Mit Hilfe einer Konfigurationsdatei, die die Information für das Immobilisierungsmuster des verwendeten Chips enthält, wurden die Daten aller Sensorpositionen mit gleichen Fängermolekülen von der Software in Gruppen zusammengefasst (siehe Abschnitt 3.3.1.4).

Nachdem der Benutzer die Anzahl der in die Auswertung einfließenden Wiederholungsmessungen festgelegt hatte, wurden für die konfigurierten Sensorgruppen das arithmetische Mittel und die Standardabweichung aus allen zugehörigen Steigungswerten berechnet und angezeigt. Zusätzlich ermittelte das Programm den Median, den Median der absoluten Abweichungen (MAD) und einen ausgewerteten Mittelwert mit Standardabweichung nach automatischer Eliminierung von Ausreißer-Werten (siehe unten). Letztere Mittelwerte und Standardabweichungen wurden für die Darstellung der Ergebnisse in dieser Arbeit verwendet.

Da bei den durchgeführten Experimenten Prototypen statt ausgereifter kommerzieller Geräte mit entsprechenden Qualitätsstandards eingesetzt wurden und auch die verwendeten Materialien (CMOS-Chips, Dichtungen aus Eigenherstellung) nicht durch aufwändige Qualitätskontrollen auf kleinste Fehler und Unregelmäßigkeiten untersucht werden konnten, mussten auftretende Ausreißer bei der Auswertung eliminiert werden. Dazu wurde ein iteratives Verfahren entwickelt und in die Auswertungssoftware integriert. Bei diesem Verfahren wurden zunächst das arithmetische Mittel und die Standardabweichung für alle Messwerte einer Gruppe (siehe oben) ermittelt. Alle Werte außerhalb der 1,5-fachen Standardabweichung (Ausnahme bDNA-Versuche: 1,3-fache Standardabweichung) um den Mittelwert wurden anschließend eliminiert und aus den übrigen Werten das neue arithmetische Mittel mit Standardabweichung berechnet. Dieser Vorgang wurde wiederholt bis sich die Werte nicht mehr veränderten oder ein prozentualer Grenzwert von 60% an übrigen Messwerten – bezogen auf die Zahl der Ausgangs-Messwerte der Gruppe – unterschritten wurde. Die ausgegebenen Mittelwerte und Standardabweichungen entsprachen den letzten Werten vor Erreichen eines der beiden Abbruchkriterien. Dadurch wurde sichergestellt, dass nie mehr als 40% der auszuwertenden Messpunkte eliminiert wurden.

Eine gegebenenfalls durchgeführte Korrektur von Messwerten durch eine Negativkontrolle erfolgte, indem der ausgewertete Mittelwert der Negativkontrolle vom ausgewerteten Mittelwert der jeweiligen Sensorgruppe subtrahiert wurde und die beiden zugehörigen Standardabweichungen addiert wurden.

3.4 Detektion von microRNA

Während der Anfertigung dieser Arbeit wurden neben den beschriebenen Modifikationen der Assay-Protokolle und Reagenzien-Zusammensetzungen auch Veränderungen an der Hardware des Detektionssystems vorgenommen. So wurde beispielsweise die Reaktionskammer durch Änderungen der Form der Vergussmasse der CMOS-Chips und der zugehörigen Dichtungen modifiziert. Aufgrund dieses dynamischen Optimierungsprozesses sind Versuche aus verschiedenen Entwicklungsstadien nicht immer direkt vergleichbar, auch wenn sie nach dem gleichen Assay-Protokoll durchgeführt

wurden. Dies wurde jedoch bei der Darstellung und Ableitung von Zusammenhängen zwischen entsprechenden Ergebnissen berücksichtigt.

3.4.1 2-Komponenten-Methode

3.4.1.1 Detektion einer biotinylierten Sonde

Die Messung hybridisierter, biotinkoppelter Oligonukleotide wurde mit der modularen FlowStop-Apparatur (siehe Abschnitt 3.3.3) durchgeführt. Dazu wurde das Array des eingebauten CMOS-Chips zunächst mit Waschpuffer 2 (WP2) bei Raumtemperatur und einer Pumpgeschwindigkeit von 2,4 $\mu\text{l/s}$ benetzt. Die gewählte Menge des zu hybridisierenden Oligonukleotids wurde in 50 μl Hybridisierungspuffer S bei 42°C und gleicher Pumpgeschwindigkeit auf das Array gezogen und für 5 min auf der Chipoberfläche inkubiert. Die Reaktionskammer wurde anschließend mit WP2 für 5 min bei gleichbleibender Temperatur und einer Pumpgeschwindigkeit von 1,6 $\mu\text{l/s}$ gewaschen. Nachdem 67 U/ml Streptavidin-AP in 35 μl WP2 mit 1 mg/ml BSA in die Reaktionskammer gepumpt (Geschwindigkeit 2,4 $\mu\text{l/s}$) und für 5 min bei 20°C inkubiert worden waren, wurde bei ebenfalls 20°C mit WP2 für 2 min bei einer Pumpgeschwindigkeit von 1,6 $\mu\text{l/s}$ gewaschen, bevor bei 38°C die elektrochemischen Signale unter Verwendung von pAPP-Substratlösung mit der FlowStop-Methode gemessen wurden.

3.4.1.2 Detektion des Esterase-Konjugats (Konzentrationsreihe)

Für die Messung der Abhängigkeit des gemessenen Redox-Signals von der Hybridisierungskonzentration eines zum immobilisierten Fänger-Oligonukleotid komplementären Esterase-Konjugats wurde die modulare LockSpot-Apparatur verwendet. Die Chipoberfläche wurde dazu zunächst bei Raumtemperatur mit Flüssigkeit benetzt, indem die Reaktionskammer vollständig mit Waschpuffer 1 (WP1) befüllt wurde. Alle weiteren Schritte der Analyse wurden bei 35°C durchgeführt. Das Standardvolumen für das Einpipettieren von Lösungen entsprach jeweils 36 μl . Begonnen wurde die Messreihe mit der niedrigsten Konjugat-Konzentration. Diese wurde in Quick Ligation Buffer (QLB) mit 1 mg/ml BSA in die Chipkammer gegeben und für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Kammer zweimal mit WP1 gewaschen. Schließlich wurde pAPB-Substratlösung in die

Chipkammer gegeben und das Signal nach Auslösen des LockSpots erfasst. Nach zweimaligem Spülen der Reaktionskammer mit WP1 wurde die nächsthöhere Konzentration des Konjugats auf demselben CMOS-Chip nach dem gleichen Protokoll gemessen, usw.

3.4.2 3-Komponenten-Methode

3.4.2.1 Messung einer Konzentrationsreihe

Der CMOS-Chip wurde in die modulare LockSpot-Apparatur eingebaut und die Reaktionskammer mit WP1 bei Raumtemperatur befüllt. Die Zuführung von Flüssigkeit in die Chipkammer erfolgte stets durch Einpipettieren mit einem Standardvolumen von 40 µl. Die Probe bestand aus 250 nM Esterase 2-Ra11-Konjugat (EST2-Ra11), der zu messenden Konzentration an Ziel-Nukleinsäure, 100 U/ml T4 DNA Ligase und 1 mg/ml BSA in QLB. Sie wurde für 20 min bei 35°C auf der Chipoberfläche inkubiert. Im anschließenden ersten Waschschrift wurde zunächst zweimal WP1 in die Chipkammer pipettiert, dann für 2 min bei 35°C mit der LockSpot-Vorrichtung gemischt und schließlich nochmals mit WP1 gespült. Nach Zugabe von pAPB-Substratlösung wurde mit der LockSpot-Methode eine Referenzmessung bei 35°C erfasst. Danach wurde in die Reaktionskammer wieder WP1 gegeben, die Temperatur auf 55°C erhöht und für 5 min gemischt. Anschließend wurde noch einmal bei 55°C und einmal bei 35°C mit WP1 gewaschen, bevor bei 35°C mit pAPB-Substratlösung die eigentliche Messung für die entsprechende Ziel-Nukleinsäure-Konzentration mit der LockSpot-Methode durchgeführt wurde. Die Chipkammer wurde mit WP1 gewaschen und der Assay mit der nächsthöheren Konzentration auf dem gleichen CMOS-Chip wiederholt bis alle vorgesehenen Messwerte erfasst worden waren.

3.4.2.2 Messung einer Schmelzkurve

Nach Einbau des Chips in die modulare LockSpot-Apparatur und Benetzung mit WP1 wurden 100 nM Ziel-Nukleinsäure miDNA-96, 100 nM EST2-Ra11, 100 U/ml T4 DNA Ligase und 1 mg/ml BSA in QLB für 5 min bei 35°C auf der Chipoberfläche inkubiert. 40 µl wurden als Standardvolumen für Lösungen zum Befüllen der Reaktionskammer mit einer Pipette festgelegt. Der Chip wurde zweimal mit WP1 gewaschen und eine

Referenzmessung bei 35°C mit pAPB-Substratlösung durchgeführt (LockSpot). Anschließend wurde die Chipkammer zweimal mit Nidrigsalzpuffer (NSP) gespült und bei einer vorgegebenen (Schmelz-)Temperatur – beginnend mit der niedrigsten – für 5 min mit der LockSpot-Vorrichtung gemischt, wobei bis zu fünfmal neuer NSP (jeweils 20-40 µl) zugeführt wurde. Nach Absenken der Temperatur auf 35°C wurde zweimal mit NSP gewaschen und die Signale nach Zugabe von pAPB-Substratlösung ermittelt. Anschließend wurde der Versuch wie nach der Referenzmessung fortgeführt (siehe oben) bis die Messdaten nach Waschen bei der höchsten Schmelztemperatur (50°C) erfasst worden waren. Dabei wurden auch mehrere Messläufe mit gleicher Waschtemperatur hintereinander durchgeführt.

3.4.3 4-Komponenten-Methode

3.4.3.1 1-Schritt-Variante

Die 1-Schritt-Variante der 4-Komponenten-Methode wurde mit der modularen LockSpot-Apparatur und einem Standardvolumen von 40 µl Lösung pro Befüllungsschritt mit der Pipette durchgeführt (siehe Abschnitt 3.4.2). Als Probe wurden 100 nM der verwendeten Gegenstränge, 250 nM EST2-Ra11, 100 U/ml T4 DNA Ligase, 1 mg/ml BSA und die zu messende Konzentration an Ziel-Nukleinsäure in QLB für 10 min bei 35°C auf dem Chip inkubiert. Optional wurden nach zweimaligem Waschen mit WP1 bis zu drei LockSpot-Referenzmessungen – jeweils mit frischer pAPB-Substratlösung – hintereinander bei 35°C durchgeführt. Anschließend wurde die Reaktionskammer zweimal mit NSP gespült und für 15 min bei 55°C bei durchgängigem Zustrom von frischem NSP (Peristaltikpumpe, Pumpgeschwindigkeit 0,8 µl/s) gewaschen. Nach Entfernung des Pumpenanschlusses wurde zweimal WP1 einpipettiert und bei 35°C für 3 min inkubiert. Die Chipkammer wurde noch einmal mit WP1 gespült, bevor die Sensorsignale mehrfach mit frischer pAPB-Substratlösung bei 35°C unter Verwendung des LockSpot gemessen wurden. Bei Durchführung weiterer Versuchsdurchläufe auf demselben Chip (Messreihe), wurde mit WP1 gewaschen und mit der Inkubation der nächsten Probelösung fortgefahren.

3.4.3.2 2-Schritte-Variante

Für die Anwendung der 2-Schritte-Variante wurde anfangs die modulare LockSpot-Apparatur mit 40 µl Standard-Befüllungsvolumen, später das QuickLab-Gerät mit Peristaltikpumpe verwendet.

3.4.3.2.1 Verwendung der modularen LockSpot-Apparatur

Die Santoprene-Dichtung wurde vor dem Einbau in die Apparatur für mindestens 15 min bei Raumtemperatur mit *The Blocking Solution* geblockt.

Die zu messende Ziel-Nukleinsäure wurde zusammen mit je 100 nM Gegenstrang, 250 nM EST2-Ra11 und 1 mg/ml BSA in QLB für 10 min bei 42°C auf der Chipoberfläche inkubiert. Nach zweimaligem Spülen der Reaktionskammer mit WP1 und einem Mischintervall von 5 min wurde eine Referenzmessung mit LockSpot unter Zugabe von pAPB-Substratlösung bei 42°C durchgeführt. Die Chipoberfläche wurde zweimal mit WP1 bei 37°C gewaschen und dann 100 U/ml T4 DNA Ligase mit 1 mg/ml BSA in QLB für 10 min bei 37°C auf der Chipoberfläche inkubiert. Der Rest des Versuchsablaufs entsprach dem zweiten Teil der 1-Schritt-Variante beginnend mit dem zweimaligen Spülen der Chipkammer mit NSP.

3.4.3.2.2 Verwendung des QuickLab-Geräts

Die Zuführung der Reagenzien sowie das Blocken und Waschen wurden mit einer Pumpgeschwindigkeit von 0,4 µl/s durchgeführt. Die eingebaute Chipkammer wurde zunächst für 15 min bei 35°C mit BS geblockt und anschließend für 3 min bei 45°C mit WP1 gewaschen. Dann wurden je 100 nM Gegenstrang, 250 nM EST2-Ra11, 1 mg/ml BSA und die Ziel-Nukleinsäure in 40 µl QLB bei 45°C für 5 min auf der Chipoberfläche inkubiert. Die Reaktionskammer wurde für 5 min bei 45°C mit QLB gewaschen, bevor 100 U/ml T4 DNA Ligase in 40 µl QLB mit 1 mg/ml BSA auf das Array gepumpt wurden. Nach einer Ligationszeit von 5 min bei 35°C wurde erst mit NSP für 15 min bei 55°C und dann mit WP1 für 3 min bei 35°C gewaschen. Schließlich wurden die Sensorsignale mit pAPB-Substratpuffer und LockSpot bei 35°C und einer Pumpgeschwindigkeit von 0,8 µl/s gemessen.

3.4.3.3 3-Schritte-Variante (QuickLab-Gerät)

Die 3-Schritte-Variante wurde für eine Vielzahl von Experimenten verwendet und dabei das Grundprotokoll mehrfach variiert. Daher wird hier ein allgemeiner Versuchsablauf beschrieben, der alle Varianten beinhaltet. Die Bezeichnungen in den eckigen Klammern finden sich in den Abbildungsunterschriften wieder und definieren dort die durchgeführten optionalen Schritte und variablen Parameter (Einheit in runden Klammern).

Das Waschen und Blocken sowie die Zuführung der Reagenzien wurden mit einer konstanten Pumpgeschwindigkeit von 0,4 $\mu\text{l/s}$ durchgeführt. Nur bei der Messung der Signale mit der LockSpot-Methode wurde die Pumpgeschwindigkeit für die Substratlösung auf 0,8 $\mu\text{l/s}$ erhöht.

Vor Beginn des Versuchs wurde die Reaktionskammer des eingebauten Chips optional für bis zu 15 min bei 35°C mit BS geblockt [B]. Ebenfalls optional wurde vor dem ersten Hybridisierungsschritt für 3 min mit WP1 bei Hybridisierungstemperatur [T_H (°C)] gewaschen [W_0]. Dann wurde die Ziel-Nukleinsäure zusammen mit je 100 nM Gegenstrang und 1 mg/ml BSA in 40 μl QLB bei T_H für 5 min auf der Chipoberfläche hybridisiert. Die Ligationlösung mit 100 U/ml T4 DNA Ligase in 40 μl QLB mit 1 mg/ml BSA wurde – entweder direkt anschließend oder nach einer Luftblase als Trennphase [L_B] oder nach einem Waschschrift mit QLB für 5 min bei T_H [L_Q] – bei 35°C auf das Array geleitet und für ein Zeitintervall [t_L (min)] inkubiert. Als Nächstes wurde für 5 min mit WP1 bei einer Stringenztemperatur [T_S] gewaschen, bevor die Reaktionskammer mit dem EST2-Reporter-Konjugat, 100 U/ml T4 DNA Ligase und 1 mg/ml BSA in 40 μl QLB bei 35°C befüllt wurde. Nach 5 min wurde mit NSP bei 55°C für 15 min gewaschen, danach optional mit WP1 für 3 min bei 35°C [W_M], und schließlich bei 35°C mit pAPB-Substratlösung gemessen (LockSpot).

3.4.3.4 Automatische Durchführung der 4-Komponenten-Methode

Aufgrund der eingeschränkten Verfügbarkeit von Reagenzienkanälen in der Messkartusche des Auto-Readers, mussten für die automatische Messung mit der 4-Komponenten-Methode die erste Hybridisierung und Ligation wieder in einem Schritt

zusammengefasst werden. Ansonsten wurde das Grundprotokoll der manuellen 3-Schritte-Variante weitgehend auf das automatische Messsystem übertragen.

Die Reservoirs der Kartusche wurden mit WP1 (Kanal 1), dem EST2-Konjugat mit 100 U/ml T4 DNA Ligase und 1 mg/ml BSA in QLB (Kanal 2) sowie der pAPB-Substratlösung (Kanal 3) befüllt. Als Systemflüssigkeit wurde NSP verwendet. Im Proberöhrchen wurden je 100 nM Gegenstrang, 100 U/ml T4 DNA Ligase, 1 mg/ml BSA und die Ziel-Nukleinsäure(n) in 60 µl QLB angesetzt.

Die Makrodatei 4-Komponenten1-TS50 enthielt Programmparameter, so dass zunächst die Probe in vier Schritten für insgesamt 5 min bei 37°C auf dem Chip inkubiert wurde. Das Aufziehen der Probe auf die Chipoberfläche und die Zuführung von Reagenzien aus den Reservoirs erfolgte mit Pumpgeschwindigkeiten in einer Spanne von 2 - 5 µl/s, wobei diese Variation lediglich der Optimierung der Fluidik diente (Benetzung des Chips, Vermeidung/Entfernung von Luftblasen). Anschließend wurde WP1 aus Kanal 1 in die Chipkammer gedrückt und bei sehr langsamer Pumpgeschwindigkeit (0,1 µl/s) und 50°C für 5 min gewaschen, bevor die Temperatur auf 35°C reduziert und die Konjugat-Lösung aus Kanal 2 auf die Chipoberfläche gepumpt wurde. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde mit der Systemflüssigkeit (NSP) bei langsamer Pumpgeschwindigkeit (0,2 µl/s) und 55°C für 15 min gewaschen. Schließlich wurden mit der Substratlösung aus Kanal 3 bei 35°C eine FlowStop-Kontrollmessung (Pumpgeschwindigkeit 4,8 µl/s) und vier LockSpot-Messungen (Pumpgeschwindigkeit 1,5 µl/s) durchgeführt. Bei der Auswertung der Ergebnisse wurden nur die Werte der LockSpot-Messungen berücksichtigt.

In der Makrodatei 4-Komponenten2-TS55 finden sich für die Steuerung der Fluidik und den Einsatz der Mischfunktion des LockSpot-Stempels optimierte Parameter. Dabei wurde unter anderem die Pumpgeschwindigkeit bei den LockSpot-Messungen auf 6,1 µl/s erhöht, um eventuell auftretende Luftblasen zwischen den Messungen zu entfernen. Außerdem wurde die Temperatur des Waschschrives mit WP1 auf 55°C erhöht und der NSP-Waschschritt um 1 min reduziert.

3.4.4 Sandwich-Ligations-Methode

Versuche zur Sandwich-Ligations-Methode wurden manuell mit dem QuickLab-Gerät oder automatisch mit dem Auto-Reader durchgeführt.

3.4.4.1 Herstellung der doppelsträngigen Reporter-Komponenten

Die doppelsträngigen Reporter-Komponenten wurden aus einzelsträngigen Oligonukleotiden hergestellt und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert (siehe Abschnitt 3.1.2). Dabei wurden entweder mehrere spezifische Einzelstränge in einem Gesamtansatz mit dem generischen Reporter-Konjugat hybridisiert, oder für jede doppelsträngige Komponente eine eigene Lösung angesetzt. Detaillierte Informationen zu den jeweiligen Ansätzen können den zugehörigen Tabellen im Ergebnisteil entnommen werden. Die OH-Gruppe am 5'-Ende des bDNA-Vorverstärkers wurde vor dem *Annealing* der bDNA-Reporter-Komponenten phosphoryliert (siehe Abschnitt 3.1.1).

3.4.4.2 Manuelle Durchführung der Analyse

Die zu messenden Ziel-Nukleinsäuren wurden zusammen mit den doppelsträngigen Reporter-Komponenten in 60 µl 5x SSC Puffer in drei Pumpschritten für insgesamt 15 min bei 37°C auf der Chipoberfläche hybridisiert. Anschließend wurden 100 U/ml T4 DNA Ligase in 40 oder 60 µl QLB bei 37°C für 5 min in der Reaktionskammer inkubiert. Die Zuführung der Reagenzien sowie das Waschen erfolgten mit einer Pumpgeschwindigkeit von 0,4 µl/s. Nachdem für 10 min bei 55°C mit NSP und für 2 min bei 37°C mit WP1 gewaschen worden war, wurden mit pAPB-Substratlösung bei 37°C und einer Pumpgeschwindigkeit von 0,8 µl/s die Sensorsignale mit der LockSpot-Methode erfasst.

3.4.4.3 Automatische Durchführung der Analyse

Variante 1

Bei der ersten Variante wurde in der Messkartusche das Reagenzienreservoir des Kanals 1 nicht verwendet. Die beiden übrigen Reservoirs wurden mit 100 U/ml T4 DNA Ligase in QLB (Kanal 2) und pAPB-Substratlösung (Kanal 3) befüllt. Als Systemflüssigkeit wurde NSP verwendet. Das Proberöhrchen enthielt 60 µl des gewählten Probepuffers mit den Ziel-Nukleinsäuren und den doppelsträngigen Esterase-Reporter-Komponenten.

Zur Steuerung des Auto-Readers wurden die Makrodateien dsSandwichVar1-10 μ l und dsSandwichVar1-60 μ l verwendet, die sich prinzipiell nur in den Parametern für die Probeninkubation unterscheiden. Bei der 10 μ l-Version wurden testweise nur etwa 10 μ l der Probelösung mit der Chipoberfläche in Kontakt gebracht, während bei der 60 μ l-Version ein möglichst großer Teil des Probengesamtvolumens für die Hybridisierung verwendet wurde. Wie bei der automatischen Durchführung der 4-Komponenten-Methode erfolgte das Aufziehen der Probe auf die Chipoberfläche und die Zuführung von Reagenzien aus den Reservoirien mit Pumpgeschwindigkeiten in einer Spanne von 2 - 5 μ l/s. Bei beiden Varianten wurde die Probelösung zunächst bei 37°C in vier Pumpschritten für insgesamt 15 min auf dem Array inkubiert. Anschließend wurde die Ligationslösung aus Kanal 2 in die Reaktionskammer gepumpt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei 37°C wurde für 5,5 min bei 55°C mit Systemflüssigkeit bei langsamer Pumpgeschwindigkeit (0,5 μ l/s) gewaschen. Schließlich wurden eine FlowStop-Kontrollmessung (Pumpgeschwindigkeit 4,8 μ l/s) und vier LockSpot-Messungen (Pumpgeschwindigkeit 6,1 μ l/s) mit der pAPB-Substratlösung aus Kanal 3 bei 35°C durchgeführt.

Variante 2

In einer anderen Variante wurden alle Reagenzienreservoirie der Messkartusche ausgenutzt. Kanal 1 wurde mit 100 U/ml T4 DNA Ligase in QLB, Kanal 2 mit NSP und Kanal 3 mit pAPB-Substratlösung befüllt. Wenn nicht anders angegeben, wurde als Systemflüssigkeit 1x SSC Puffer verwendet und die Ziel-Nukleinsäuren sowie die doppelsträngigen Esterase-Reporter-Komponenten wurden in 60 μ l 5x SSC Puffer mit 0,05% (v/v) Tween 20 im Proberöhrchen angesetzt.

Um die Bildung von Luftblasen in der Reaktionskammer bei Temperaturänderungen zu vermeiden, wurde der gesamte Assay isotherm bei 37°C durchgeführt. Unter Verwendung der zugehörigen Makrodatei (dsSandwichVar2) wurde die Probelösung auch bei dieser Variante in vier Schritten für insgesamt 15 min auf der Chipoberfläche inkubiert. Dabei erfolgte das Einziehen der Probe in die Chipkammer mit einer Pumpgeschwindigkeit von 2 μ l/s. Nachdem kurz mit Systemflüssigkeit (SF) gespült worden war, wurde die Ligationslösung mit einer Geschwindigkeit von 9,1 μ l/s aus Kanal 1 in die Reaktionskammer gepumpt. Nach 5 min Inkubationszeit wurde erneut kurz mit SF gewaschen, bevor der NSP mit einer Pumpgeschwindigkeit von 9,1 μ l/s aus Kanal 2 auf das Array gegeben und ebenfalls für 5 min inkubiert

wurde. Schließlich wurden weitere Spülschritte mit SF durchgeführt und die Sensorsignale in Gegenwart der pAPB-Substratlösung aus Kanal 3 erfasst. Dazu wurde entsprechend der Variante 1 zunächst eine FlowStop-Kontrollmessung durchgeführt und anschließend viermal mit der LockSpot-Methode gemessen.

3.4.4.4 Signalamplifikation mit bDNA

Die bDNA-Messungen wurden manuell mit der QuickLab-Apparatur durchgeführt. Die Ziel-Nukleinsäuren, je 5,5 nM doppelsträngige bDNA-Reporter-Komponenten und 1 mg/ml BSA wurden in 60 µl 5x SSC Puffer in drei Pumpschritten für insgesamt 15 min bei 37°C auf der Chipoberfläche inkubiert. Anschließend wurde für 5 min bei gleicher Temperatur mit 5x SSC Puffer gewaschen und 100 U/ml T4 DNA Ligase in 30 µl QLB in die Reaktionskammer geleitet. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei 37°C wurde für 10 min mit SDS-Niedrigsalzpuffer bei 65°C gewaschen. Nacheinander wurden dann bei 45°C 2 nM *Verstärkersonde* in 35 µl zugehöriger *Arbeitslösung* (VERSANT HBV bDNA 3.0 Assay), und 4 nM *markierte Sonde* in 30 µl *Diluent für markierte Sonde* (VERSANT HBV bDNA 3.0 Assay) für je 5 min auf der Chipoberfläche inkubiert. Die Reaktionskammer wurde für 1 min mit *Waschlösung A* (VERSANT HBV bDNA 3.0 Assay) bei 45°C gewaschen und anschließend mit pAPP-Substratlösung eine LockSpot-Referenzmessung bei 37°C durchgeführt. Nach weiteren 5 min Waschen mit *Waschlösung A* bei 45°C wurde mit der LockSpot-Methode bei 37°C gemessen. Analog zu den anderen Versuchen mit dem QuickLab-Gerät wurden alle Reagenzienwechsel und Waschschriffe bei einer Pumpgeschwindigkeit von 0,4 µl/s durchgeführt und die LockSpot-Messungen bei 0,8 µl/s. Bei der Auswertung der bDNA-Versuche wurde als SD-Multiplikator der Wert 1,3 verwendet.

3.5 Analyse biologischer Proben

3.5.1 Gewinnung von Probenmaterial

3.5.1.1 Spenderblut

Die Proben von Blutspendern wurden mit *PAXgene Blood RNA*-Röhrchen vom medizinischen Personal der Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Erlangen entnommen. Blutabnahme und Lagerung wurden nach der Anleitung des

zugehörigen Handbuchs von PreAnalytiX durchgeführt. Die im PAXgene-Röhrchen vorgelegte Lösung lysiert das Blut direkt nach der Entnahme und stabilisiert die intrazelluläre RNA bis zur weiteren Verarbeitung.

3.5.1.2 Patienten- und Kontrollproben

Die Gesamt-RNA-Extrakte von AMI-Patienten und zugehörigen Kontrollen wurden von der Arbeitsgruppe Meder vom Zentrum für Innere Medizin am Universitätsklinikum Heidelberg bezogen. Die RNA war dort aus *PAXgene Blood RNA*-Röhrchen nach dem in 3.5.2 beschriebenen Protokoll extrahiert worden.

3.5.2 Extraktionsmethode

Die Gesamt-RNA des lysierten Vollblutes wurde aus den PAXgene-Proben mit dem *microRNeasy Mini Kit* gewonnen, wie von Keller et al. beschrieben (Keller et al. 2009). Dazu wurde der Inhalt von zwei *PAXgene Blood RNA*-Röhrchen (Gesamtblutmenge 5 ml) bei Raumtemperatur (RT) für 10 min bei 5000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml Reinstwasser resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei gleichen Bedingungen wurde der Überstand wieder verworfen und das Pellet in 700 µl QIAzol Lysereagenz aufgenommen und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 140 µl Chloroform dazugegeben und der Ansatz für 15 s auf dem Vortexer vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 2-3 min bei RT wurde bei 14000 rpm für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Nur die obere wässrige Phase wurde vorsichtig entnommen, mit der 1,5-fachen Menge 100% Ethanol versetzt und portionsweise durch eine Spinsäule (*microRNeasy Mini Kit*) bei 13000 rpm und RT für je 15 s abzentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule nacheinander erst mit 700 µl Puffer RWT für 15 s, dann mit 500 µl Puffer RPL für 15 s und noch einmal mit 500 µl Puffer RPL für 2 min bei 13000 rpm und RT zentrifugiert. Nach Entfernen des letzten Durchlaufs wurde noch einmal für 1 min bei 13000 rpm und RT ohne vorherige Flüssigkeitszugabe zentrifugiert. Schließlich wurden 40 µl RNase-freies Wasser auf die Säule gegeben und die RNA bei einem letzten Zentrifugationsschritt für 1 min bei 13000 rpm und RT eluiert. Das Eluat wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -70°C bis -80°C gelagert.

3.5.3 Analyse der RNA-Extrakte

Die RNA-Konzentration in den extrahierten RNA-Proben wurde mit einem ND-1000 Spectrophotometer bestimmt. Zur Quantifizierung endogener miRNAs wurde ein automatischer Sandwich-Ligations-Assay nach Variante 2 durchgeführt, wobei die gewünschte Menge Gesamt-RNA und die Kontroll-RNA (miR-Alien1) als Ziel-Nukleinsäuren in der Probelösung eingesetzt wurden (siehe Abschnitt 3.4.4.3).

Bei Messungen, deren Ergebnisse mit durch qRT-PCR ermittelten Werten verglichen werden sollten, wurden zusätzlich Konzentrationsreihen mit synthetischen Ziel-miRNAs im Bereich von 1 bis 100 pM unter Verwendung von Chipmodulen derselben Immobilisierungscharge angefertigt. Mit Hilfe der Funktionsgleichungen der jeweils zugehörigen linearen Trendlinien wurden die gemessenen Konzentrationen der Ziel-Nukleinsäuren in der untersuchten Gesamt-RNA-Probe ermittelt.

4. Ergebnisse

Zu Beginn dieser Arbeit wurden die zugrunde gelegten Prinzipien, die als Voraussetzung für die Untersuchung verschiedener molekularbiologischer Konzepte zur hybridisierungsbasierten Detektion von miRNA dienen sollten, überprüft (Abschnitt 4.1).

Anschließend wurden zunächst zwei verschiedene ligations- und hybridisierungsbasierte Methoden zur Detektion kurzer miRNA-analoger DNA-Moleküle etabliert und genau untersucht (Abschnitt 4.2), beginnend mit der 3-Komponenten-Methode, einer molekularbiologischen Konstruktion aus drei Hybridisierungskomponenten und mit einer Ligationsstelle (Abschnitt 4.2.1). Da sich das Potenzial dieses Ansatzes als sehr limitiert herausstellte, wurde eine weitere Methode konstruiert, studiert und Schritt für Schritt optimiert (Abschnitt 4.2.2). Dieses als 4-Komponenten-Methode bezeichnete Detektionsverfahren basiert auf einem Hybridisierungskonstrukt aus vier Komponenten, das zwei Ligationsstellen aufweist. Im Zuge der Exploration dieser deutlich leistungsfähigeren Variante wurden auch die Herausforderungen bei der Verwendung einer RNA als Ziel-Nukleinsäure durchleuchtet und entsprechende Anpassungsmöglichkeiten analysiert (Abschnitt 4.2.2.3). Die resultierende Leistungsfähigkeit und Optimierbarkeit dieser Methode bei der miRNA-Detektion wurde anschließend ausführlich untersucht (Abschnitt 4.2.2.4 und 4.2.2.5).

Auf Grundlage der gesammelten Erkenntnisse wurde schließlich die Sandwich-Ligations-Methode als dritte Methode zur Detektion von miRNAs etabliert (Abschnitt 4.2.3). Diese Assay-Variante lieferte sehr gute Ergebnisse für Sensitivität (Abschnitt 4.2.3.2.1), Multiplexfähigkeit (Abschnitt 4.2.3.2.2) und Spezifität (Abschnitt 4.2.3.2.3), wobei die Sensitivität durch Integration von bDNA zur Signalamplifikation sogar noch erhöht werden konnte (Abschnitt 4.2.3.4).

Abschließend wurde die Anwendbarkeit der Sandwich-Ligations-Methode bei der Messung von endogener miRNA aus humanem Vollblut nachgewiesen (Abschnitt 4.3). Dazu wurde das Detektionssystem für ein Panel aus acht kardialen miRNAs optimiert (Abschnitt 4.3.1), zur Untersuchung von Spenderblut (Abschnitt 4.3.2.1) und AMI-Patientenblut (Abschnitt 4.3.2.3) eingesetzt und mit einer amplifikationsbasierten Standardmethode verglichen (Abschnitt 4.3.2.2).

4.1 Grundlegende Funktion des Messaufbaus und -prinzips

Die Detektion von Oligonukleotiden im Allgemeinen und von miRNAs im Speziellen basiert in der beschriebenen Arbeit auf bestimmten Grundverfahren und chemischen Vorgängen, deren Funktion zunächst anhand erster Versuche überprüft werden sollte. Dazu wurden verschiedene Fänger-Oligonukleotide auf den Sensoren der verwendeten CMOS-Chips immobilisiert (siehe Abschnitt 3.3.1), um einen 2-Komponenten-Assay durchführen zu können (Abbildung 13).

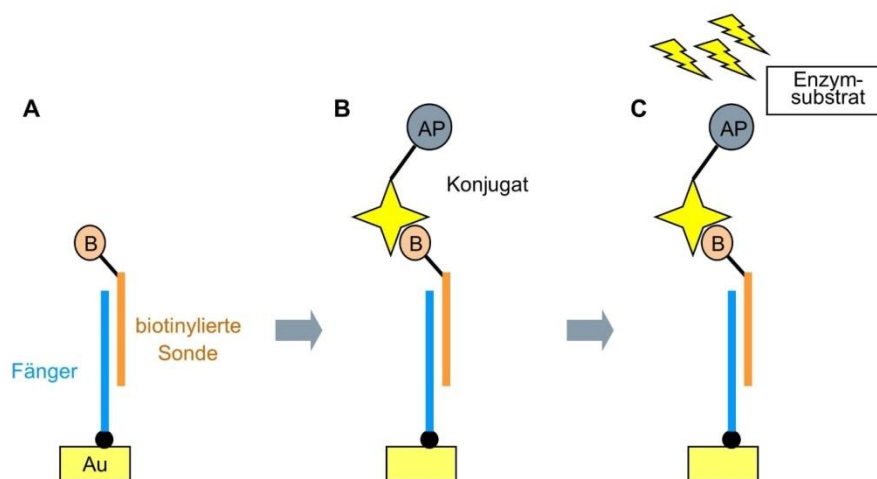


Abbildung 13: Schematische Darstellung eines 2-Komponenten-Hybridisierungsversuchs zum Test des Detektionsprinzips. Eine biotinylierte Sonde wird an einen komplementären immobilisierten Fängerstrang hybridisiert (A). Nach einem Waschschrift bindet das an Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelte Streptavidin an vorhandene Biotin-Moleküle (B). Nicht gebundenes Konjugat wird durch erneutes Waschen entfernt und das Enzymsubstrat pAPP zugeführt, das durch die Alkalische Phosphatase zu pAP umgesetzt wird. Durch Redox-Cycling an den interdigitalen Elektroden des Sensors findet eine zyklische, elektrochemische Umwandlung zwischen pAP und Chinonimin statt, die als Strom gemessen werden kann. Der zu beobachtende Anstieg des Stromflusses resultiert aus der enzymatischen Aktivität der Alkalischen Phosphatase und der dadurch bedingten Konzentrationserhöhung von pAP. B: Biotin; AP: Alkalische Phosphatase; Au: Goldelektrode.

4.1.1 Hybridisierung, Markierung und Messung biotinylierter DNA-Sonden

Zur Überprüfung der grundlegenden Messmethodik wurde zunächst eine 2-Komponenten-Hybridisierung mit der FlowStop-Messapparatur durchgeführt (Abbildung 13). Dabei wurden im ersten Schritt eine 10 nM-Lösung des biotinylierten Oligodesoxyribonukleotids (ODNs) Syn-T-21-bio mit den komplementären immobilisierten miR-21-Fängern (Fänger_21) hybridisiert (Abbildung 13A, Abbildung 14A). Nach Entfernung nicht gebundener Moleküle von der Chipoberfläche wurde das an das Ziel-ODN gekoppelte Biotin mit einem Streptavidin-AP-Konjugat markiert (Abbildung 13B). Bei anschließender Zugabe von Substratlösung wurde der durch Redox-Cycling des an der alkalischen Phosphatase entstandenen pAPs verursachte

Anstieg des Stromflusses gemessen (Abbildung 13C). Die Sensoren mit komplementären immobilisierten Fänger_21-ODNs zeigten einen Stromanstieg von 13,4 nA/s, während bei den Sensoren mit nicht komplementären Fängersequenzen Fänger_rnd und Fänger_96 nur sehr niedrige Steigungen von 0,310 nA/s und 0,093 nA/s gemessen wurden. Während der Durchführung des Assays wurde bei der Markierung des Biotins hybridisierter Ziel-Nukleinsäuren mit dem Streptavidin-AP-Konjugat auch das Biotin der Fänger_bio Positivkontrolle, einem 5'-immobilisierten DNA-Einzelstrang mit einem Biotin-Molekül am 3'-Ende, mit alkalischer Phosphatase gekoppelt. Daher zeigten die entsprechenden Sensoren ein deutliches Signal von 10,7 nA/s (Abbildung 15).

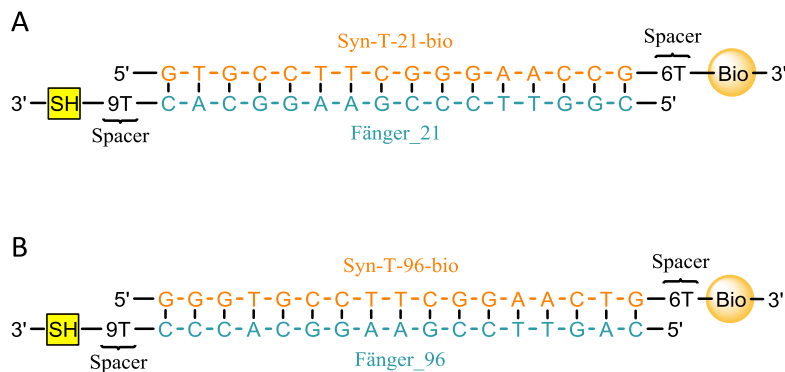


Abbildung 14: Oligodesign für die Messung biotinylierter Ziel-Nukleinsäuren. Es sind die Sequenzen zweier verschiedener Fänger-ODNs und der jeweils komplementären biotinylierten Sonden dargestellt. Die für die Immobilisierung der Fänger-ODNs benötigten Thiol-Gruppen (SH) sind durch einen Spacer aus neun Thymin-Basen (9T) von der funktionellen Sequenz getrennt, die Biotin-Moleküle folgen auf einen Spacer von 6 Thymin-Basen (6T). SH: Thiol-Gruppe; Bio: Biotin.

Um den eingebauten Chip auch für die zweite Messung verwenden zu können, wurde dieser zur Entfernung der hybridisierten Oligonukleotide mit 0,1 M NaOH gewaschen. Anschließend wurde ein anderes biotinyliertes Ziel-ODN Syn-T-96-bio (10 nM) nach dem gleichen Verfahren mit den miR-96-Fängern (Fänger_96) hybridisiert und gemessen (Abbildung 14B). Entsprechend zeigten die Fänger_96-Sensoren nun ein Signal von 12,4 nA/s, während die Sensoren mit nicht komplementären Fänger-ODNs eine leicht negative Steigung von -0,164 nA/s (Fänger_rnd) und -0,637 nA/s (Fänger_21) registrierten (Abbildung 15). Das Signal der Positivkontrolle (Fänger_bio) lag nach diesem zweiten Assay-Lauf bei 3,86 nA/s und damit um 64 % niedriger als nach dem ersten, da ein großer Teil der Biotin-Bindungsstellen bereits durch Streptavidin-AP-Konjugat aus dem ersten Durchgang blockiert war. Die zu diesem Zeitpunkt gekoppelte alkalische Phosphatase wurde

jedoch bei der Reinigung der Chipoberfläche mit NaOH denaturiert und war daher bei der Zweitverwendung des Chips inaktiv.

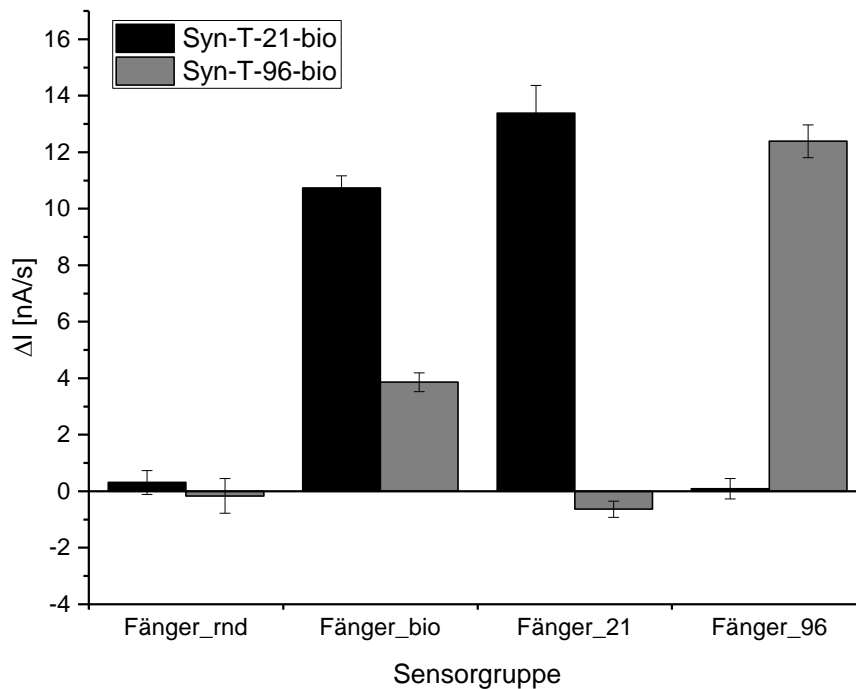


Abbildung 15: Je nach eingesetzter biotinylierter Nukleinsäure zeigen nur die Sensoren mit komplementären Fängern ein deutliches Signal ΔI . 10 nM Syn-T-21-bio wurden nach dem Protokoll für biotinylierte Sonden mit der 2-Komponenten-Methode hybridisiert und gemessen. Nach Reinigung der Chipoberfläche mit 0,1 M NaOH bei 40°C für 5 min wurde der Versuch mit 10 nM Syn-T-96-bio auf demselben CMOS-Chip wiederholt. Der verwendete Chip war bei der Immobilisierung der Einzelstränge nicht mit Harnstoff behandelt worden (siehe Abschnitt 3.3.1.3). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Signale ΔI aus je drei Wiederholungsmessungen für die Sensoren mit den angegebenen immobilisierten Fänger-ODNs nach Auswertung. Sensorpositionen: Fänger_rnd – Cluster 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 16; Fänger_bio – Cluster 2; Fänger_21 – Cluster 4, 8, 12; Fänger_96 – Cluster 6, 10, 14.

4.1.2 Detektion einer EST2-gekoppelten Sonde (Konzentrationsreihe)

Verwendet man anstelle eines biotinylierten Ziel-Oligonukleotids ein mit EST2 gekoppeltes Oligonukleotid, so benötigt man nach der Hybridisierung zur Detektion keinen zusätzlichen Markierungsschritt mehr. Dies verringert nicht nur die Dauer des Versuches, sondern vermeidet auch das Risiko unspezifischer Bindungen des Streptavidin-AP-Konjugates auf der Chipoberfläche und den damit verbundenen Anstieg des Hintergrundsignals. Als Substrat wurde para-Aminophenylbutyrat (pAPB) verwendet, das vom EST2-Enzym zu pAP umgesetzt wird. Im folgenden Versuch wurde ein EST2-gekoppeltes Reporter-ODN (EST2-Ra11) in steigenden Konzentrationen von 1 pM – 100 nM nacheinander auf demselben Chip mit einem komplementären Fänger-ODN hybridisiert und gemessen. Zwischen den einzelnen

Hybridisierungsschritten wurde der EST2-Reporter nicht abgeschmolzen, so dass die tatsächliche Gesamtkonzentration 1 pM, 11 pM, 111 pM, usw. betrug. Aufgrund der milden Waschbedingungen war ein mit der Konzentration des eingesetzten Reporter-ODNs ansteigendes Hintergrundsignal auf den leeren Kontroll-Sensorpositionen zu messen. Um diesen Effekt auszugleichen und um negative Werte bei sehr niedrigen Konzentrationen zu korrigieren, wurde dieses Hintergrundsignal von den jeweiligen Messwerten subtrahiert. Abbildung 16 zeigt das Ergebnis aus dieser Messreihe. Die Basislinie stellt einen Kontrollwert dar, der zu Beginn des Versuches komplett ohne EST2-Reporter-ODN gemessen und ermittelt wurde.

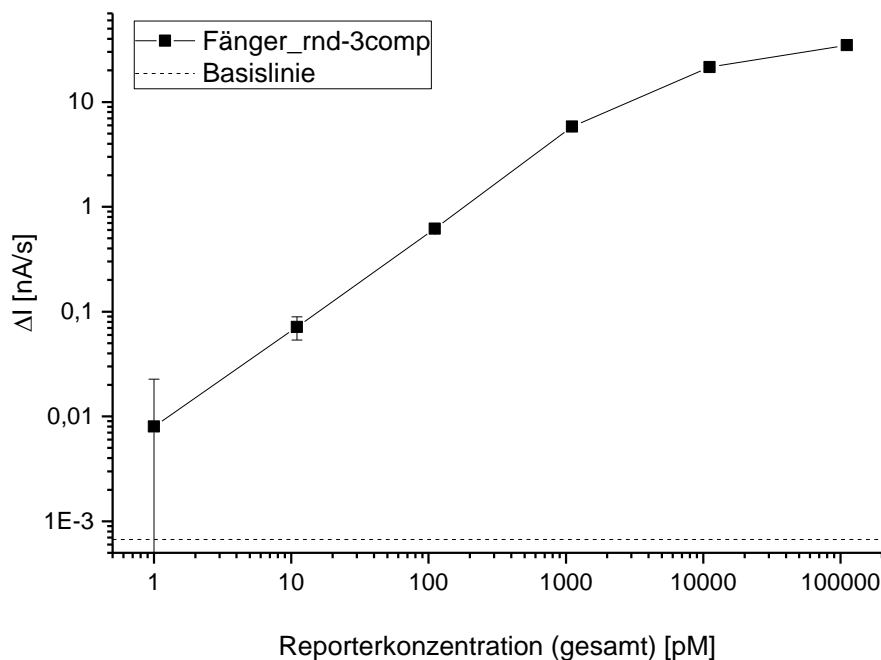


Abbildung 16: Eine 2-Komponenten-Konzentrationsreihe mit einem Esterase-Konjugat zeigt eine gute Dynamik des Messsystems. Auf einem CMOS-Chip wurden 0 M, 1 pM, 10 pM, 100 pM, 1 nM, 10 nM und 100 nM EST2-Ra11 hintereinander mit der 2-Komponenten-Methode (LockSpot) hybridisiert und gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen für die Signale der Sensoren mit dem angegebenen immobilisierten Fänger-ODN (Immobilisierungskonzentration 5 μ M) nach Auswertung, korrigiert um die Signale der ausgewerteten Sensorpositionen ohne immobilisierte Nukleinsäure, in Abhängigkeit von der eingesetzten Konjugatkonzentration. Die Basislinie repräsentiert den entsprechenden Mittelwert für den Versuchsdurchlauf ohne Konjugat (0 M), der zu Beginn der Messreihe ermittelt worden war. Für jede Konzentration wurden die Werte aus einer Messung für folgende Sensorpositionen ausgewertet: c-Neg – Cluster 9; Leerkontrolle – Cluster 8, 10.

Von 1 pM bis 1,1 nM Konjugat-Konzentration zeigt die Kurve einen fast linearen Anstieg und damit den Bereich mit der größten Messdynamik. Die Werte liegen in diesem Bereich zwischen 0,008 nA/s (1 pM) und 5,81 nA/s (1,1 nM). Zwischen 1,1 nM und 11 nM flacht die Kurve zunächst schwach und anschließend stark ab. Bei

0,1 μM Reporter-ODN-Konzentration ist mit einem Signal von 34,8 nA/s eine weitgehende Sättigung der immobilisierten Fänger-ODNs auf den Sensoren erreicht.

Da die Standardabweichung der Messwerte bei 1 pM bereits die Basislinie überschneidet, ist die Messung noch geringerer Konzentrationen nicht möglich.

4.2 Etablierung einer leistungsfähigen Methode zur Detektion von miRNA

Bei der quantitativen Detektion mehrerer kleiner endogener Ziel-Nukleinsäuren im Multiplexformat müssen einige Anforderungen erfüllt werden, die bei den 2-Komponenten-Assays noch nicht berücksichtigt werden mussten. Zunächst sind die zu detektierenden Nukleinsäuren nicht markiert, d.h. sie sind weder mit Biotin noch mit einem Reporterenzym wie alkalischer Phosphatase oder Esterase 2 gekoppelt. Da eine Zielsetzung dieser Arbeit die direkte Analyse nicht vormarkierter miRNA war, musste ein Reporter-Oligonukleotid eingeführt werden, das abhängig von der Präsenz der Ziel-Nukleinsäure beim zugehörigen Sensor spezifisch bindet. Der Einsatz einer EST2-gekoppelten Reporter-Nukleinsäure bietet nicht nur den Vorteil, dass beim Assay ein zusätzlicher Markierungsschritt entfällt (siehe Abschnitt 4.1.2), sondern ermöglicht auch Waschschrte bei erhöhten Temperaturen, da es sich bei diesem Enzym um ein thermostabiles Protein handelt (Manco *et al.* 1998). Nachteilig wirkte sich jedoch die geringere Verfügbarkeit EST2-gekoppelter Oligonukleotide aus, die nicht wie biotinylierte Nukleinsäuren für jede beliebige Nukleotidsequenz kommerziell verfügbar sind, sondern unter großem Aufwand in Speziallabors einzeln synthetisiert werden mussten (siehe Abschnitt 3.1.3). Auch im Hinblick auf einen späteren breiten Einsatz des Messsystems bei gleichzeitig geringen Kosten wird daher die Möglichkeit der Verwendung eines generischen EST2-Reporter-Oligonukleotids für die Detektion aller in Frage kommenden Ziel-Nukleinsäuren bei der Entwicklung der Methode vorausgesetzt.

4.2.1 3-Komponenten-Methode

Die erste getestete Methode basiert auf der ligationsvermittelten spezifischen Verlängerung des von einem Fänger-ODN gebundenen Reporter-Oligonukleotids

durch die anwesende Ziel-Nukleinsäure (Abbildung 17A). Der so entstandene Doppelstrang weist eine höhere Schmelztemperatur auf, als der aus nicht ligiertem Reporter- und Fänger-ODN, welcher bei Abwesenheit der Ziel-Nukleinsäure gebildet wird (Abbildung 17B). Durch stringentes Waschen bei einer Temperatur, die zwischen diesen beiden Schmelztemperaturen liegt, sollte das nicht ligierte Reporter-ODN anschließend vom komplementären Fänger-ODN abgeschmolzen werden, während das Ligationsprodukt aus Reporter-ODN und Ziel-Nukleinsäure mit dem zugehörigen Fänger-ODN hybridisiert bleibt.

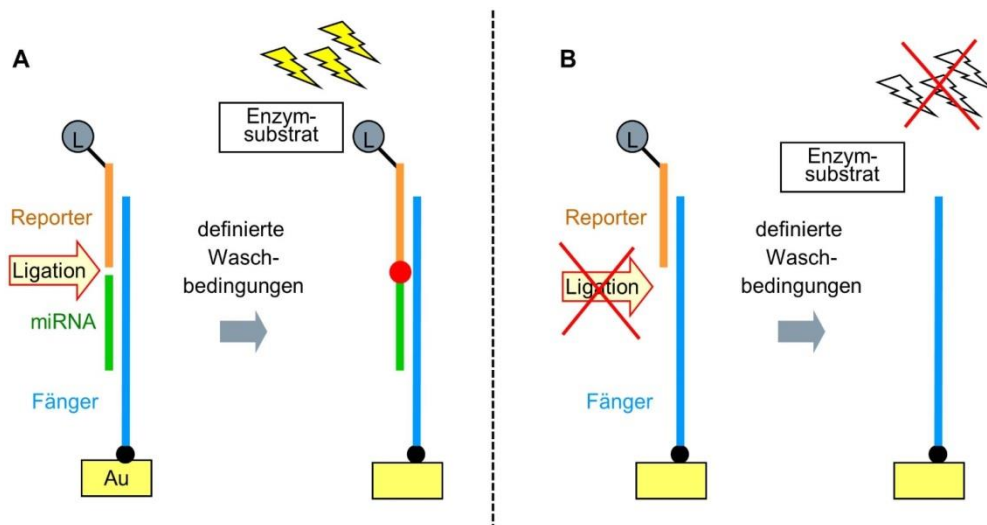


Abbildung 17: Schematische Darstellung des Prinzips der 3-Komponenten-Methode zur Detektion von miRNAs. A: Die komplementäre miRNA ist vorhanden, hybridisiert am immobilisierten Fänger-ODN und wird mit dem benachbarten ebenfalls hybridisierten Reporter-Konjugat ligiert. Die Schmelztemperatur des daraus entstehenden verlängerten Reporter-Moleküls ist hoch genug, um ein Abschmelzen vom Fänger-ODN beim anschließenden Waschschritt zu verhindern. B: Ist keine passende Ziel-Nukleinsäure vorhanden, findet keine Ligation am entsprechenden Fänger-ODN statt und das kurze, hybridisierte Reporter-Konjugat wird durch den Waschschritt vor der Messung der Signale entfernt. L: Label, EST2; Enzymsubstrat: pAPB; Au: Goldelektrode.

4.2.1.1 Oligo-Design

Als Grundsequenz für das Reporter-ODN wurde eine Abfolge von 15 Basen gewählt, die im Transkriptom menschlicher Zellen nicht natürlich vorkommt – eine sogenannte *Alien*-Sequenz (Ra15). Dazu wurde eine Basissequenz aus einer Siemens-internen Liste mit längeren *Alien*-Sequenzen ausgewählt, gekürzt und die resultierende Basenfolge per *blastn* Algorithmus mit der Homo Sapiens RefSeq_RNA Datenbank abgeglichen (Altschul *et al.* 1997). Zusätzlich wurden noch kürzere Varianten dieses Reporter-Konjugats mit 13 und 11 Basen synthetisiert, um auch Varianten mit veränderter Schmelztemperatur einsetzen zu können. Damit bei Austausch des verwendeten Konjugats nicht auch das Fänger-ODN verändert werden musste,

wurden 3-Komponenten-Fänger-ODNs designt, die am 5'-Ende aus der Komplementärsequenz zum gesamten 15-mer Reporter-Oligonukleotid bestanden. Bei Verwendung des kürzeren R11-Konjugats (EST2-Ra11) entstand daher bei der Bildung des Hybridisierungskonstrukts (Abbildung 17) ein Überhang am 5'-Ende des immobilisierten Fänger-ODNs (Abbildung 18). In 3'-Richtung schloss sich an die *antisense*-Reportersequenz direkt der Bindungsbereich für die Ziel-Nukleinsäure an, um durch die Hybridisierung deren 3'-OH-Ende für die Ligation in direkter Nachbarschaft zum 5'-Phosphat-Ende des Reporter-Konjugats zu positionieren. Die Thiol-Gruppe für die Immobilisierung des Fänger-ODNs auf den Gold-Elektroden wurde durch einen Spacer aus sechs Thymin-Basen räumlich vom Hybridisierungsbereich getrennt, um sterische Hinderungen zu vermeiden.

Da bei vielen in dieser Arbeit getesteten Detektionsmodellen ein effektives Abschmelzen von überschüssigem Reporter-Konjugat essentiell war, wurde für die gezeigten Experimente die kurze Variante EST2-Ra11 gewählt, welche deshalb in den Abbildungen zum Oligo-Design dargestellt ist.



Abbildung 18: Oligodesign für die Detektion von miDNA-96 mit der 3-Komponenten-Methode. Die Sequenzen der verwendeten Komponenten und der Ziel-Nukleinsäure sind in Form des konzeptionellen Hybridisierungskonstruktes dargestellt. Die Spacer bestehen aus der angegebenen Anzahl an Thymin-Basen. Der Überhang am 5'-Ende des Fänger-ODNs ermöglicht die alternative Verwendung eines 15-mer Reporter-Konjugats. EST2: Esterase 2; PO₄: Phosphat-Gruppe; SH: Thiol-Gruppe.

4.2.1.2 Test des Detektionsprinzips

Zum Test der Leistungsfähigkeit des 3-Komponenten-Messprinzips wurde eine Konzentrationsreihe einer Ziel-Nukleinsäure miDNA-96 – einem miR-96 DNA-Analogon – gemessen. Dabei wurden im kombinierten Hybridisierungs- und Ligationsschritt immer 250 nM EST2-Ra11 als Reporter-Konjugat und 100 U/ml T4 DNA Ligase eingesetzt. Für das Abschmelzen des nicht ligierten Reporters mit Waschpuffer (WP1) wurde eine Temperatur von 55 °C gewählt, bei der die thermostabile Esterase 2 noch nicht geschädigt wird (Daten nicht gezeigt) (Manco *et al.* 1998). Wie in Abschnitt 4.1.2 beschrieben wurden die einzelnen Konzentrationen

ohne zwischengeschalteten Reinigungsschritt hintereinander auf einem CMOS-Chip gemessen. Als Kontrollen dienten Sensoren ohne immobilisierte Fänger-ODNs (SP) und solche mit einer zufälligen Nukleotidsequenz in dem Bereich der Fänger-ODNs, der normalerweise spezifisch für die Hybridisierung mit der Ziel-Nukleinsäure ist (Fänger_rnd-3comp). Beim Vergleich dieser beiden Kontrollen war zu erkennen, dass mit diesem Ansatz nur ein unvollständiges Abschmelzen des hybridisierten, aber nicht ligierten Reporter-ODNs möglich war. So zeigten die Fänger_rnd-3comp-Sensoren nach dem 55°C-Waschschrift noch ein Restsignal von 3,54 nA/s bis 7,30 nA/s, während die Leer-Sensoren SP deutlich niedrigere Steigungen von 0,262 nA/s bis 0,594 nA/s aufwiesen (Abbildung 19). Daher stieg das Signal an den Fänger_96-3comp-Sensoren bei der Konzentrationskurve für miDNA-96 trotz Konzentrationssteigerung um zwei Dekaden von 1 pM auf 100 pM nur um weniger als 50% von 6,62 nA/s (1 pM) auf 9,31 nA/s (111 pM). Im oberen Abschnitt der Kurve wurden Positivsignale von 16,5 nA/s bei 1 nM miDNA-96 und 44,8 nA/s bei 11 nM gemessen, was einem etwas steileren Kurvenverlauf, aber dennoch nur einer mäßigen Messdynamik entspricht.

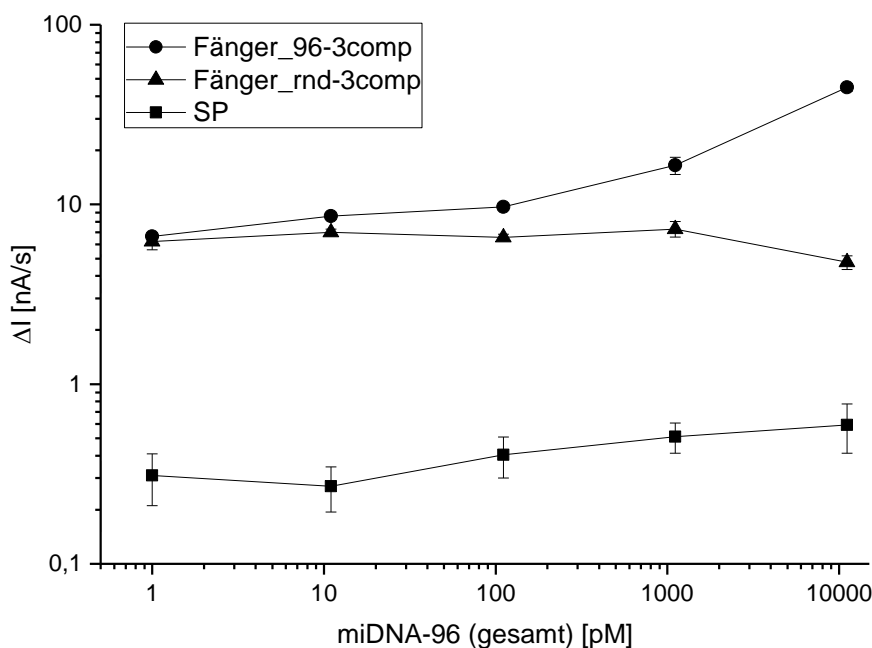


Abbildung 19: Messung einer Konzentrationsreihe für die Detektion von miDNA-96 mit der 3-Komponenten-Methode. Es wurde eine Konzentrationsreihe für die Ziel-Nukleinsäure miDNA-96 auf einem CMOS-Chip mit der 3-Komponenten-Methode durchgeführt. Die ausgewerteten Mittelwerte und Standardabweichungen der Sensorsignale ΔI von je einer Messung sind in Abhängigkeit von der miDNA-96-Konzentration für zwei Sensorgruppen mit unterschiedlichen immobilisierten Fänger-ODNs (Fänger_96-3comp, Fänger_rnd-3comp; Immobilisierungskonzentration 5 μ M) und eine Kontrollgruppe ohne immobilisierte Nukleinsäure (SP) dargestellt. Sensorpositionen: SP – Cluster 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16; Fänger_96-3comp – Cluster 3; Fänger_rnd-3comp – Cluster 11.

Um die Effektivität des Abschmelzens nicht ligierter Reporter-Stränge zu erhöhen, ohne dabei das Reporterenzym zu denaturieren, wurde im Folgenden ein Puffer mit besonders niedriger Salzkonzentration (NSP) eingesetzt. Zusätzlich wurde die Menge des eingesetzten EST2-Konjugats auf 100 nM reduziert. Da eine Kombination aus hoher Temperatur und dem Puffer NSP jedoch auch zum Verlust des ligierten Reporters führen könnte, wurde eine Schmelzkurve angefertigt, die der Ermittlung der optimalen Waschtemperatur dienen sollte. Anhand dieser Kurve konnte der Verlauf des Positiv- und Negativsignals für 100 nM eingesetzte Ziel-Nukleinsäure miDNA-96 nach Waschen mit ansteigender Dauer oder Temperatur verglichen werden. Ab einer Waschtemperatur von 48 °C brach das Positivsignal deutlich ein und fiel nach einer Gesamtwaschdauer von 20 min (bei 48 °C) von 90,4 nA/s auf 22,4 nA/s (Abbildung 20A).

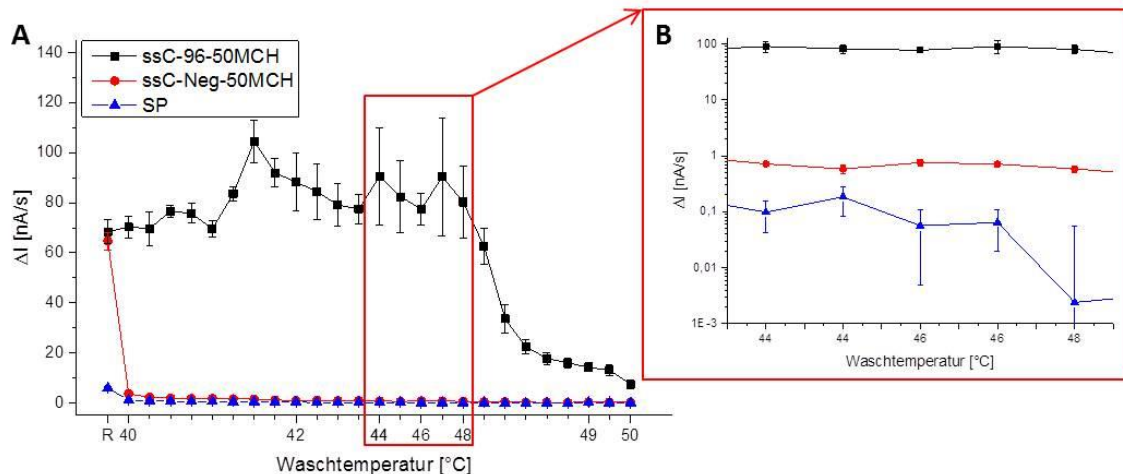


Abbildung 20: Abschmelzen des ligierten und nicht ligierten Reporter-Konjugats von den entsprechenden Fänger-ODNs (3-Komponenten-Methode). Je 100 nM miDNA-96 und EST2-Ra11 wurden auf einem CMOS-Chip hybridisiert und ligiert. Es wurde immer abwechselnd für 5 min bei gleichbleibender oder steigender Temperatur mit NSP gewaschen und eine zugehörige Messung durchgeführt. A: Die ausgewerteten Mittelwerte und Standardabweichungen der Sensorsignale ΔI von je einer Messung sind für zwei Sensorgruppen mit unterschiedlichen immobilisierten Fänger-ODNs (Fänger_96-3comp, Fänger_rnd-3comp; Immobilisierungskonzentration 5 μ M) und eine Kontrollgruppe ohne immobilisierte Nukleinsäure (SP) chronologisch dargestellt. Die Abszisse indiziert die der Messung vorausgegangene Waschtemperatur beginnend mit einer Referenzmessung R, die vor dem ersten stringenten Waschschrift durchgeführt worden war. B: Die vergrößerte Darstellung des rot eingerahmten Ausschnitts mit logarithmischer Skalierung der Ordinate liefert eine detailliertere Ansicht der Messwerte vor Einbruch des Positivsignals (Fänger_96-comp). Sensorpositionen: SP – Cluster 10, 12; Fänger_96-comp – Cluster 3; Fänger_rnd-3comp – Cluster 11.

Bei 46 °C Waschtemperatur lieferten die Fänger_rnd-3comp-Sensoren jedoch noch ein Negativsignal von 0,713 nA/s, was 0,8 % des Positivsignals der eingesetzten miDNA-96-Konzentration von 100 nM entsprach (Abbildung 20B). Da ein so geringer Signalunterschied zwischen Negativkontrolle und gemessener Ziel-Nukleinsäure bei

hoher Ausgangskonzentration (100 nM) keine signifikanten, quantitativen Messungen erlaubt, wurde die 3-Komponenten-Methode in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

4.2.2 4-Komponenten-Methode

Pöhlmann und Sprinzl haben gezeigt, dass man miRNAs mit Hilfe einer sogenannten Lückenhybridisierung detektieren und quantifizieren kann (Pöhlmann and Sprinzl 2010). Dabei wird ein instabiles Konstrukt aus einem Fänger-, einem Gegenstrang- und einem Reporter-Oligonukleotid durch eine genau zwischen Fänger und Reporter passende Ziel-Nukleinsäure stabilisiert, wodurch eine energetische Diskriminierung zwischen An- und Abwesenheit der Ziel-Nukleinsäure ermöglicht wird. Da endogene miRNAs eine Phosphatgruppe am 5'-Ende aufweisen, ist es ohne zusätzlichen Vorbereitungsschritt möglich, eine so hybridisierte Ziel-miRNA auf beiden Seiten mit den im Assay zugegebenen Nukleinsäuren zu ligieren (Friedrich *et al.* 2013). Dies führt zu einer kovalenten Bindung des Reporter-Oligonukleotids an das immobilisierte Fänger-Oligonukleotid und ermöglicht so ein Waschen des Sensorarrays bei hohen Temperaturen oder niedriger Salzkonzentration ohne Verlust des spezifischen Signals (Abbildung 21). Auf diese Weise sollten hohe Konzentrationen des thermostabilen EST2-Reporters für die Ligation eingesetzt und später wieder effektiv entfernt werden, um eine schnelle und sensitive Detektion zu realisieren.

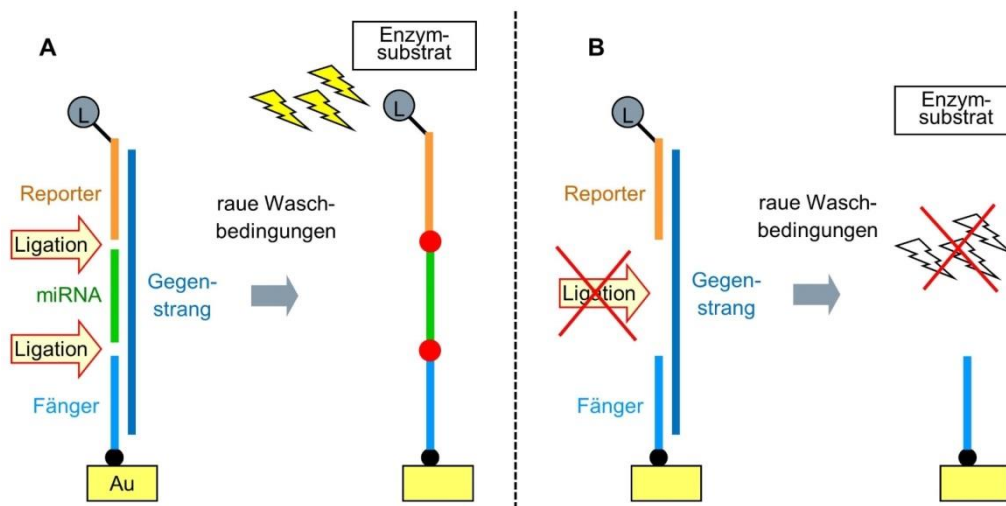


Abbildung 21: Schematische Darstellung des Grundprinzips der 4-Komponenten-Methode. A: Ein Gegenstrang vermittelt die Bildung eines Hybridisierungskonstrukts, das die beidseitige Ligation der Ziel-Nukleinsäure als Verbindungsstück zwischen Reporter-Konjugat und immobilisiertem Fänger-Oligonukleotid ermöglicht. Das durch die Ligation kovalent an das Fänger-Oligonukleotid gebundene Reporterenzym wird auch bei rauen Waschbedingungen nicht von der Sensoroberfläche getrennt. B: In Abwesenheit der passenden Ziel-Nukleinsäure findet keine Ligation statt und das hybridisierte Reporter-Konjugat wird durch den Waschschrift vor der Messung entfernt. L: Label, EST2; Enzymsubstrat: pAPB; Au: Goldelektrode.

4.2.2.1 Oligo-Design

Bei der 4-Komponenten-Methode konnte die Sequenz des Fänger-Oligonukleotids unabhängig von der Sequenz der Ziel-Nukleinsäure gewählt werden. Die Spezifität für eine Zielsequenz wird durch das Design des Gegenstrangs bestimmt (Abbildung 21). Um einerseits die Hybridisierung der Gegenstränge an die Fänger-Oligonukleotide unter an die Ziel-Nukleinsäure angepassten Hybridisierungsbedingungen zu ermöglichen und andererseits die Option eines späteren Abschmelzens überschüssiger Gegenstränge zu erhalten, wurden Fängersequenzen mit Längen von 16-20 Basen konstruiert. An den Bindungsbereich für den zugehörigen Fänger am 3'-Ende des Gegenstrang-ODNs schloss sich in 5'-Richtung direkt die Komplementärsequenz zur Ziel- und danach die zur Reporter-Nukleinsäure an (Abbildung 22). Dadurch sollte bei der Bildung des Hybridisierungskonstrukts an beiden Enden der passenden miRNA je eine Ligationsstelle aus einer 3'-OH- und einer 5'-Phosphat-Gruppe entstehen.

Einige wenige Versuche zur 4-Komponenten-Methode wurden mit einem alternativen EST2-Reporter-Konjugat (EST2-Rb15) durchgeführt, dessen Oligonukleotidsequenz von einer alternativen *Alien*-Sequenz (Rb15) gebildet wurde. Die verwendeten Gegenstränge wurden dabei entsprechend angepasst (Tabelle 3).

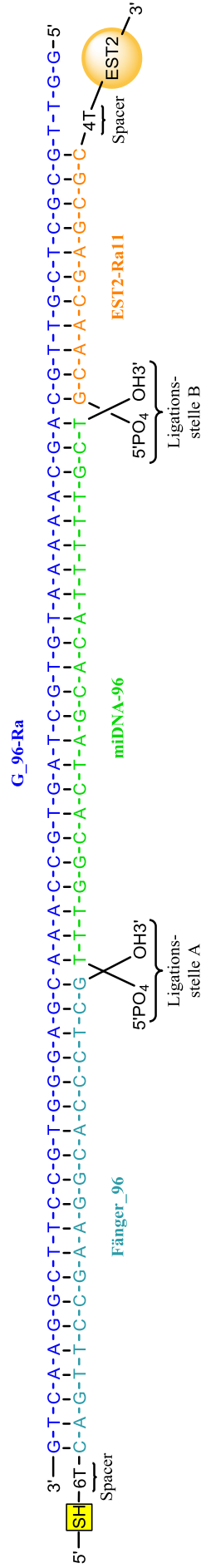


Abbildung 22: Oligodesign für die Detektion mit der 4-Komponenten-Methode am Beispiel der Ziel-Nukleinsäure miDNA-96. Die Sequenzen des Fänger-ODNs Fänger_96, des Gegenstrang-ODNs G_96-Ra, des generischen Reporter-Konjugats EST2-Ra11 und der Ziel-Nukleinsäure miDNA-96 sind in Form des konzeptionellen Hybridisierungskonstrukts dargestellt. Die Spacer bestehen aus der angegebenen Anzahl an Thymin-Basen. Der Überhang am 5'-Ende des Gegenstrang-ODNs ermöglicht die alternative Verwendung eines längeren Reporter-Konjugats. Die funktionellen Gruppen der zu ligierenden Nukleinsäure-Enden sind als Ligationstellen A und B gekennzeichnet. EST2: Esterase 2; PO₄: Phosphat-Gruppe; SH: Thiol-Gruppe.

4.2.2.2 Etablierung des Messprinzips mit DNA als Ziel-Nukleinsäure

4.2.2.2.1 1-Schritt-Variante

Zur Einschätzung der Leistungsfähigkeit des Messprinzips wurde eine Konzentrationsreihe mit miDNA-96 als Ziel-Nukleinsäure durchgeführt. Nach Hybridisierung und Ligation der Assay-Komponenten wurde mit Niedrigsalzpuffer (2 mM) gewaschen und anschließend unter Substratzugabe das Sensorsignal ausgelesen. Wie bei der 2-Komponenten-Messreihe (siehe Abschnitt 4.1.2) wurden steigende Konzentrationen von 1 pM – 100 nM hintereinander auf einem CMOS-Chip gemessen. Im Vergleich zur 3-Komponenten-Methode zeigte die so erhaltene Kurve einen deutlich steileren Verlauf mit größerem dynamischen Messbereich (Abbildung 23). Von 100 pM bis 10 nM konnte eine weitgehend lineare Zunahme der Steigung ΔI erzielt werden, bei dem zwei Dekaden des Konzentrationsbereichs auf fast zwei Dekaden Signalstärke abgebildet wurden (111 pM: 1,59 nA/s, 1,1 nM: 10,6 nA/s, 11 nM; 65,5 nA/s). Anschließend flachte die Kurve stark ab und ergab bei Erhöhung der Konzentration der Ziel-Nukleinsäure um eine weitere Dekade nur noch eine Steigerung des Signals um 14 % auf 74,9 nA/s (111 nM).

Der entscheidende Unterschied zur Leistungsfähigkeit des einfachen 2-Komponenten-Assays war jedoch die starke Abflachung der Kurve unterhalb von 100 pM miDNA-96-Konzentration. Offenbar erfolgte das Entfernen nicht ligierter und unspezifisch gebundener Reporter-ODNs auch bei hoher Temperatur und niedriger Ionenstärke nur unzureichend, weshalb auch Sensoren ohne immobilisierte Fänger-ODNs und solche, deren Ziel-Nukleinsäure in der Probe nicht anwesend war (Abbildung 21B), ein relativ hohes Signal aufwiesen (Abbildung 23; SP: 0,29 – 0,72 nA/s, ssC-21: 0,33 – 1,58 nA/s).

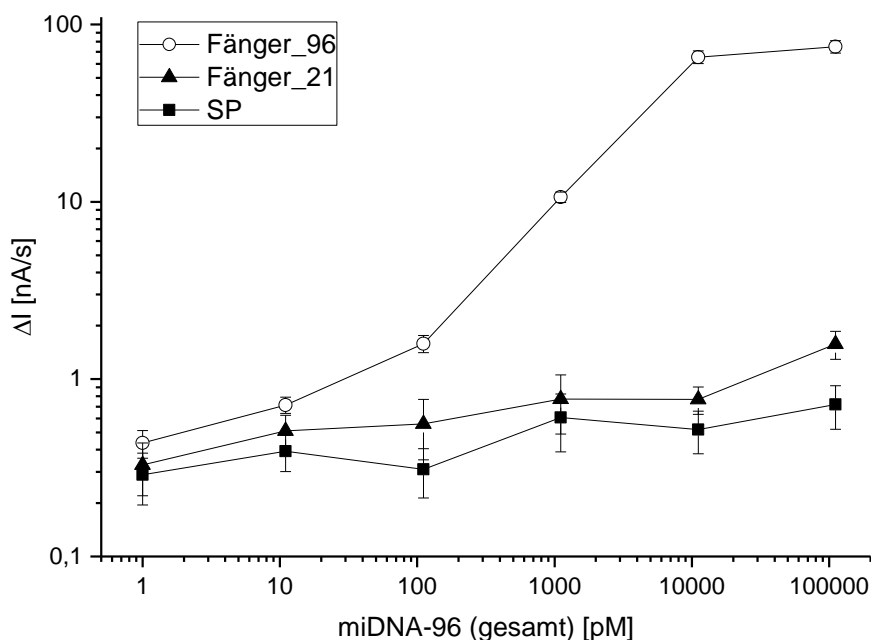


Abbildung 23: Messung einer 4-Komponenten Konzentrationsreihe für die Ziel-Nukleinsäure miD-96. Es wurde eine Konzentrationsreihe für die Ziel-Nukleinsäure miDNA-96 auf einem CMOS-Chip mit der 1-Schritt-Variante der 4-Komponenten-Methode durchgeführt. Als Gegenstränge wurden G_96-Ra und G_21-Ra eingesetzt. Die ausgewerteten Mittelwerte und Standardabweichungen der Sensorsignale ΔI von je drei Wiederholungsmessungen pro Konzentration sind in Abhängigkeit von der miDNA-96-Konzentration für zwei Sensorgruppen mit unterschiedlichen immobilisierten Fänger-ODNs (Fänger_96, Fänger_21) und eine Kontrollgruppe ohne immobilisierte Nukleinsäure (SP) dargestellt. Sensorpositionen: SP – Cluster 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 16; Fänger_96 – Cluster 10; Fänger_21 – Cluster 14.

4.2.2.2.2 2-Schritte-Variante

Zusätzlich zur Sensitivität spielt auch die Spezifität einer Detektionsmethode eine sehr wichtige Rolle. Daher wurden Messungen durchgeführt, bei denen keine passende Ziel-Nukleinsäure miDNA-96 in der Hybridisierungslösung vorhanden war, sondern stattdessen eine hohe Konzentration (10 μM) eines wenig komplementären miRNA-DNA-Analogons miDNA-21 (Tabelle 2). Bei Hybridisierung und Ligation in einem gemeinsamen Schritt, war das Signal an den Sensoren der miDNA-96-Fänger trotz der großen Sequenzunterschiede sehr hoch (Abbildung 24; 7,83 nA/s). Zur Verbesserung der Spezifität der 4-Komponenten-Detektionsmethode wurden daher im Folgenden Hybridisierung und Ligation der Assay-Komponenten in getrennten Schritten durchgeführt. Diese Variante bot nicht nur die Möglichkeit unspezifisch gebundene Nukleinsäuren vor Beginn der Ligation zu entfernen, sondern erlaubte auch die Anhebung der Hybridisierungstemperatur in Bereiche oberhalb von 37 °C, der optimalen Aktivitätstemperatur der T4 DNA Ligase (Ferretti and Sgaramella

1981). Die Durchführung dieser 2-Schritte-Variante mit einer Hybridisierungstemperatur von 42°C verringerte das unspezifische Signal um etwa eine Größenordnung auf 0,57 nA/s (Abbildung 24). Gleichzeitig wurde das Positivsignal nicht signifikant verändert (10 nM miDNA-96: 52,6±2,55 nA/s; nicht gezeigt).

Tabelle 2: Sequenzen der miRNA-DNA-Analoga miDNA-21 und miDNA-96. Die Basen stimmen nur an wenigen Stellen überein (rot) und die Sequenzen haben unterschiedliche Längen.

Ziel-DNA	Sequenz (5'→3')
miDNA-21	Phosphat-TAG CTT ATC AGA CTG ATG TTTG A
miDNA-96	Phosphat-TTT GGC ACT AGC ACA TTT TTTG CT

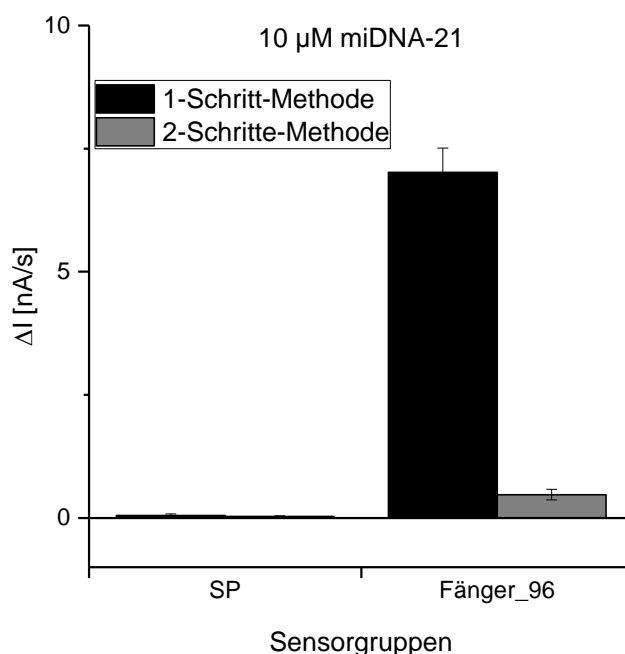


Abbildung 24: Reduktion des Negativsignals bei Anwesenheit eines großen Überschusses einer nicht komplementären Nukleinsäure in der Probelösung durch Einführung der 2-Schritte-Variante der 4-Komponenten-Methode. In der modularen LockSpot-Apparatur wurde je ein Versuch mit der 1-Schritt-Variante und einer mit der 2-Schritte-Variante auf CMOS-Chips derselben Immobilisierungscharge durchgeführt. Die Probelösung enthielt bei beiden Durchläufen als Gegenstrang nur G_96-Ra und als nicht komplementäre Ziel-Nukleinsäure 10 μM miDNA-21. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus je einer Messung für eine Sensorgruppe mit den zum eingesetzten Gegenstrang gehörigen Fänger-Oligonukleotiden Fänger_96 und eine Kontrollgruppe ohne immobilisierte Fänger (SP) nach Auswertung. Sensorpositionen: SP – Cluster 1, 2, 4, 6, 8, 9, 11, 13, 15, 16; Fänger_96 – Cluster 5, 7.

4.2.2.2.3 3-Schritte-Variante

Zur Reduktion der nach wie vor hohen Hintergrundsignale, die bei der 2-Schritte-Variante der 4-Komponenten-Methode auftraten (Abbildung 27B), wurde eine weitere

Version des Assays evaluiert. Bei dieser sollte die Zahl der Reporter-Konjugate, die an Fänger-Oligonukleotide ohne Ziel-Nukleinsäure binden, durch einen zusätzlich eingefügten stringenten Waschschrift reduziert werden (Abbildung 25). Dazu wurde der Reporter während der ersten beiden Assay-Schritte (Hybridisierung und Ligation) noch nicht auf den CMOS-Chip gegeben, sodass zunächst ein unvollständiges Konstrukt aus Gegenstrang und bei Anwesenheit der Ziel-Nukleinsäure durch Ligation verlängertem Fänger-Oligonukleotid entstand (Abbildung 25B). An nicht ligierte Fänger-Oligonukleotide gebundene Gegenstränge sollten anschließend in einem ersten stringenten Waschschrift weitgehend entfernt werden, während mit der Ziel-Nukleinsäure ligierte Fänger-Oligonukleotide aufgrund der höheren Schmelztemperatur mit den zugehörigen Gegensträngen verbunden bleiben. Im dritten Schritt sollte der EST2-Reporter an die noch vorhandenen Gegenstränge binden und mit den Ziel-Nukleinsäuren ligiert werden (Abbildung 25C). In einem zweiten Waschschrift sollten bei extremen Bedingungen schließlich alle Moleküle, die nicht kovalent an die immobilisierten Fänger-Oligonukleotide gebunden waren entfernt werden.

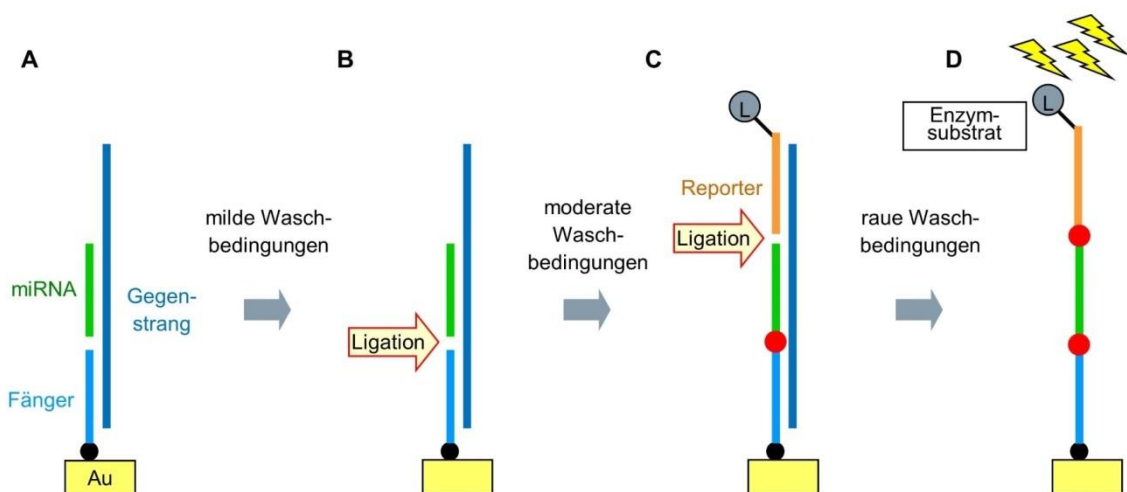


Abbildung 25: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs der 3-Schritte-Variante der 4-Komponenten-Methode in Anwesenheit der passenden Ziel-miRNA. Das Fänger-Oligonukleotid und die miRNA hybridisieren so mit dem Gegenstrang, dass sie nach einem milden Waschschrift ligiert werden können (A,B). Der anschließende Waschschrift wird bei Bedingungen durchgeführt, die den Gegenstrang nicht vom so verlängerten Fängerstrang abschmelzen. Das Reporter-Konjugat hybridisiert mit dem noch freien Bereich des Gegenstrangs und wird an das zweite Ende der miRNA ligiert (C). Durch die dabei entstehende kovalente Bindung des Reporterenzym an das immobilisierte Fänger-Oligonukleotid kann nun ohne Signalverlust bei rauen Bedingungen gewaschen werden. L: Label, EST2; Enzymsubstrat: pAPB; Au: Goldelektrode.

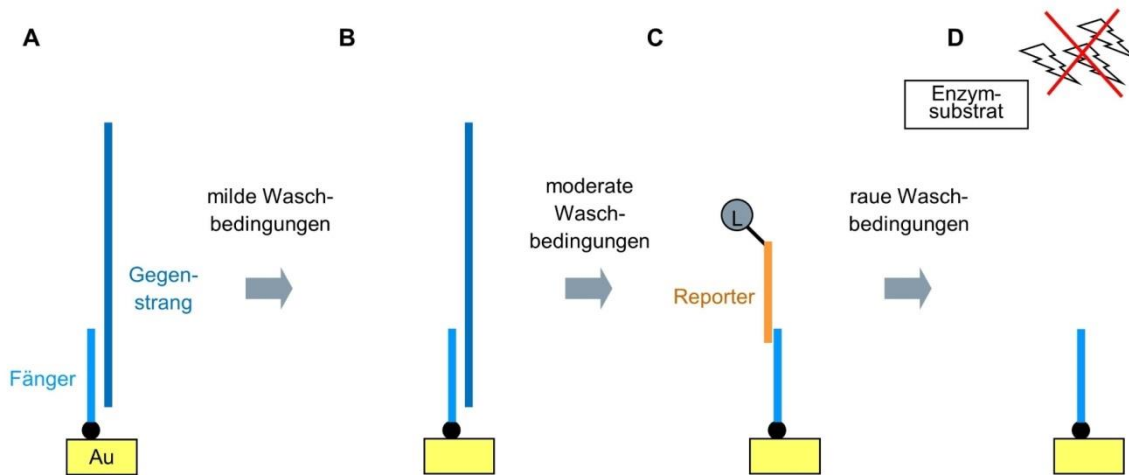


Abbildung 26: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs der 3-Schritte-Variante der 4-Komponenten-Methode in Abwesenheit der passenden Ziel-miRNA. Der Gegenstrang hybridisiert mit dem Fänger-Oligonukleotid und bleibt während des ersten milden Waschschriffs gebunden (A,B). Da keine Ziel-Nukleinsäure vorhanden ist, findet anschließend keine Ligation statt und der Gegenstrang wird beim darauffolgenden Waschschrift vom Fängerstrang abgeschmolzen. Ohne Gegenstrang kann das Reporter-Konjugat beim dargestellten Sensor nicht spezifisch binden und wird nicht ligiert (C). Unspezifisch gebundene Moleküle werden während des rauen Waschschriffs vor der Messung entfernt (D). L: Label, EST2; Enzymsubstrat: pAPB; Au: Goldelektrode.

Im direkten Vergleich mit der 2-Schritte-Variante ergab sich bei der Messung von 10 nM miDNA-21 Ziel-Nukleinsäure mit der aufwändigeren 3-Schritte-Variante eine starke Verringerung des falsch-positiven Signals an den Fänger_96-Sensoren von 0,19 nA/s auf 0,008 nA/s (Abbildung 27B). Gleichzeitig blieb das Positivsignal, das an den Sensoren mit den passenden immobilisierten Fänger-ODNs gemessen wurde, nahezu unverändert erhalten (Abbildung 27A; 25,5 nA/s und 36,2 nA/s).

Entsprechend zeigte eine miDNA-21 Konzentrationsreihe, die mit der 3-Schritte-Variante durchgeführt wurde, eine verbesserte Assay-Performance (Abbildung 27C). Bei dieser Versuchsreihe wurde jede einzelne Konzentration der Ziel-Nukleinsäure auf einem separaten, unbenutzten CMOS-Chip gemessen. Durch die beschriebenen Änderungen des Versuchsprotokolls hatte sich der dynamische Bereich auf drei Dekaden der Ziel-Nukleinsäure-Konzentration erweitert, die auf etwa drei Größenordnungen des Signalbereichs abgebildet wurden. So bewirkte eine miDNA-21 Konzentration von 10 pM in der Hybridisierungslösung eine Steigung des Stromflusses von 0,037 nA/s, während bei Einsatz von 10 nM Ziel-Nukleinsäure ein Signal von 38,1 nA/s gemessen werden konnte.

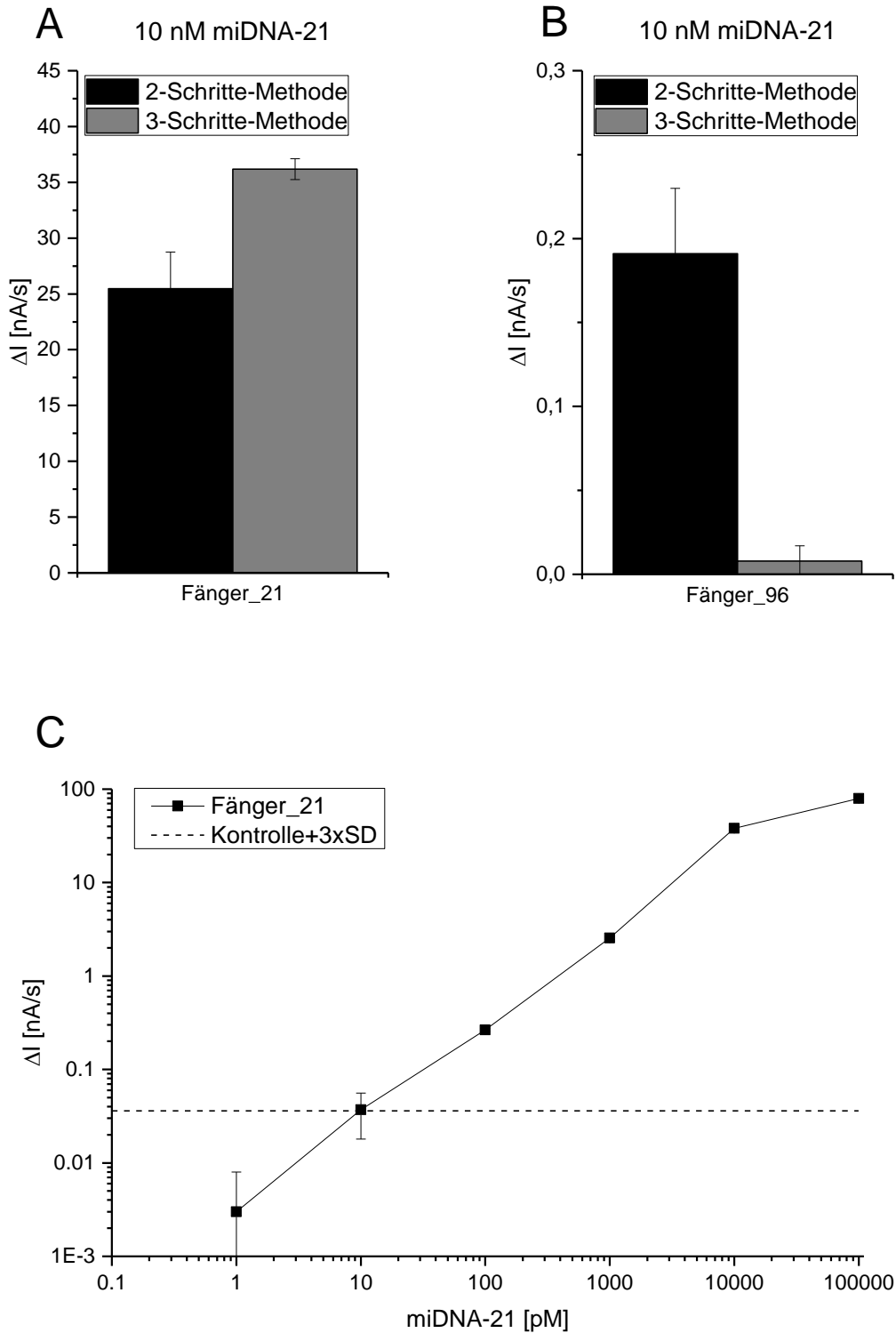


Abbildung 27: Weitere Optimierung der 4-Komponenten-Methode durch Einführung der 3-Schritte-Variante. A,B: Mit dem QuickLab-Gerät wurde je ein Versuch mit der 2-Schritte-Variante und einer mit der 3-Schritte-Variante [B, W_0 , $T_H=45$, L_Q , $t_L=5$, $T_S=50$, W_M] der 4-Komponenten-Methode auf CMOS-Chips derselben Immobilisierungscharge durchgeführt. Bei beiden Durchläufen wurden als Gegenstränge G_96-Ra und G_21-Ra eingesetzt und als Ziel-Nukleinsäure 10 nM miDNA-21. Als Konjugat wurden 250 nM EST2-Ra11 verwendet. Die ausgewerteten Mittelwerte und Standardabweichungen aus je drei Wiederholungsmessungen (technische Replikate) sind für die Sensoren mit den angegebenen immobilisierten Fänger-Oligonukleotiden dargestellt. C: Es wurde eine Konzentrationsreihe für die Ziel-Nukleinsäure miDNA-21 mit der 3-Schritte-Variante der 4-Komponenten-Methode [B, W_0 , $T_H=45$, L_Q , $t_L=5$, $T_S=50$, W_M] durchgeführt. Für jede miDNA-21 Konzentration wurde ein neuer CMOS-Chip derselben Immobilisierungscharge verwendet und als Gegenstränge wurden G_96-Ra und G_21-Ra eingesetzt. Als Konjugat wurden 250 nM EST2-Ra11 verwendet. Die ausgewerteten Mittelwerte

und Standardabweichungen der Sensorsignale ΔI von je drei Wiederholungsmessungen pro Konzentration sind in Abhängigkeit von der eingesetzten miDNA-21-Konzentration für die Sensoren mit den immobilisierten Fänger-Oligonukleotiden Fänger_21 nach Korrektur durch eine Kontrollgruppe ohne immobilisierte Nukleinsäure (SP) dargestellt. Die gestrichelte Linie markiert den entsprechenden Signalwert einer Kontrollmessung ohne Ziel-Nukleinsäure zuzüglich der dreifachen Standardabweichung (Kontrolle+3xSD). Sensorpositionen: SP – Cluster 6, 8, 9, 11; Fänger_21 – Cluster 10; Fänger_96 – Cluster 7.

4.2.2.3 Detektion von miRNA

Bisher wurden bei allen Messungen DNA-Oligonukleotide als Ziel-Nukleinsäuren verwendet, die analog zu endogenen miRNAs designt worden waren. Im nächsten Schritt sollten synthetisch hergestellte miRNAs mit der 3-Schritte-Variante der 4-Komponenten-Methode detektiert werden, um zu überprüfen, ob das Verfahren zur Quantifizierung von miRNAs als Biomarker geeignet ist. Außerdem wurde die Zahl der gleichzeitig zu detektierenden Ziel-Nukleinsäuren auf acht erhöht. Dazu wurde ein Fängersatz A aus acht *Alien*-Sequenzen für die Immobilisierung auf verschiedenen Sensorpositionen designt (Fänger A1-A8). Durch zugehörige Gegenstränge wurden entsprechend acht miRNAs – einschließlich der artifiziellen Kontrolle miR-Alien1 – den Fänger-ODNs zugeordnet (siehe auch Abschnitt 4.2.2.1). Sechs Ziel-miRNAs wurden aus einer Signatur von 20 dysregulierten miRNAs im Vollblut von AMI-Patienten ausgewählt, die zuvor in einer Studie von Meder et al per Biochip-Microarray ermittelt worden waren (Meder et al. 2011). Dabei wurden hauptsächlich miRNAs ausgewählt, die laut Publikation einen vergleichsweise hohen Expressionslevel aufwiesen. Zusätzlich wurde miR-16 als Ziel-Nukleinsäure mit aufgenommen – eine miRNA, die häufig als endogener Standard verwendet wird. Da bei einigen Experimenten ein alternatives EST2-Konjugat (EST2-Rb15 statt EST2-Ra11) verwendet wurde, wurden zwei komplette Gegenstrang-Sets synthetisiert (Tabelle 3, Tabelle 4).

Tabelle 3: Gegenstrang-Set G_Rb15-Mix-A. Mit den aufgelisteten Gegensträngen wurden die Ziel-miRNAs den jeweiligen immobilisierten Fänger-Oligonukleotiden des Satzes A zugeordnet. Die Gegenstränge sind für die Verwendung des Reporter-Konjugats EST2-Rb15 designt.

Ziel-miRNA	Fänger	Gegenstrang
miR-380	A1	G_380_A1_Rb
miR-Alien1	A2	G_Alien1_A2_Rb
miR-7-1	A3	G_7-1_A3_Rb
miR-93	A4	G_93_A4_Rb
miR-142	A5	G_142_A5_Rb
miR-1281	A6	G_1281_A6_Rb
miR-16	A7	G_16_A7_Rb
miR-151a	A8	G_151a_A8_Rb

Ergebnisse

Tabelle 4: Gegenstrang-Set G_Ra11-Mix-A. Mit den aufgelisteten Gegensträngen wurden die Ziel-miRNAs den jeweiligen immobilisierten Fänger-Oligonukleoriden des Satzes A zugeordnet. Die Gegenstränge sind für die Verwendung des Reporter-Konjugats EST2-Ra11 designt.

Ziel-miRNA	Fänger	Gegenstrang
miR-380	A1	G_380_A1_Ra
miR-Alien1	A2	G_Alien1_A2_Ra
miR-7-1	A3	G_7-1_A3_Ra
miR-93	A4	G_93_A4_Ra
miR-142	A5	G_142_A5_Ra
miR-1281	A6	G_1281_A6_Ra
miR-16	A7	G_16_A7_Ra
miR-151a	A8	G_151a_A8_Ra

4.2.2.3.1 Untersuchung zum Einsatz von RNA als Ziel-Nukleinsäure

Bei einem Vergleichsversuch wurden auf einem CMOS-Chip 1 nM miDNA-Alien1 (DNA) und auf einem anderen Chip derselben Charge 1 nM miR-Alien1 (RNA) mit dem gleichen Verfahren gemessen. Die beiden Ziel-Nukleinsäuren hatten die gleiche Sequenz und wiesen beide eine OH-Gruppe am 3'-Ende und eine Phosphat-Gruppe am 5'-Ende auf. Bei der Detektion der DNA-Ziel-Nukleinsäure konnte ein Signal von 1,28 nA/s an den Sensoren mit den zugehörigen Fänger-ODNs (Fänger_A2) gemessen werden. Der Einsatz von RNA als Ziel-Nukleinsäure führte zu einem vollständigen Verlust des Signals an den zugehörigen Sensoren (Fänger_A2: -0,091 nA/s), die bei diesem Versuch nur eine Aktivität entsprechend der von Leer-Elektroden (SP: -0,094 nA/s) zeigten (Abbildung 28).

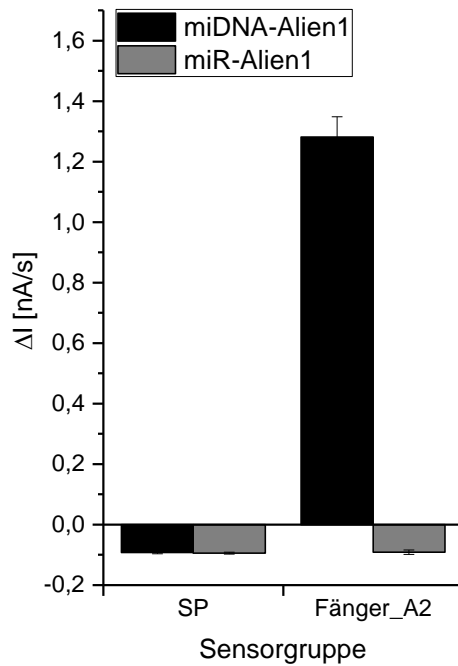


Abbildung 28: Messung von miDNA-Alien1 und von miR-Alien1 (RNA) mit DNA-Fänger-Oligonukleotiden. Mit dem Auto-Reader wurden zwei separate automatische Messdurchläufe für 1 nM miDNA-Alien1 und 1 nM miR-Alien1 als Ziel-Nukleinsäure mit der 4-Komponenten-Methode (Makrodatei: 4-Komponenten1-TS50) auf zwei CMOS-Chips derselben Immobilisierungscharge durchgeführt. Als Konjugat wurden 250 nM EST2-Rb15 verwendet und die Probelösung enthielt je 100 nM der Gegenstränge des G_Rb15-Mix-A. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus je drei Wiederholungsmessungen für eine Sensorgruppe mit den der Ziel-Nukleinsäure zugeordneten DNA-Fänger-Oligonukleotiden Fänger_A2 und eine Kontrollgruppe ohne immobilisierte Fänger (SP) nach Auswertung. Sensorpositionen: SP – Cluster 4, 13; Fänger_A2 – Cluster 6.

4.2.2.3.2 Ermöglichung der Ligation am 5'-Ende der miRNA

Bullard und Bowater untersuchten die Ligationseffizienz von Ligasen des T4-Bakteriophagen bei Verwendung verschiedener Kombinationen aus DNA- und RNA-Strängen (Bullard and Bowater 2006). Sie variierten dabei die Stränge, deren 5'- und 3'-Enden ligiert werden sollten, den komplementären Gegenstrang und die eingesetzte Ligase. Ihre Ergebnisse zeigen, dass – unabhängig von der Art der verwendeten T4 Ligase und der Art des Gegenstrangs – eine Ligation zwischen einem 3'-OH-Ende eines DNA-Strangs und einem 5'-Phosphat-Ende eines RNA-Strangs nicht möglich ist (Ligationsrate < 0,001).

Je nach Orientierung des im 4-Komponenten-Assay gebildeten Konstrukts, ist jedoch eine Ligation des 5'-Phosphat-Endes der miRNA mit entweder dem EST2-Konjugat oder dem Fänger-Oligonukleotid erforderlich, um das Reporterenzym kovalent an die auf dem Gold immobilisierte Thiol-Gruppe zu binden (Abbildung 25B,C). Wegen der

bereits untersuchten Orientierung der Assay-Komponenten (Abbildung 22) und der leichteren Verfügbarkeit thiolmodifizierter Oligonukleotide wurden zunächst die zur Messung kurzer DNA verwendeten Fänger-ODNs variiert. Da in anderen Arbeiten gezeigt worden war, dass zwei RNA-Stränge bei Verwendung eines DNA-Templates mit T4 DNA Ligase verbunden werden können (Moore and Sharp 1992, Kershaw and O'Keefe 2012), wurden Fänger aus RNA und chimäre Fänger mit RNA-Nukleotiden am 3'-Ende immobilisiert. In der Übersicht von Bullard und Bowater zeigte die T4 DNA Ligase für die angestrebte Substratkombination jedoch nur eine geringe Reaktionsrate, weshalb auch der Einsatz von T4 RNA Ligase II untersucht werden sollte (Bullard and Bowater 2006).

Eine Messung von 10 nM miR-Alien1 lieferte für Sensoren, die mit den zugehörigen RNA-Fängern immobilisiert worden waren, ein Signal von 3,13 nA/s bei Einsatz von T4 DNA Ligase und 3,08 nA/s mit T4 RNA Ligase II (Abbildung 29A). Immobilisierte Chimär-Fänger, die aus DNA und vier RNA-Nukleotiden am 3'-Ende gebildet waren (siehe auch Abbildung 30), führten auf demselben CMOS-Chip zu einem Stromanstieg von 3,66 nA/s (T4 DNA Ligase) und 4,05 nA/s (T4 RNA Ligase II). Der Einsatz von Chimär-Fängern ermöglicht demgemäß die Detektion kurzer RNAs mit der 4-Komponenten-Methode und zeigte dabei ein besseres Ergebnis als ein Fänger-Oligonukleotid mit identischer Sequenz, das vollständig aus RNA-Nukleotiden aufgebaut war. Da der Einsatz der hochpreisigen RNA-Ligase II anstelle von T4 DNA Ligase keine signifikante Verbesserung der Messgröße erbrachte, wurde weiterhin die T4 DNA Ligase verwendet.

Um die Eignung von Chimär-Fänger-Oligonukleotiden für das untersuchte Detektionsverfahren zu charakterisieren, wurde ein experimenteller Vergleich mit einem DNA-Fänger-Chip durchgeführt. Da miRNAs mit DNA-Fängern nicht ligiert werden können, wurde als Ziel-Nukleinsäure miDNA-Alien1 (1 nM) verwendet. Bei gleichem Versuchsprotokoll wurde auf dem mit immobilisierten DNA-Fängern bestückten Chip ein Signal von 0,511 nA/s für miDNA-Alien1 (Fänger_A2) gemessen und eines von 0,523 nA/s bei den Chimär-Fänger-Sensoren des zweiten Moduls (Abbildung 29B).

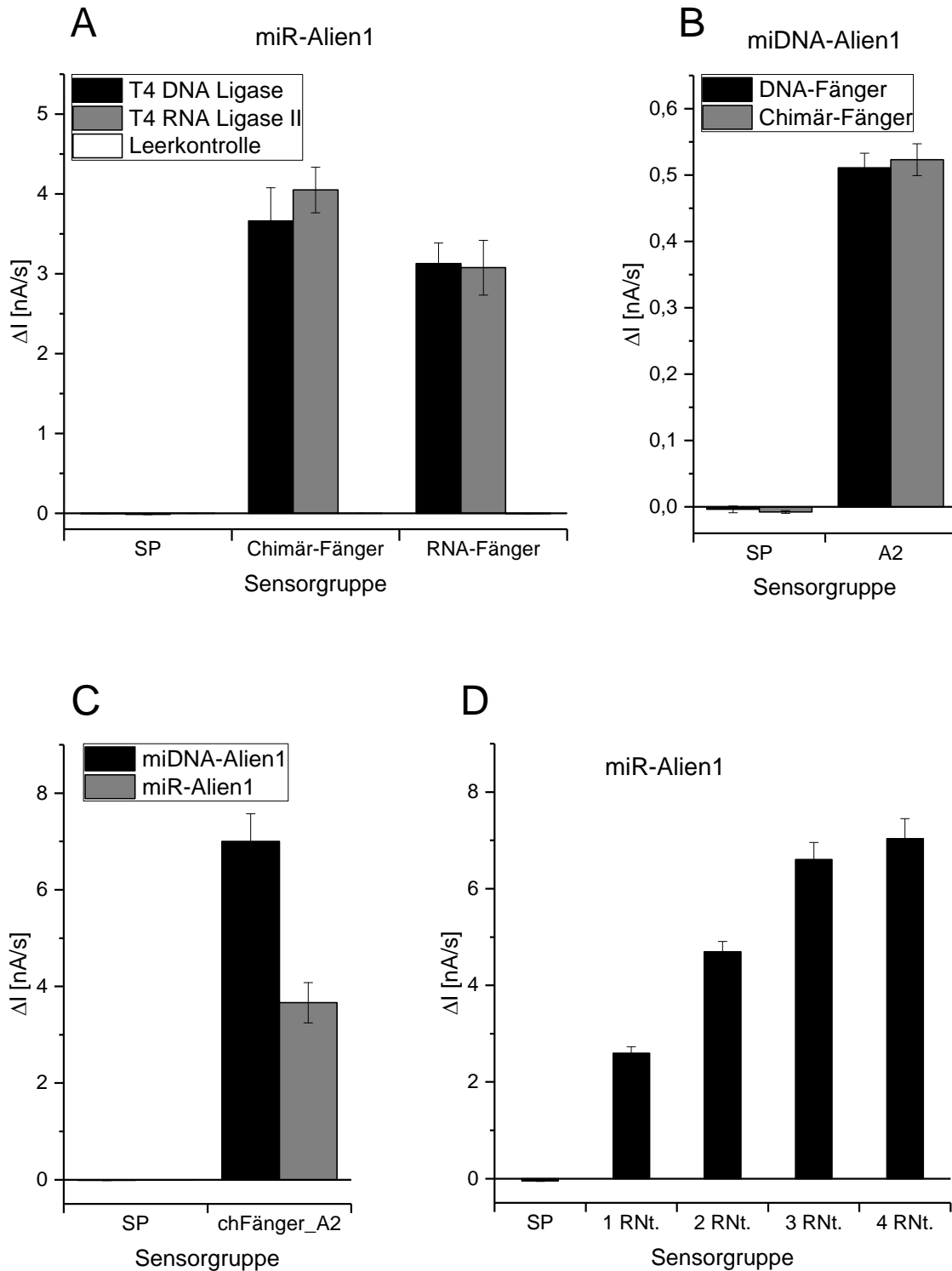


Abbildung 29: Einsatz von RNA- und chimären Fänger-Oligonukleotiden zur Detektion von miRNAs und Vergleich mit DNA-Fänger-Oligonukleotiden. A: Drei Assayläufe wurden manuell mit der 3-Schritte-Variante der 4-Komponenten-Methode durchgeführt [B, W_0 , $T_H=40$, L_B , $t_L=10$, $T_S=50$]. Dabei wurden CMOS-Chips aus derselben Immobilisierungscharge verwendet, die sowohl Sensoren mit RNA-Fängern (RNA-Fänger_A2') als auch mit chimären Fänger-Oligonukleotiden (chFänger_A2') umfassten. Der zugehörige Gegenstrang wurde als Teil des G_Rb15-Mix-A eingesetzt und als Konjugat wurden 250 nM EST2-Rb15 verwendet. Es sind die ausgewerteten Mittelwerte und Standardabweichungen der Signale ΔI aus je drei Wiederholungsmessungen (technische Replikate) für die angegebenen Sensorgruppen aus einem Durchlauf mit 10 nM miR-Alien1 als Ziel-Nukleinsäure, einem ohne Target (Leerkontrolle) und einem weiteren mit 10 nM miR-Alien1, bei dem die T4 DNA Ligase in allen Reaktionslösungen durch 200 U/ml T4 RNA Ligase II ersetzt wurde (T4 RNA Ligase II), dargestellt. Sensorpositionen: SP – Cluster 1, 2, 4, 6, 11, 13, 15, 16; chFänger_A2' – Cluster 3, 7; RNA-

Fänger_A2' – Cluster 8, 12. B: 1 nM miDNA-Alien1 wurde mit 100 nM Gegenstrang (G_Alien1_A2_Rb) auf einem Chip 1 mit zugehörigen immobilisierten DNA-Fänger-Oligonukleotiden (Fänger_A2) und auf einem Chip 2 mit zugehörigen immobilisierten Chimär-Fängern (chFänger_A2') mit der manuellen 3-Schritte Variante der 4-Komponenten-Methode detektiert [B, W₀, T_H=45, L_Q, t_L=5, T_S=50, W_M]. Als Reporter-Konjugat wurden 250 nM EST2-Rb15 eingesetzt. Die ausgewerteten Mittelwerte und Standardabweichungen der Signale ΔI aus je drei Wiederholungsmessungen wurden für die entsprechende Sensorgruppe und eine Kontrollgruppe ohne immobilisierte Fänger-Oligonukleotide (SP) dargestellt. Sensorpositionen Chip 1: SP – Cluster 4, 13; Fänger_A2 – Cluster 6; Sensorpositionen Chip 2: SP – Cluster 4, 6, 11, 13; chFänger_A2' – Cluster 7. C: Der Versuch aus A mit T4 DNA Ligase wurde mit 10 nM miD-Alien1 als Ziel-Nukleinsäure wiederholt. Nach identischer Auswertung wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen für die angegebenen Sensorgruppen zusammen mit den Ergebnissen des 10 nM miR-Alien1 Versuchs aus A dargestellt. D: Die manuelle 3-Schritte-Variante der 4-Komponenten-Methode wurde auf einem CMOS-Chip mit Sensoren, die immobilisierte chimäre Fänger-Oligonukleotide mit einem (1 Rnt., chFänger_A2_1Rnt), zwei (2 Rnt., chFänger_A2_2Rnt), drei (3 Rnt., chFänger_A2_3Rnt) und vier (4 Rnt., chFänger_A2) RNA-Nukleotiden gebunden hatten, durchgeführt [W₀, T_H=40, t_L=5, T_S=50, W_M]. Als Ziel-Nukleinsäure wurde 1 nM miR-Alien1 eingesetzt, als Gegenstränge der G_Ra11-Mix-A und als Konjugat 250 nM EST2-Ra11. Die ausgewerteten Mittelwerte und Standardabweichungen aus je drei Wiederholungsmessungen (technische Replikate) sind für die genannten Sensorgruppen und eine Kontrollgruppe ohne immobilisierte Oligonukleotide (SP) dargestellt. Sensorpositionen: SP – Cluster 1, 2, 3, 4, 13, 14, 15, 16; 1 Rnt. – Cluster 5, 9; 2 Rnt. – Cluster 6, 10; 3 Rnt. – Cluster 7, 11; 4 Rnt. – Cluster 8, 12.

Beim Vergleich des Signals, das ein Sensor mit immobilisierten Chimär-Fänger-Oligonukleotiden bei der Messung von 10 nM miDNA-Alien1 und bei 10 nM miR-Alien1 lieferte, zeigte sich eine Reduktion der Steigung ΔI um 48%, wenn man eine RNA als Ziel-Nukleinsäure einsetzt (Abbildung 29C). Dies weist auf eine geringere Effizienz der Ligation zweier RNA-Enden gegenüber der Ligation eines 5'-DNA-Endes mit einem 3'-RNA-Ende hin.

Ein weiterer Faktor, der die Ligationseffizienz am 5'-Ende der Ziel-RNA beeinflussen könnte, ist die Anzahl der RNA-Nukleotide, die das 3'-Ende des Fänger-Chimärs bilden. Um die optimale Länge zu bestimmen, wurden Chimär-Oligonukleotide mit 1-4 RNA-Nukleotiden auf verschiedenen Sensoren eines CMOS-Chips immobilisiert und ein 4-Komponenten-Assay mit 1 nM miR-Alien1 als Ziel-Nukleinsäure durchgeführt. Das Ergebnis zeigte eine Korrelation zwischen dem Anstieg des Signals und der Anzahl der Ribonukleotide (Abbildung 29D). Während beim Übergang von einem auf zwei Nukleotide das Signal sehr deutlich von 2,60 nA/s auf 4,70 nA/s stieg (um 81%), erhöhte sich die Steigung ΔI bei drei RNA-Nukleotiden im Vergleich zum 2 Nt.-Fänger nur noch um 41% auf 6,60 nA/s und zeigte bei 4-Ribonukleotiden nur noch eine geringe Erhöhung auf 7,04 nA/s. Aufgrund dieser Erkenntnisse und da ein hoher RNA-Gehalt des Chimär-Fänger-Oligonukleotids wegen der Gefahr der Bildung von Sekundärstrukturen und der Beeinträchtigung der Oligonukleotidstabilität vermieden werden sollte, wurde in dieser Arbeit die Anzahl der Ribonukleotide am 3'-Ende der Chimär-Fänger auf vier festgelegt.

Mit den gesammelten Informationen über die Ligation des 5'-Phosphat-Endes einer RNA als Ziel-Nukleinsäure wurde auch ein chimäres EST2-Konjugat (EST2-Ra-rev)

als Reporter-Oligonukleotid hergestellt. Hierbei wurde die Esterase 2 an das 5'-Ende der Ausgangs-Nukleinsäure gekoppelt, welche grundsätzlich aus DNA-Nukleotiden aufgebaut war, am 3'-Ende jedoch vier Ribonukleotide aufwies. Als Primärstruktur wurde die Komplementärsequenz zur Bindungssequenz des EST2-Ra11-Reporters verwendet, die mit einem 4T-Spacer am 5'-Ende (EST2-Kopplungsstelle) versehen wurde. Entsprechend wurden die übrigen Komponenten dieses umgekehrten Assay-Aufbaus für die Detektion von miR-16 angepasst: Für den zugehörigen DNA-Fänger wurde die Bindungssequenz des chimären Fängers B4 verwendet, wobei der 6T-Spacer an das 3'-Ende verschoben wurde, welches für die Immobilisierung auf den Gold-Elektroden mit einer Thiol-Gruppe versehen wurde. Die Sequenz des Gegenstrangs wurde an diesen Fänger, das chimäre Reporter-Konjugat und die neue Orientierung der Ziel-Nukleinsäure im Detektionskonstrukt angepasst (Abbildung 31).

Diese neue Variante des 4-Komponenten-Assays sollte nun mit dem 3-Schritte-Protokoll getestet und mit der Chimär-Fänger-Version verglichen werden. Dazu wurde als Positiv-Wert jeweils das Signal bei Einsatz von 1 nM miR-16 ermittelt und als Negativkontrolle je ein Durchlauf ohne Ziel-Nukleinsäure durchgeführt.

Obwohl bei der Messung der Ziel-miRNA eine höhere Konzentration des Chimär-Reporters und bei der Negativkontrolle eine höhere Konzentration des DNA-Reporters eingesetzt wurde, zeigte der umgekehrt orientierte 4-Komponenten-Assay in beiden Fällen ein schlechteres Ergebnis (Abbildung 32). Bei gleicher Menge der Ziel-Nukleinsäure in der Hybridisierungslösung lieferte die Chimär-Reporter-Variante ein Signal von 2,18 nA/s im Vergleich zu 2,65 nA/s bei Verwendung eines chimären Fängers (DNA-Reporter). Dennoch war die Steigung ΔI in Abwesenheit der Ziel-miRNA bei der umgekehrten Variante des Detektionskonstrukts mit 0,179 nA/s höher als beim reinen DNA-Reporter (0,032 nA/s).

Da der Einsatz eines Reporter-Konjugats, das zumindest teilweise aus RNA-Nukleotiden besteht, zusätzlich aufwändiger in der Handhabung ist (Lagerungstemperatur, Stabilität, Sekundärstruktur), wurde in dieser Arbeit mit der Verwendung von chimären Fänger-Oligonukleotiden und des EST2-Ra11-DNA-Konjugats fortgefahren (Abbildung 30).

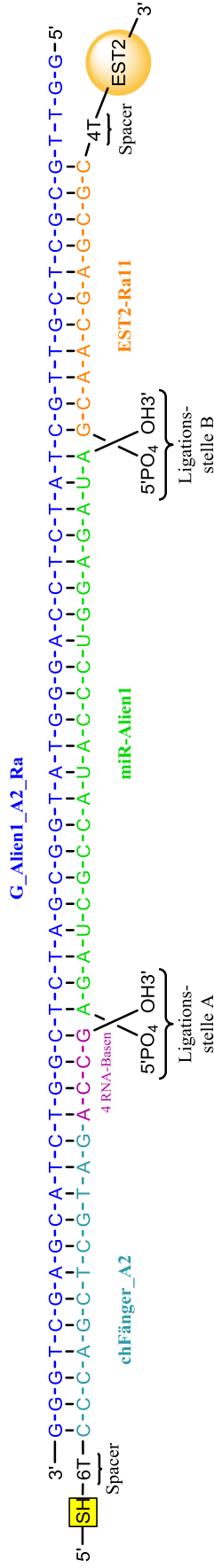


Abbildung 30: Oligodesign für die Verwendung eines chimären Fängerstrangs zur Detektion von miR-Alien1 mit der 4-Komponenten-Methode. Die Sequenzen des chimären Fängers chFänger_A2, des Gegenstrangs G_Alien1_A2-Ra, des Reporter-Konjugats EST2-Ra11 und der Ziel-Nukleinsäure miR-Alien1 sind in Form des konzeptionellen Hybridisierungskonstrukts der 4-Komponenten-Methode abgebildet. Die vier RNA-Nukleotide am 3'-Ende des Fängerstrangs, die für eine erfolgreiche Ligation an Stelle B erforderlich sind, sind violett eingefärbt. Die T-Spacer bestehen aus der angegebenen Anzahl an Thymin-Basen und die funktionellen Gruppen der zu ligierenden Nukleinsäure-Enden sind als Ligationsstellen A und B gekennzeichnet. EST2: Esterase 2; PO₄: Phosphat-Gruppe; SH: Thiol-Gruppe.

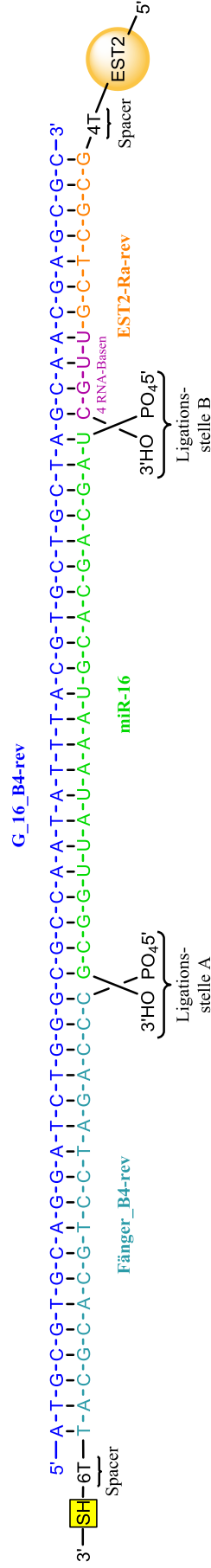


Abbildung 31: Oligodesign für die Verwendung eines chimären Reporter-Konjugats zur Detektion von miR-16 mit der 4-Komponenten-Methode. Die Sequenzen des Fänger-ODNs Fänger_B4-rev, des Gegenstrangs G_16_B4-rev, des chimären Reporter-Konjugats EST2-Ra-rev und der Ziel-Nukleinsäure miR-16 sind in Form des konzeptionellen Hybridisierungskonstrukts der 4-Komponenten-Methode dargestellt. Die RNA-Nukleotide des chimären Konjugats, die für eine erfolgreiche Ligation an Stelle B erforderlich sind, sind violett gekennzeichnet. Die Spacer bestehen aus der angegebenen Anzahl an Thymin-Basen und die funktionellen Gruppen der zu ligierenden Nukleinsäure-Enden sind als Ligationsstellen A und B gekennzeichnet. EST2: Esterase 2; PO₄: Phosphat-Gruppe; SH: Thiol-Gruppe.

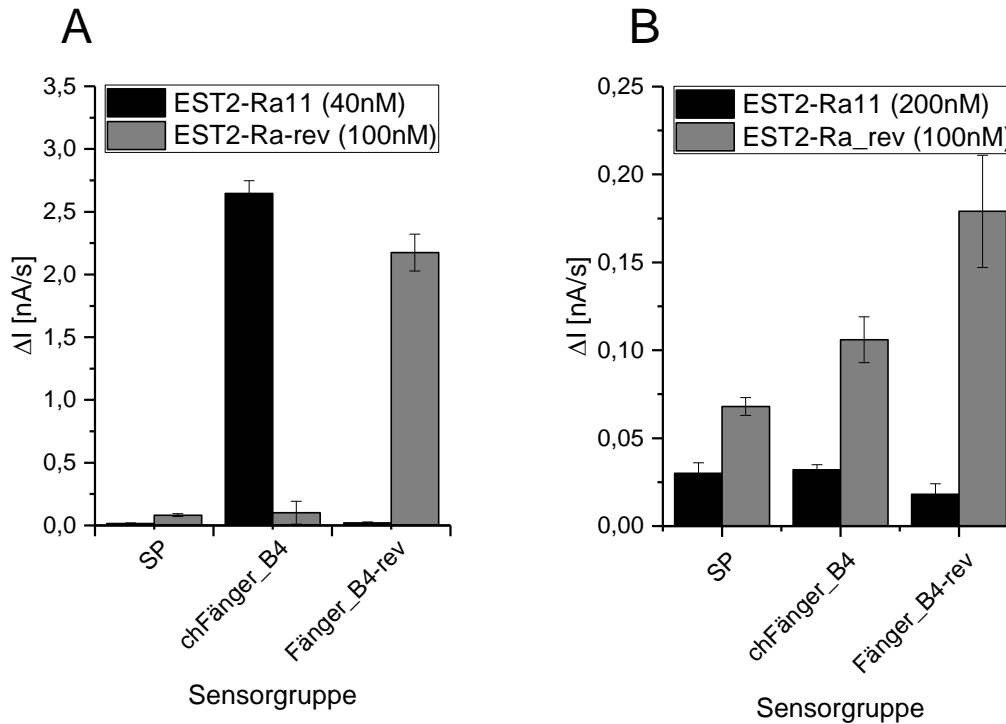


Abbildung 32: Verwendung eines chimären Esterase-Konjugats zur Detektion von miRNAs und Vergleich mit der Chimärfänger-Variante. A: Zwei automatische Messdurchläufe mit 1 nM miR-16 als Ziel-Nukleinsäure wurden mit der 4-Komponenten-Methode (Makrodatei: 4-Komponenten2-TS55) auf zwei CMOS-Chips derselben Immobilisierungscharge durchgeführt. Bei einem Durchlauf wurden als Reporter 40 nM des DNA-Konjugats EST2-Ra11 und je 100 nM der Gegenstränge des Sets G_Ra11-Mix-A eingesetzt, beim anderen 100 nM des chimären Reporter-Konjugats EST2-Ra-rev und 100 nM des Gegenstrangs G_16_B4-rev. Die ausgewerteten Mittelwerte und Standardabweichungen sind für die Signale an den zugehörigen Sensoren und an Kontrollpositionen ohne immobilisierte Nukleinsäuren dargestellt. B: Die Versuche von A wurden ohne Ziel-Nukleinsäure und mit veränderten Reporter-Konzentrationen wiederholt. Die Ergebnisse sind auf gleiche Art dargestellt. Sensorpositionen: SP – Cluster 3, 14; chFänger_B4 – Cluster 8; Fänger_B4-rev – Cluster 4, 13.

4.2.2.4 Multiplexfähigkeit

Wie bereits im Abschnitt 4.2.2.1 erwähnt, wird die Spezifität der Sensoren für die Ziel-Nukleinsäure bei der 4-Komponenten-Methode erst durch die bei der Hybridisierung zugegebenen Gegenstrang-ODNs bestimmt. Das Design der Gegenstrangsequenzen muss also derart erfolgen, dass die gewünschte Ziel-Nukleinsäure den Sensorpositionen mit dem gewählten Fänger-Oligonukleotid zugeordnet ist. Durch dieses sogenannte Zip-Code-Prinzip, kann ein generisches Chip-Layout für eine Vielzahl verschiedener Assay-Panels verwendet werden. Die Auswahl geeigneter Fänger-Oligonukleotide ist daher die Grundlage für die Herstellung von Biochips, die zur Quantifizierung frei wählbarer miRNA-Kandidaten im Multiplexverfahren eingesetzt werden können.

4.2.2.4.1 Chimär-Fänger-Satz A

Bei der Wahl der verwendeten Fängersequenzen wurden theoretische Gesichtspunkte berücksichtigt und zusätzlich investigative Test-Messungen durchgeführt. Als Primärstrukturen für die Mitglieder des ersten Chimär-Fänger-Satzes A wurden *Alien*-Sequenzen (siehe Abschnitt 4.2.1.1) gewählt, um bei Messungen von RNA-Extrakten aus Blutproben Interaktionen mit endogenen Nukleinsäure-Molekülen zu vermeiden. Aufgrund der Erkenntnisse aus Abschnitt 4.2.2.3.2 wurden die Fänger als Chimäre auf DNA-Basis mit je vier Ribonukleotiden am 3'-Ende synthetisiert. Die acht konstruierten Fänger-Oligonukleotide wurden von A1 bis A8 durchnummeriert und über das Gegenstrang-Design einzelnen Ziel-Nukleinsäuren zugeordnet. Um sowohl die Positiv- als auch die Negativsignale der Fänger-Gegenstrang-Kombinationen zu untersuchen, wurde eine Gruppe aus vier der acht Ziel-miRNAs (Gruppe A: je 1 nM miR-380 (A1), miR-7-1 (A3), miR-142 (A5), miR-16 (A7)) und eine aus den vier anderen Ziel-Nukleinsäuren (Gruppe B: je 1 nM miR-Alien1 (A2), miR-93 (A4), miR-1281 (A6), miR-151a (A8)) gemessen. Während die Positivsignale der Fänger A2, A3, A4, A5 und A8 zwischen 2,91 nA/s und 8,18 nA/s lagen, zeigten die Kombinationen A1-miR-380 und A6-miR-1281 nur eine Steigung ΔI von 0,500 nA/s und 0,255 nA/s bei gleicher Ziel-Konzentration (Abbildung 33). Die Kombination A7-miR-16 erzeugte dagegen ein hohes unspezifisches Signal, das trotz Abwesenheit der Ziel-Nukleinsäure bei 4,82 nA/s lag (Gruppe A). Diese Beobachtungen konnten durch weitere Messungen der auffälligen Fänger-Gegenstrang-Konstellationen reproduziert werden, wobei der chimäre Fänger A7 in Verbindung mit dem Reporter-Konjugat sogar ohne zugehörigen Gegenstrang ein unspezifisches Signal verursachte (Daten nicht gezeigt). Da vergleichbare Effekte bei Verwendung der analogen DNA-Fänger (A1-A8) nicht auftraten, wurden etwaige durch die Einführung von Ribonukleotiden verursachte Einflüsse analysiert. Ribonukleinsäuren neigen beispielsweise stärker zur Bildung stabiler Sekundärstrukturen als DNAs. Daher wurden die Sequenzen der Fänger-Oligonukleotide auf eventuell auftretende Faltungen untersucht (Abbildung 34). Dabei fiel auf, dass bei den Sequenzen der ineffektiven Chimär-Fänger A1 und A6 gefaltete Konformationen energetisch bevorzugt sind. Die beiden Fänger-Oligonukleotide mit den höchsten Positivsignalen im Multiplex-Versuch (Abbildung 33; chFänger_A2, chFänger_A4; Gruppe B) zeigten in der Prognose dagegen eine offene Struktur ohne begünstigte intramolekulare Wechselwirkungen. Da die

Ergebnisse

durchgeführte Analyse für die Sequenz des Fängers A7 auch keine mögliche Sekundärstruktur aufzeigte, blieb die Ursache der unspezifischen Effekte dieses Chimärs unklar.

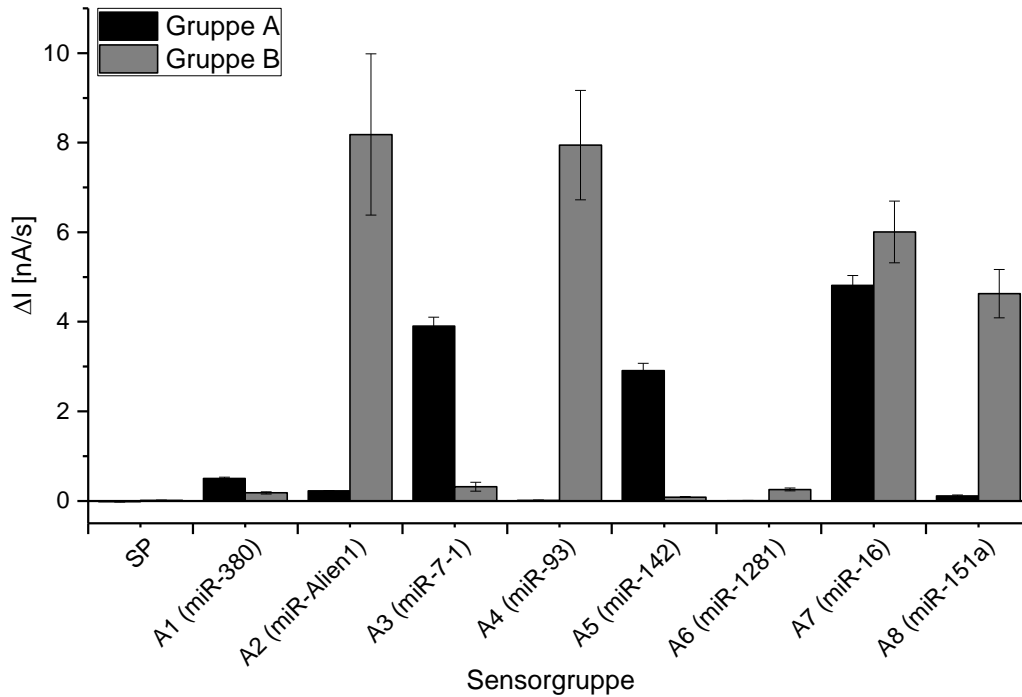


Abbildung 33: Multiplex-Versuche mit dem Chimär-Fänger-Satz A. Die Ziel-Nukleinsäuren für die Kombination aus den immobilisierten Chimär-Fängern des Satzes A mit den Gegensträngen des Sets G_Ra11-Mix-A wurden in zwei Gruppen (Gruppe A: miR-380, miR-7-1, miR-142, miR-16; Gruppe B: miR-Alien1, miR-93, miR-1281, miR-151a) aufgeteilt und jede Gruppe separat mit der manuellen 3-Schritte-Variante der 4-Komponenten-Methode auf CMOS-Chips derselben Immobilisierungscharge detektiert [W_0 , $T_H=40$, $t_L=5$, $T_S=50$, W_M]. Je 1 nM Ziel-Nukleinsäure, 100 nM pro Gegenstrang des G_Ra11-Mix-A und 250 nM EST2-Ra11 wurden verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Signale ΔI aus je drei Wiederholungsmessungen (technische Replikate) für die Sensoren mit den angegebenen chimären Fänger-Oligonukleotiden (zugehörige Ziel-Nukleinsäure in Klammern) und Sensoren ohne immobilisierte Oligonukleotide (SP) nach Auswertung. Sensorpositionen: SP – Cluster 4, 13; chFänger_A1 – Cluster 5; chFänger_A2 – Cluster 6; chFänger_A3 – Cluster 7; ... ; chFänger_A8 – Cluster 12.

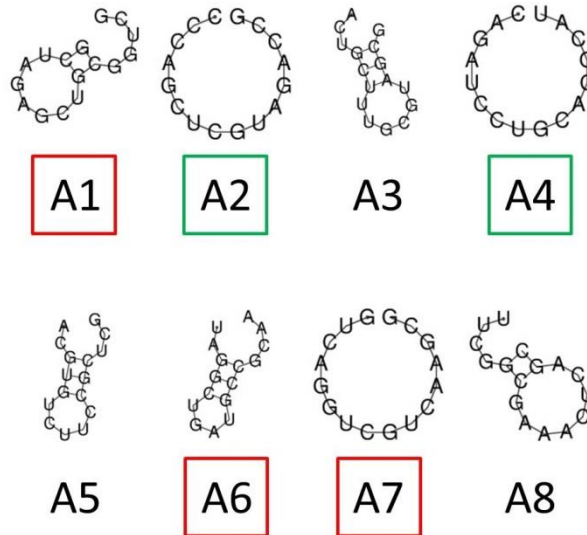


Abbildung 34: Prognostizierte RNA-Faltstrukturen für die funktionellen Sequenzen des Fängersatzes A. Die Sequenzen der Fänger-Oligonukleotide des Satzes A wurden (ohne T-Spacer) mit dem Programm *RNAfold* analysiert. Dabei wurden alle Thymin-Basen automatisch durch das RNA-Analog Uracil ersetzt. Es ist jeweils die Sekundärstruktur, die die minimale freie Energie (MFE) aufweist, dargestellt. Die Fängersequenzen, die beim miRNA-Multiplex-Versuch schlechte Ergebnisse zeigten sind durch einen roten Rahmen gekennzeichnet, besonders effektive Fänger durch einen grünen (vgl. **Abbildung 33**).

4.2.2.4.2 Chimär-Fänger-Satz B

Die Fänger des Satzes B wurden so gewählt, dass sich gemäß Kalkulation keine stabilen Sekundärstrukturen bilden konnten. Außerdem wurden 18 statt 16 Basen für den spezifischen Teil festgelegt, um eine größere Flexibilität beim Design der Gegenstang-Oligonukleotide zu erhalten. Bei der 3-Schritte Variante der 4-Komponenten-Methode musste der Waschschritt zum Entfernen überschüssiger Gegenstränge für alle im Multiplex-Verfahren gemessenen Ziel-Nukleinsäuren unter gleichen Stringenzbedingungen durchgeführt werden (Abbildung 25, Abbildung 26B►C). Daher wurden die zu detektierenden miRNAs den Fängern des Satzes so zugeordnet, dass die Schmelztemperatur der Gegenstrang-Teilsequenz, die mit dem Fänger und der Ziel-Nukleinsäure hybridisiert, ($T_m(G_{F+Z})$) für alle Kombinationen des Panels im gleichen Bereich lagen. Dabei wurden als zusätzliche T_m -Modifikation bis zu drei Nukleotide am 3'-Ende der Gegenstrang-ODNs entfernt, oder – im Falle der miR-142 – eine Adenin-Base addiert, die ein Thymin des 6T-Spacers in einen Teil der funktionellen Fängersequenz umwandelte. Die Zuordnung der Ziel-miRNAs zum jeweiligen Fänger durch die entsprechenden Gegenstränge und die Schmelztemperaturen $T_m(G_{F+Z})$ sind in Tabelle 5 dargestellt.

Ergebnisse

Tabelle 5: Gegenstrang-Set G_Ra11-Mix-B. Mit den aufgelisteten Gegensträngen wurden die Ziel-miRNAs den jeweiligen immobilisierten Fänger-Oligonukleotiden des Satzes B zugeordnet. Die Gegenstränge sind für die Verwendung des EST2-Ra11 designiert. Die Schmelztemperaturen $T_m(G_{F+z})$ wurden für Ionenkonzentrationen von 32 mM Na⁺ und 0 mM Mg²⁺ (vgl. Ionenstärke WP1) auf Basis der jeweiligen Gegenstrang-Teilsequenz berechnet.

Ziel-miRNA	Fänger	Gegenstrang	$T_m(G_{F+z})$ [°C]
miR-151	B1	G_151a_B1_Ra	61,0
miR-142	B2	G_142_B2_Ra	59,9
miR-486	B3	G_486_B3_Ra	62,3
miR-16	B4	G_16_B4_Ra	59,8
miR-26a	B5	G_26a_B5_Ra	60,7
miR-93	B6	G_93_B6_Ra	61,8
miR-Alien1	B7	G_Alien1_B7_Ra	61,9
miR-92a	B8	G_92a_B8_Ra	64,1

Die acht chimären Fänger-Oligonukleotide des Satzes B und die zugehörigen Gegenstränge zur Quantifizierung acht verschiedener miRNAs wurden eingesetzt, um im Multiplex-Verfahren in einem ersten Versuch je 10 nM von vier Ziel-Nukleinsäuren und in einem zweiten Versuch je 10 nM der verbleibenden vier miRNAs des Testpanels zu detektieren. Bei beiden Durchläufen zeigten die Sensoren für die in der Probelösung vorhandenen miRNAs hohe Signale in einem Bereich zwischen 7,68 nA/s (Gruppe A; B3_miR-486) und 18,5 nA/s (Gruppe B; B6_miR-93), während die Leersignale von 0,149 nA/s (Gruppe B; B3_miR-486) bis 0,727 nA/s (Gruppe A; B2_miR-142) reichten (Abbildung 35). Die Signale der Leersensoren ohne immobilisierte Fänger-Oligonukleotide lagen bei 0,312 nA/s (Gruppe A) und 0,290 nA/s (Gruppe B).

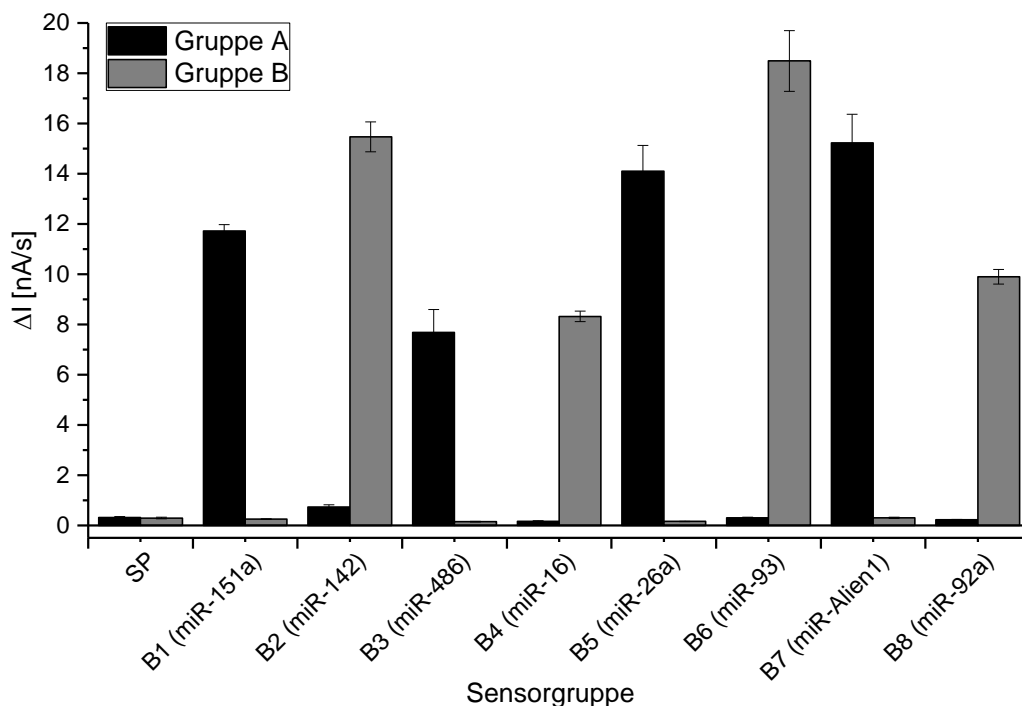


Abbildung 35: Multiplex-Versuche mit dem Chimär-Fänger-Satz B. Die Ziel-Nukleinsäuren für die Kombination aus den immobilisierten Fängern des Satzes B mit den Gegensträngen des Sets G_Ra11-Mix-B wurden in zwei Gruppen (Gruppe A: miR-151a, miR-486, miR-26, miR-Alien1; Gruppe B: miR-142, miR-16, miR-93, miR-92a) aufgeteilt und jede Gruppe separat mit der manuellen 3-Schritte-Variante der 4-Komponenten-Methode auf CMOS-Chips derselben Immobilisierungscharge detektiert [W_0 , $T_H=35$, $t_L=5$, $T_S=50$, W_M]. Je 10 nM Ziel-Nukleinsäure, 100 nM pro Gegenstrang des G_Ra11-Mix-B und 200 nM EST2-Ra11 wurden eingesetzt. Die ausgewerteten Mittelwerte und Standardabweichungen der Signale aus je drei Wiederholungsmessungen (technische Replikate) für die Sensoren mit den angegebenen chimären Fänger-Oligonukleotiden (zugehörige Ziel-Nukleinsäure in Klammern) und Sensoren ohne immobilisierte Oligonukleotide (SP) sind dargestellt. Sensorpositionen: SP – Cluster 13; chFänger_B1 – Cluster 5; chFänger_B2 – Cluster 6; chFänger_B3 – Cluster 7; ... ; chFänger_B8 – Cluster 12.

4.2.2.5 Sensitivität

Unter Berücksichtigung der gesammelten Erkenntnisse und Optimierungsmöglichkeiten wurden von fünf miRNAs des Panels aus Absatz 4.2.2.4.2 Konzentrationsreihen im Multiplex-Verfahren gemessen. Dabei wurden verschiedene Konzentrationen der Ziel-Nukleinsäuren von 0-10 nM in fünf Konstellationen so gemessen, dass von allen Kandidaten vier Konzentrationspunkte und ein Nullwert bestimmt werden konnten. Das Ergebnis zeigt zum einen bei allen gewählten miRNAs eine Sensitivität von mindestens 100 pM und zum anderen einen recht linearen Kurvenverlauf im Bereich von 100 pM bis 10 nM (Abbildung 36).

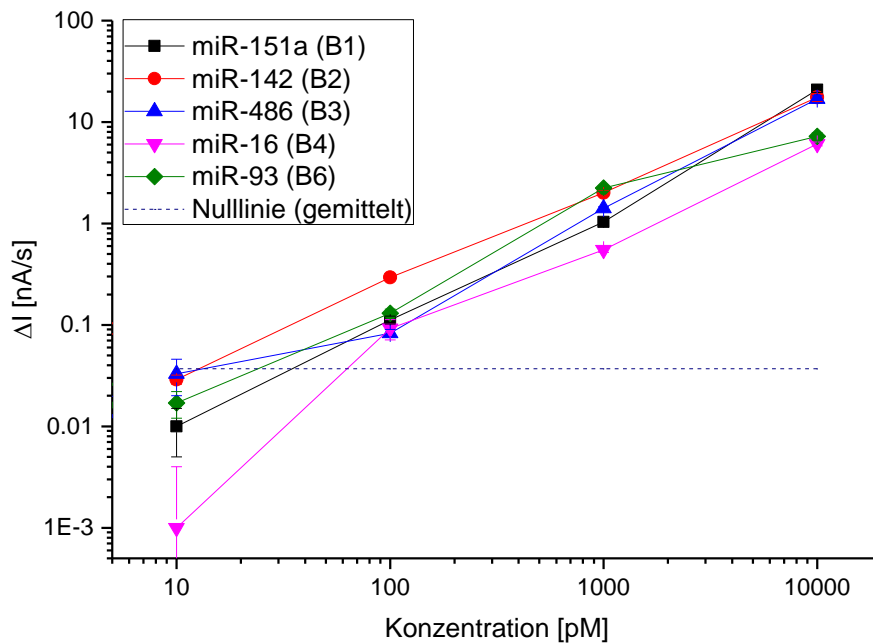


Abbildung 36: Multiplex-Messung von Konzentrationsreihen für fünf miRNAs mit der 3-Schritte-Variante der 4-Komponenten-Methode. In fünf Versuchen wurden Kombinationen aus verschiedenen Konzentrationen der dargestellten synthetischen miRNAs und der Kontrolle miR-Alien1 mit der manuellen 3-Schritte-Variante der 4-Komponenten-Methode gemessen [B, $T_H=40$, $t_L=10$, $T_S=55$, W_M]. Die Ziel-Nukleinsäure-Kombinationen wurden so gewählt, dass jede Konzentration der Reihe und ein Nullwert (0 M) einmal pro miRNA detektiert wurde. Es wurden immer 250 nM EST2-Ra11 und je 100 nM der Gegenstränge des G_Ra11-Mix-B eingesetzt. Die ausgewerteten Mittelwerte und Standardabweichungen der Sensorsignale ΔI von je drei Wiederholungsmessungen pro Versuch sind in Abhängigkeit von der eingesetzten miRNA-Konzentration für die Sensoren mit den zugehörigen immobilisierten Fänger-Oligonukleotiden dargestellt. Zu den entsprechenden Signalen für die Nullwerte wurde die dreifache Standardabweichung addiert ($MW+3xSD$) und der Mittelwert aus den Ergebnissen für alle miRNAs als gemittelte Nulllinie dargestellt (gestrichelt). Sensorpositionen: chFänger_B1 – Cluster 5; chFänger_B2 – Cluster 6; chFänger_B3 – Cluster 7; chFänger_B4 – Cluster 8; chFänger_B6 – Cluster 10.

4.2.3 Sandwich-Ligations-Methode

Zur Verringerung der falsch-positiven Signale in Abwesenheit der zugehörigen Ziel-Nukleinsäure wurde bei der 4-Komponenten-Methode die Komplexität des Versuchsprotokolls von einem auf drei Hauptschritte erhöht (s. 4.2.2.2.2 und 4.2.2.2.3). Dabei verringerte das weitgehende Abschmelzen des Gegenstrangs vor der Zugabe des Reporter-Konjugats die Bindung großer Mengen des Enzyms an Fänger-Oligonukleotide, die keine Ziel-Nukleinsäure gebunden hatten (Abbildung 26). Als weiterer Ansatz, eine unspezifische Assoziation des Reporterenzym zu verhindern, wurde eine Aufteilung des Gegenstrang-ODNs in einen Reporter-Gegenstrang und einen Fänger-Gegenstrang untersucht. Ersterer wurde komplementär zur Sequenz des Reporter-Konjugats und eines reporterseitigen Teils

der miRNA, letzterer komplementär zur Sequenz des anderen Teils der miRNA und des Fänger-Oligonukleotids konzipiert. Dadurch war es nun möglich, das Reporter-Konjugat über die Ziel-Nukleinsäure an das zugehörige Fänger-Oligonukleotid zu ligieren (Abbildung 37A), ohne gleichzeitig an „negativen“ Sensoren Hybridisierungsstellen für das Konjugat zu schaffen (Abbildung 38A). Die Notwendigkeit eines effektiven Abschmelzens bereits hybridisierter Gegenstränge oder Reporter-ODNs bei Abwesenheit der Ziel-Nukleinsäure sollte so umgangen werden.

Um die Komplexität der Bildung des Hybridisierungskonstruktes zu verringern, wurden bei der sogenannten Sandwich-Ligations-Methode sowohl die reporterseitigen als auch die fängerseitigen Assay-Komponenten als Doppelstränge eingesetzt. Die Reporter-Komponente bestand aus dem Enzym-Konjugat und dem spezifischen Reporter-Gegenstrang, während die Fänger-Komponente vor dem Spotting aus dem Immobilisierungsstrang und dem spezifischen Fänger-Gegenstrang hergestellt wurde (siehe Abschnitt 3.3.1.2).

Folgendes Gesamt-Konzept wurde für die Durchführung der Messmethode entworfen:

Im ersten Schritt des Assays findet die Hybridisierung aller beteiligten Nukleinsäure-Komponenten statt (Abbildung 37A). Nach einem milden Waschschrift wird die Ziel-Nukleinsäure beidseitig so ligiert, dass dadurch die Esterase 2 kovalent an das immobilisierte Fänger-Oligonukleotid gebunden wird (Abbildung 37B). Schließlich werden unspezifisch gebundene und überschüssige Moleküle für die Messung von der Chipoberfläche entfernt (Abbildung 37B►C). Ist die passende Ziel-Nukleinsäure nicht in der Hybridisierungslösung vorhanden, kann sich das Hybridisierungskonstrukt im ersten Schritt nicht formieren und es findet keine Bindung des Reporter-Konjugats an das immobilisierte Fänger-Oligonukleotid statt (Abbildung 38A). Unspezifisch gebundene Assay-Komponenten oder Probenmaterial werden spätestens im letzten Waschschrift abgelöst (Abbildung 38B►C).

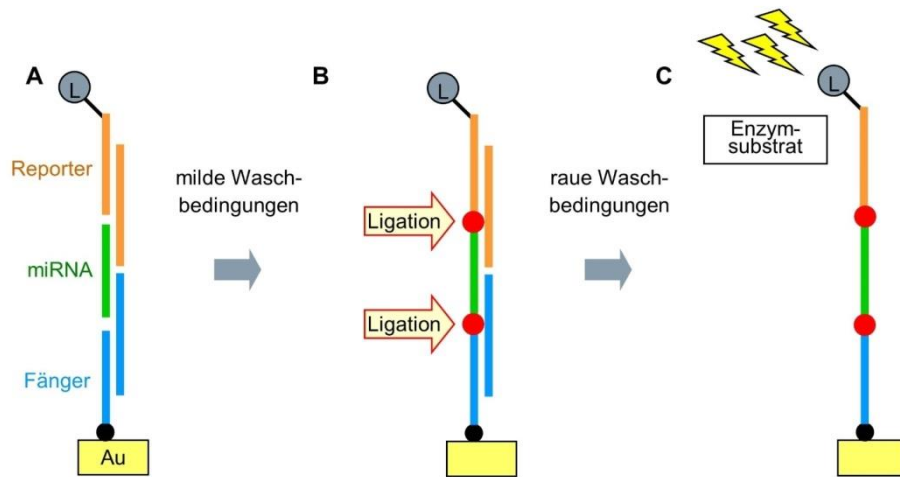


Abbildung 37: Schematische Darstellung der Sandwich-Ligations-Methode zur Detektion von miRNAs. Die Ziel-Nukleinsäure bildet zusammen mit den doppelsträngigen Fänger- und Reporter-Komponenten einen stabilen Hybridisierungskomplex (A). Nach einem Waschschrift wird die miRNA mit einem Ende an den benachbarten Strang der Reporter-Komponente, der mit dem Reporterenzym konjugiert ist, und mit dem anderen Ende an den benachbarten Strang der Fänger-Komponente, dessen Thiol-Gruppe an die Goldoberfläche gebunden ist, ligiert (B). Das nun kovalent an den Thiol-Fängerstrang gebundene Reporterenzym wird beim folgenden Waschschrift unter rauen Bedingungen nicht von der Sensoroberfläche entfernt und führt zu einer Steigung des Stromflusses bei Substratzugabe (C). L: Label, EST2; Enzymsubstrat: pAPB; Au: Goldelektrode.

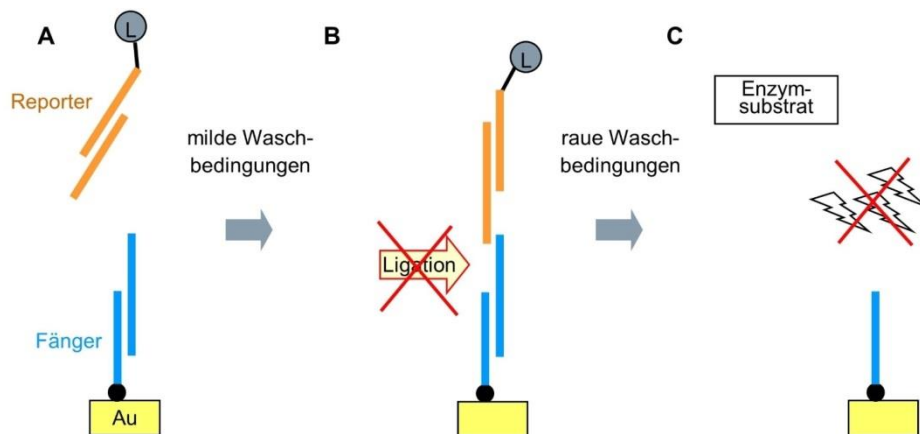


Abbildung 38: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs der Sandwich-Ligations-Methode in Abwesenheit der passenden Ziel-Nukleinsäure. Ohne zugehörige miRNA kann die doppelsträngige Reporter-Komponente nicht spezifisch an die immobilisierte Fänger-Komponente binden und es erfolgt auch keine Ligation (A,B). Während des rauen Waschschrifts vor der Messung werden unspezifisch gebundene Moleküle, einschließlich der Reporter-Komponenten, entfernt. L: Label, EST2; Enzymsubstrat: pAPB; Au: Goldelektrode.

4.2.3.1 Oligo-Design

Bei der Sandwich-Ligations-Methode haben der doppelsträngige Fänger und das doppelsträngige Reporter-Konjugat je einen Überhang, der mit der Ziel-Nukleinsäure hybridisiert. Beide Überhänge zusammen ergeben die komplette Komplementärsequenz der Ziel-Nukleinsäure, so dass beim Design der zu

verwendenden Oligo-Nukleotide die Basen der Ziel-Nukleinsäure auf den Fänger- und den Reporter-Überhang aufgeteilt werden mussten. Die Stelle, an der der Reporter-Teil des Komplementärstrangs in den Fänger-Teil übergeht, wurde als „Nick“-Position bezeichnet (Abbildung 39). Diese Position wurde zunächst über Kalkulationen der Schmelztemperaturen der Überhänge ermittelt. Dabei wurde ein Kompromiss aus einem möglichst kleinen Unterschied zwischen den Schmelztemperaturen der beiden Überhänge (ΔT_m) und einer Schmelztemperatur des Fänger-Überhangs ($T_m(F)$) von mindestens 37°C (=Ligations-Temperatur) als Entscheidungskriterium festgelegt. Da die Fänger-Komponente immobilisiert ist, wurde ihre Affinität zur Ziel-Nukleinsäure als höhere Priorität eingestuft als die der Reporter-Komponente. Später wurde der Einfluss der „Nick“-Position auf die Detektionsperformance genauer untersucht (siehe Abschnitt 4.3.1.2). Informationen zu Zusammensetzung und Herstellung der verwendeten Assay-Komponenten sind in Tabelle 6 zu finden.

Tabelle 6: Detektionskomponenten Testpanel. Die Reporter-Komponenten-Mischung dsRa11-TP wurde durch ein *Annealing* von 2,7 μM Reporter-Konjugat EST2-Ra11 mit je 0,33 μM (dsRa11-TP_1) oder je 0,5 μM (dsRa11-TP_2) der spezifischen Reporterstränge (Gesamtkonzentration 2,66 bzw. 4 μM) in einem Gesamtansatz aus 1x T4 DNA Ligase Puffer hergestellt. $T_m(F)$: Schmelztemperatur des Fängerüberhangs. ΔT_m : Differenz aus den Schmelztemperaturen der spezifischen Überhänge.

Ziel-miRNA	SH-Strang	Spezifischer Fängerstrang	$T_m(F)[^\circ\text{C}]$	Spezifischer Reporterstrang	$\Delta T_m[^\circ\text{C}]$
miR-Alien1	B7	sFS_Alien1_B7	36,8	sRS_Alien1_Ra	1,3
miR-151	B1	sFS_151a_B1	37,6	sRS_151a_Ra	4,1
miR-142	B2	sFS_142_B2	33,3	sRS_142_Ra	15,2
miR-486	B3	sFS_486_B3	39,0	sRS_486_Ra	3,3
miR-16	B4	sFS_16_B4	38,2	sRS_16_Ra	2,4
miR-26a	B5	sFS_26a_B5	38,5	sRS_26a_Ra	12,9
miR-93	B6	sFS_93_B6	40,6	sRS_93_Ra	0,6
miR-92a	B8	sFS_92a_B8	41,4	sRS_92a_Ra	2,8

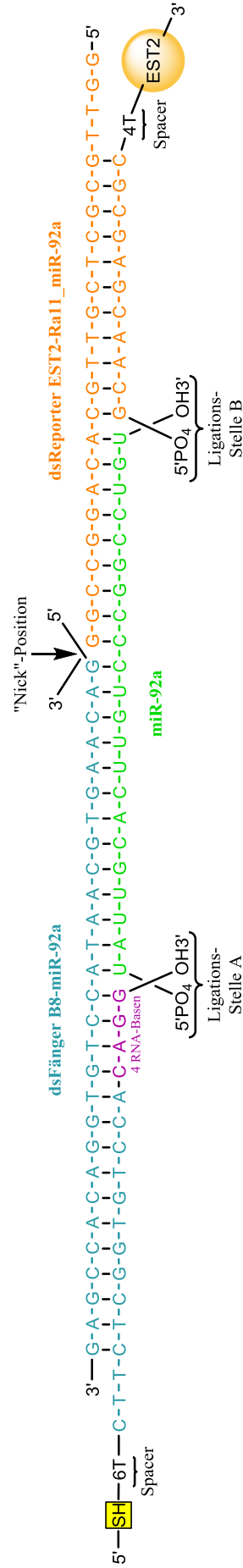


Abbildung 39: Oligodesign für die Detektion der miRNA miR-92a mit der Sandwich-Ligations-Methode. Die Sequenzen der doppelsträngigen Fänger-Komponente B8-miR-92a (Tabelle 6), der doppelsträngigen Reporter-Komponente Ra11-miR-92a und der Ziel-Nukleinsäure miR-92a sind in Form des konzeptionellen Hybridisierungskonstrukts dargestellt. Die RNA-Nukleotide des chimären Immobilisierungsstrangs der Fänger-Komponente, die für eine erfolgreiche Ligation an Stelle A erforderlich sind, sind violett gekennzeichnet. Die Spacer bestehen aus der angegebenen Anzahl an Thymin-Basen. Der Überhang am 5'-Ende des spezifischen Reporterstrangs ermöglicht die alternative Verwendung eines längeren Reporter-Konjugats bei der Herstellung der Reporter-Komponente. Die funktionellen Gruppen der zu ligierenden Nukleinsäure-Enden sind als Ligationsstellen A und B gekennzeichnet. An der „Nick“-Position des Hybridisierungskonstrukts ist die Komplementärsequenz zur Ziel-Nukleinsäure in einen Fänger- und einen Reporter-Überhang aufgeteilt. EST2: Esterase 2; PO₄: Phosphat-Gruppe; SH: Thiol-Gruppe.

4.2.3.2 Test und Performance des Detektionsprinzips

4.2.3.2.1 Sensitivität

Bei Tests mit synthetischen miRNAs konnten mit dieser Methode 10 pM Ziel-Nukleinsäure in der Hybridisierungslösung innerhalb von 30 min nachgewiesen werden. Aus der Messung von je 10 pM miR-26a und miR-92a resultierten Steigerungen von 0,102 nA/s und 0,080 nA/s, während der Kontrolldurchlauf ohne die beiden Nukleinsäuren Werte von 0,010 nA/s (miR-26a) und 0,002 nA/s (miR-92a) ergab (Abbildung 40). Der Fänger für die bei beiden Durchgängen in gleicher Konzentration (1 nM) vorhandene Kontroll-RNA miR-Alien1 und der miR-151a-spezifische Fänger B1-miR-151 bildeten dabei reproduzierbare Positiv- und Negativkontrollen.

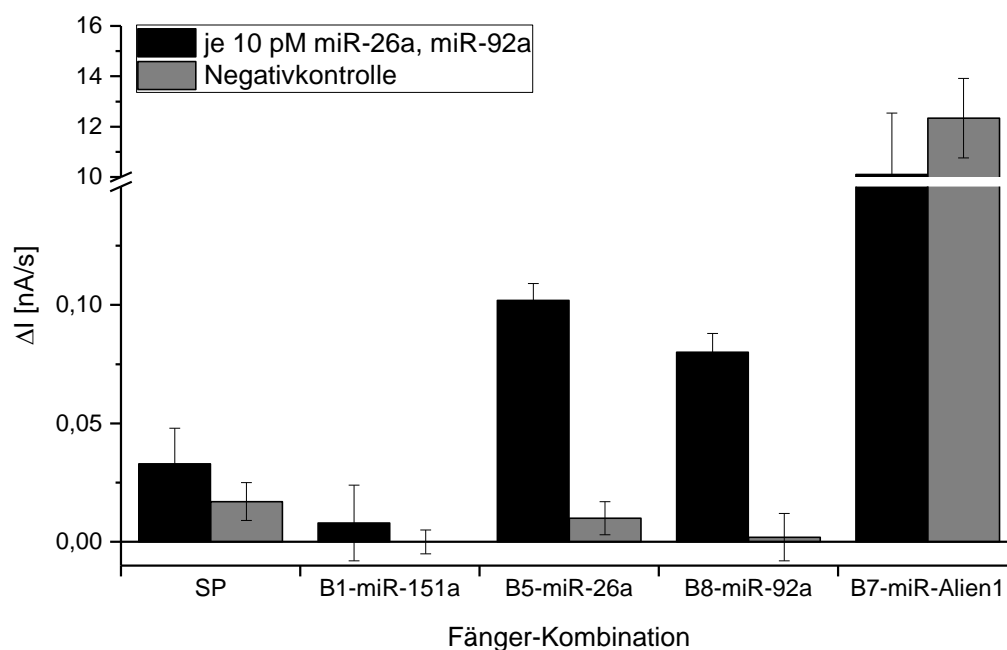


Abbildung 40: Messung sehr niedriger miRNA-Konzentrationen mit der Sandwich-Ligations-Methode. Es wurden zwei Versuche auf dem Auto-Reader mit der Sandwich-Ligations-Methode Variante 1 durchgeführt (Makrodatei: dsSandwichVar1-10 μ l). Das Proberöhrchen enthielt 1 nM miR-Alien1, je 5,6 nM der doppelsträngigen Reporter-Komponenten des Ansatzes dsRa11-TP_1 (**Tabelle 6**) und optional je 10 pM miR-26a und miR-92a in QLB mit 1 mg/ml BSA. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Signale ΔI aus je drei Wiederholungsmessungen (technische Replikate) für die Sensoren mit den angegebenen immobilisierten Fänger-Komponenten (vgl. **Tabelle 6**) und für eine Kontrollgruppe ohne immobilisierte Fänger (SP) nach Auswertung. Sensorpositionen: SP – Cluster 2, 13; B1-miR-151 – Cluster 5; B5-miR-26 – Cluster 9; B8-miR-92a – Cluster 12; B7-miR-Alien1 – Cluster 3, 11.

4.2.3.2.2 Multiplexfähigkeit

Zusätzlich zur Sensitivität sollte auch die Multiplexfähigkeit der Sandwich-Ligations-Methode untersucht werden. Dabei wurden der Hybridisierungslösung mit der miR-Alien1 Kontroll-Nukleinsäure (1 nM) in einem ersten Durchlauf je 1 nM von drei synthetischen miRNAs (Gruppe A: miR-151a, miR-16, miR-93) und in einem zweiten drei andere miRNAs (Gruppe B: miR-486, miR-26a, miR-92a) zugesetzt. Für die Messungen wurden CMOS-Chips mit gleichem Immobilisierungsmuster verwendet, die über Sensoren für alle eingesetzten miRNAs verfügten, und Reporter-Doppelstränge mit allen zugehörigen Überhängen. In beiden Assay-Läufen zeigten nur die Elektroden mit immobilisierten Fängern für die in der Hybridisierungslösung vorhandenen Nukleinsäuren hohe Signale (Abbildung 41; Gruppe A: B7-miR-Alien1 9,35 nA/s, B1-miR-151a 90,8 nA/s, B4-miR-16 3,76 nA/s, B6-miR-93 33,3 nA/s; Gruppe B: B7-miR-Alien1 9,46 nA/s, B3-miR-486 43,6 nA/s, B5-miR-26a 23,6 nA/s, B8-miR-92a 4,36 nA/s). Die Positionen ohne zugehörige Ziel-Nukleinsäuren lieferten dagegen leicht negative Steigungen ΔI (Gruppe A: B3-miR-486 -0,069 nA/s, B5-miR-26a -0,070 nA/s, B8-miR-92a -0,052 nA/s; Gruppe B: B1-miR-151a -0,130 nA/s, B4-miR-16 -0,105 nA/s, B6-miR-93 -0,007 nA/s). Dies zeigt, dass die Sandwich-Ligations-Methode sehr gut für Multiplex-Messungen geeignet ist.

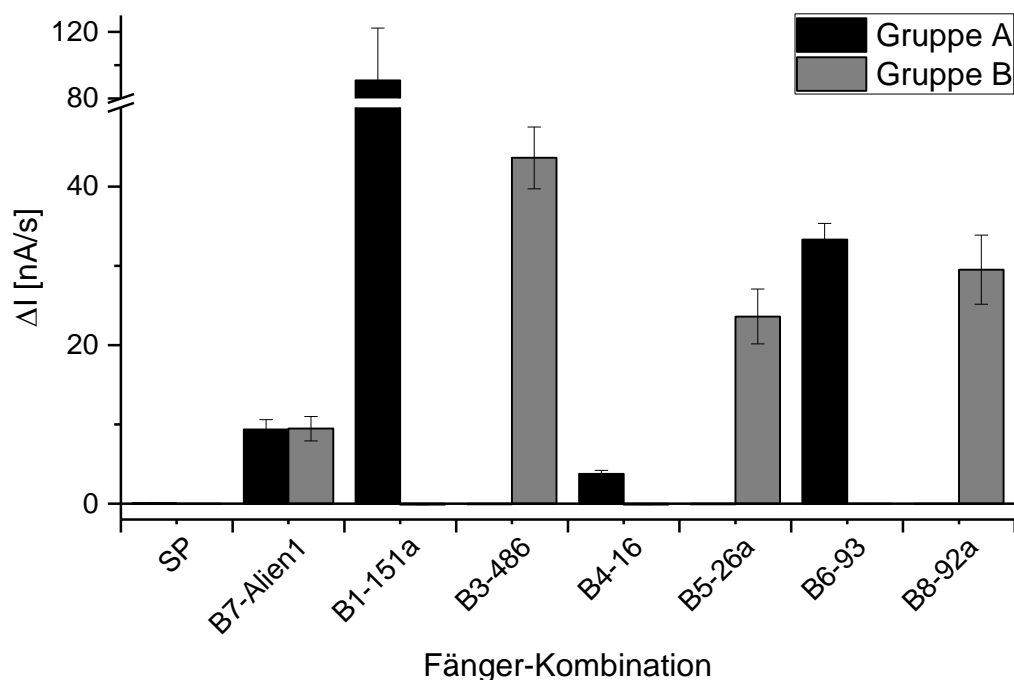


Abbildung 41: Multiplex-Versuche mit der Sandwich-Ligations-Methode. Zwei Gruppen mit je 3 synthetischen miRNAs (Gruppe A: miR-151a, miR-16, miR-93; Gruppe B: miR-486, miR-26a, miR-92a) wurden separat mit Variante 1 der automatischen Durchführung der Sandwich-Ligations-Methode auf CMOS-Chips derselben Immobilisierungschicht detektiert (Makrodatei: dsSandwichVar1-60 μ l). Je 1 nM der Ziel-Nukleinsäuren, je 5,6 nM der doppelsträngigen Reporter-Komponenten aus Ansatz dsRa11-TP_2 und 1 nM miR-Alien1 wurden als Probe in 5x SSC mit 1 mg/ml BSA, 0,05% (v/v) Tween 20 und 0,02% SDS vorgelegt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Signale ΔI aus je drei Wiederholungsmessungen (technische Replikate) für die Sensoren mit den angegebenen immobilisierten Fänger-Komponenten (vgl. **Tabelle 6**) und Sensoren ohne immobilisierte Nukleinsäuren (SP) nach Auswertung. Sensorpositionen: SP – Cluster 3, 14; B7-miR-Alien1 – Cluster 4, 13; B1-miR-151a – Cluster 5; B3-miR-486 – Cluster 7; B4-miR-16 – Cluster 8; B5-miR-26a – Cluster 9; B6-miR-93 – Cluster 10; B8-miR-92a – Cluster 11.

4.2.3.2.3 Spezifität

Die Spezifität von miRNA-Detektionsassays wird häufig anhand der Fähigkeit beurteilt, Mitglieder der let-7 miRNA-Familie, die eine hohe Sequenzähnlichkeit aufweisen, zu diskriminieren. Diese unterscheiden sich oft nur in 1-2 Basen und stellen daher gerade für hybridisierungsbasierte Methoden eine besondere Herausforderung dar. Daher wurde ein geeignetes Fänger-Reporter-Paar für die Detektion der miRNA let-7a designt und zusätzlich zur Messung der genau passenden Nukleinsäure eine Messreihe von verwandten synthetischen miRNAs mit besonders ähnlicher Sequenz (let-7b, let-7c, let-7f) bei identischen Versuchsbedingungen durchgeführt (Abbildung 42). Dabei wurde immer die gleiche Konzentration an synthetischer let-7-miRNA (1 nM) und miR-Alien1 Kontroll-RNA verwendet. Als Negativkontrolle dienten Sensoren, deren Fänger-Komponente für die

Detektion einer weiteren Alien-Nukleinsäure miR-Alien2 (\neq miR-Alien1) designt und zuvor auf ihre Funktionalität getestet worden war (nicht gezeigt).

```

let-7a  UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU
let-7b  UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
let-7c  UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU
let-7f  UGAGGUAGUAGA UUGUAUAGUU
    
```

Abbildung 42: Untersuchte Mitglieder der let-7-Familie. Die miRNAs let-7b, -7c und -7f unterscheiden sich nur durch die dunkel markierten Basen von der Sequenz der Referenz-Nukleinsäure let-7a.

Tabelle 7: Detektionskomponenten Spezifität. Die doppelsträngigen Reporter-Komponenten wurden einzeln durch *Annealing* von 0,7 μ M Reporter R11 mit 1 μ M spezifischem Reporterstrang in Hybridisierungspuffer Y hergestellt. $T_m(F)$: Schmelztemperatur des Fängerüberhangs. ΔT_m : Differenz aus den Schmelztemperaturen der spezifischen Überhänge.

Ziel-miRNA	Fänger	Spezifischer Fängerstrang	$T_m(F)[^\circ C]$	Spezifischer Reporterstrang	$\Delta T_m[^\circ C]$
let-7a	B1	sFS_let7a_B5	26,0	sRS_let7a_Ra	7,5
miR-Alien1	B7	sFS_Alien1_B7`	36,8	sRS_Alien1_Ra	1,3
miR-Alien2	A1	sFS_Alien2_A1	38,9	-	-

Die Messung der vollständig komplementären Ziel-Nukleinsäure let-7a lieferte eine Steigung ΔI von 3,77 nA/s (Abbildung 43). Die Signale der teilweise nur in einer Position verschiedenen miRNAs an den let-7a Sensoren lagen bei -0,036 nA/s (let-7b), 0,272 nA/s (let-7c) und -0,076 nA/s (let-7f). Abhängig von der Anzahl der Nukleotidpolymorphismen und deren Position innerhalb der let-7a-Detektionssequenz ergaben sich für die getesteten Mitglieder der let-7-Familie relative Signale in Höhe von 0% (let-7b, -7f) und 10% (let-7c) des let-7a-Referenzsignals (Tabelle, Abbildung 43).

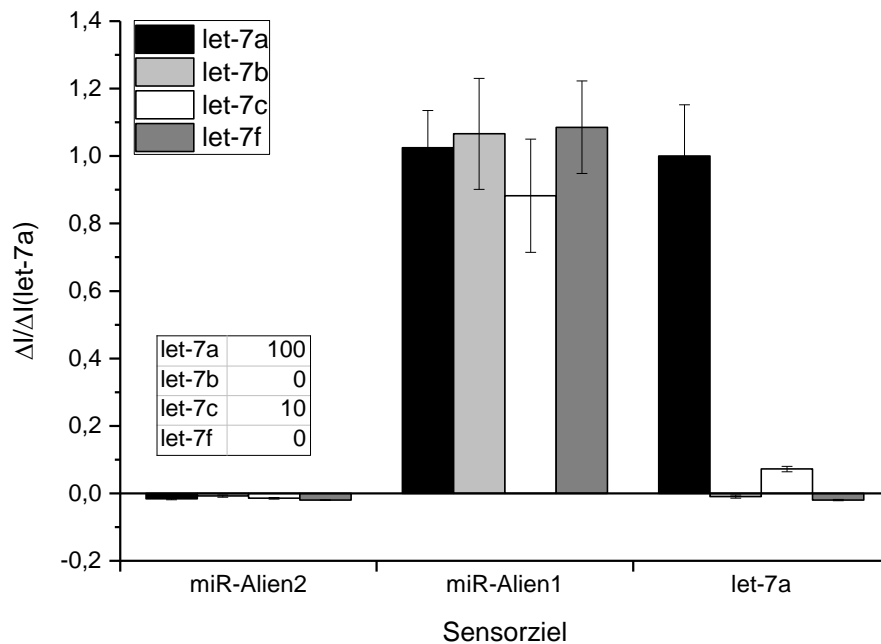


Abbildung 43: Bestimmung der Spezifität der Sandwich-Ligations-Methode mit Hilfe der let-7 miRNA-Familie. Variante 2 der automatischen Umsetzung der Sandwich-Ligations-Methode wurde mit 1 nM let-7a, let-7b, let-7c oder let-7f in der Probelösung durchgeführt. Außerdem enthielt jede Probe 1 nM miR-Alien1 und je 5,8 nM Reporter-Komponenten für let-7a und miR-Alien1 (Tabelle 7) in 2x SSC Puffer mit 0,05% (v/v) Tween 20. Als Systemflüssigkeit wurde 1x SSC Puffer verwendet. Es sind die ausgewerteten Mittelwerte und Standardabweichungen der Sensorsignale ΔI von je drei Wiederholungsmessungen pro Versuch (technische Replikate) für die Sensoren mit den Fänger-Komponenten für miR-Alien2 (Negativkontrolle), miR-Alien1 (Kontroll-RNA) und let-7a dargestellt. Die erhaltenen Mittelwerte der let-7a-Sensoren wurden zur besseren Vergleichbarkeit um den Wert der zugehörigen Negativkontrolle korrigiert, auf den der jeweiligen Kontroll-RNA normiert und anschließend durch das let-7a-Kontrollergebnis dividiert. Die so erhaltenen prozentualen Vergleichswerte sind in der Tabelle dargestellt. Sensorpositionen: miR-Alien2 – Cluster 4, 7, 10, 13; miR-Alien1 – Cluster 5, 8, 11; let-7a – Cluster 6, 9, 12.

4.2.3.3 Differenzierung von IsomiRs

Aus Sequenzierungsdaten geht hervor, dass die meisten miRNAs nicht nur in der kanonischen notierten Form vorkommen, sondern auch als verschiedene Varianten in Zellen vorhanden sind, sogenannten IsomiRs (Morin *et al.* 2008, Nygaard *et al.* 2009, Lee *et al.* 2010, Vaz *et al.* 2013). Zu den Veränderungen zählen dabei Verkürzungen am 5'-Ende (trimming) oder die Substitution von Nukleotiden innerhalb der miRNA-Sequenz (Nielsen *et al.* 2012). Die häufigsten Variationen sind jedoch Verkürzungen und Additionen am 3'-Ende der miRNAs (Seitz *et al.* 2008, Newman *et al.* 2011). Da eine gezielte Messung bestimmter IsomiRs einen Vorteil bei der diagnostischen Verwendung eines miRNA-Biomarker-Panels bedeuten könnte, sollte die Fähigkeit der Sandwich-Ligations-Methode, solche Variationen am 3'-Ende zu diskriminieren, untersucht werden. Bei der Bildung des Hybridisierungskonstrukts

würden Abweichungen der miRNA-Länge am 3'-Ende zu einer Lücke oder einem Überhang an der Ligationsstelle B führen (Abbildung 44A). Um diese Situation zu simulieren, wurde im folgenden Versuch die Sequenz des eingesetzten spezifischen Reporterstrangs variiert. Durch das Entfernen eines Nukleotids am 5'-Ende des Komplementärbereichs für die miRNA wurde so ein Überhang an der 3'-Ligationsstelle der Ziel-Nukleinsäure erzeugt. Entsprechend führte die Addition eines zusätzlichen Nukleotids an dieser Stelle zu einer Lücke zwischen dem 3'-Ende der miRNA und dem 5'-Ende des Enzym-Reporterstrangs. Als Fänger-Komponenten wurden die Kombinationen aus Tabelle 6 verwendet.

Tabelle 8: Reporterkomponenten IsomiR-Simulation. Die doppelsträngigen Reporter-Komponenten wurden einzeln durch *Annealing* von 0,7 µM Reporter EST2-Ra11 mit 0,5 µM des jeweiligen spezifischen Reporterstrangs und 0,5 µM sRS-Alien1_Ra in T4 DNA Ligase Puffer hergestellt.

Konstrukt	Spezifischer Reporterstrang
Kontrolle	sRS_93_Ra
Überhang	sRS_93_Überhang
Lücke	sRS_93_Lücke

Die Messungen von 1 nM miR-93 mit dem genau passenden Gegenstrang (Kontrolle), dem Überhang- oder dem Lücken-Konstrukt wurden jeweils auf die eingesetzte miR-Alien1 Kontroll-RNA (1 nM) normalisiert und anschließend untereinander verglichen, wobei die Kontrolle auf den Wert 1 gesetzt wurde. Daraus ergaben sich relative Signalintensitäten von 2% bei der Überhang-Ligation und 19% bei der Lücken-Ligation (Abbildung 44B), die die Detektion einer IsomiR mit einem angehängten bzw. einem getrimmten Nukleotid am 3'-Ende simulieren. Ein zusätzlicher Kontrollversuch mit dem genau passenden Gegenstrang, der ohne Ligase durchgeführt wurde, ergab ein mehr als zehnfach geringeres absolutes Messsignal an den miR-93-Sensoren verglichen mit der Überhang-Ligation (Daten nicht gezeigt). Dies unterstreicht die Vermutung, dass die Signale bei Verwendung des Lücken- und Überhang-Konstrukts durch mit verringerter Effizienz stattfindende Ligationereignisse entstehen.

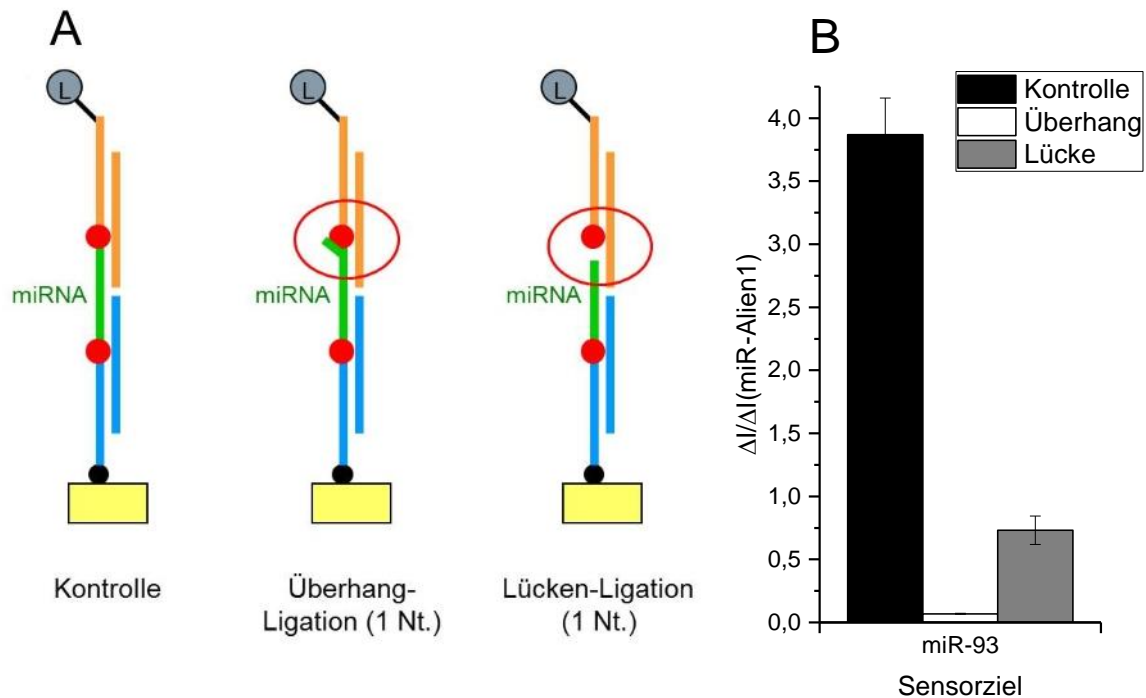


Abbildung 44: Simulation der Unterscheidung von IsomiRs mit Addition oder Deletion am 3'-Ende durch Variation der Reporterkomponente. A: Durch Einfügen oder Entfernen eines Nukleotids wurden zwei Reporter-Komponenten für die Detektion von miR-93 konstruiert, die bei Anwesenheit der Ziel-Nukleinsäure einen Überhang oder eine Lücke an der Ligationsstelle B (roter Kreis) des Hybridisierungskomplexes erzeugen. B: Die manuelle Version der Sandwich-Ligations-Methode wurde mit 1 nM miR-93 als Ziel-Nukleinsäure unter Verwendung von 5,6 nM der genau passenden Reporter-Komponente (Kontrolle), der Überhang-Komponente oder der Lücken-Komponente durchgeführt. Als Kontrollzugabe waren außerdem 1 nM miR-Alien1 und 5,6 nM der zugehörigen Reporter-Komponente in der Probelösung vorhanden. Die ausgewerteten Mittelwerte und Standardabweichungen der Signale ΔI der Sensoren mit den immobilisierten Fänger-Komponenten für die miR-93 Detektion wurden durch den jeweils zugehörigen Mittelwert der miR-Alien1-Sensorsignale dividiert. Sensorpositionen: miR-93 – Cluster 7, 10, 12; miR-Alien1 – Cluster 3, 8, 13.

4.2.3.4 Einsatz von bDNA zur Signalamplifikation

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es unter anderem, eine Detektionsmethode für miRNAs im POC-Bereich zu entwickeln, die ohne eine Amplifikation der Ziel-Nukleinsäure eine hohe Sensitivität erreicht. Durch Verwendung verzweigter Strukturen wie der sogenannten *branched DNA* (bDNA) ist es möglich, viele Enzyme an eine Reportersonde zu knüpfen und so das Messsignal pro detektiertes Ziel-Molekül zu verstärken (Urdea *et al.* 1991, Pachl *et al.* 1995). Dazu bindet an die spezifische Sonde ein Verstärker-Oligonukleotid, das mehrere kammähnliche Verzweigungen (engl. *branches*) aufweist (Horn *et al.* 1997). An jeden dieser DNA-Zweige können anschließend markierte Sonden hybridisiert werden, wodurch ein Cluster von Markierungen erzeugt wird.

Durch die Erweiterung des Amplifikationskonstrukts um einen Vorverstärker, der mehrere verzweigte DNA-Sonden bindet, und die gezielte Einführung künstlicher Isobasen in die Sequenzen der Assay-Komponenten konnte die Sensitivität und die Spezifität dieser Methode in weiteren Studien maßgeblich verbessert werden (Kern *et al.* 1996, Collins *et al.* 1997). Eine Übertragung der von Collins *et al.* beschriebenen Methode zur Bildung einer verzweigten DNA-Struktur auf den Sandwich-Ligations-Assay ermöglicht eine rechnerische Signalverstärkung von 420-fach.

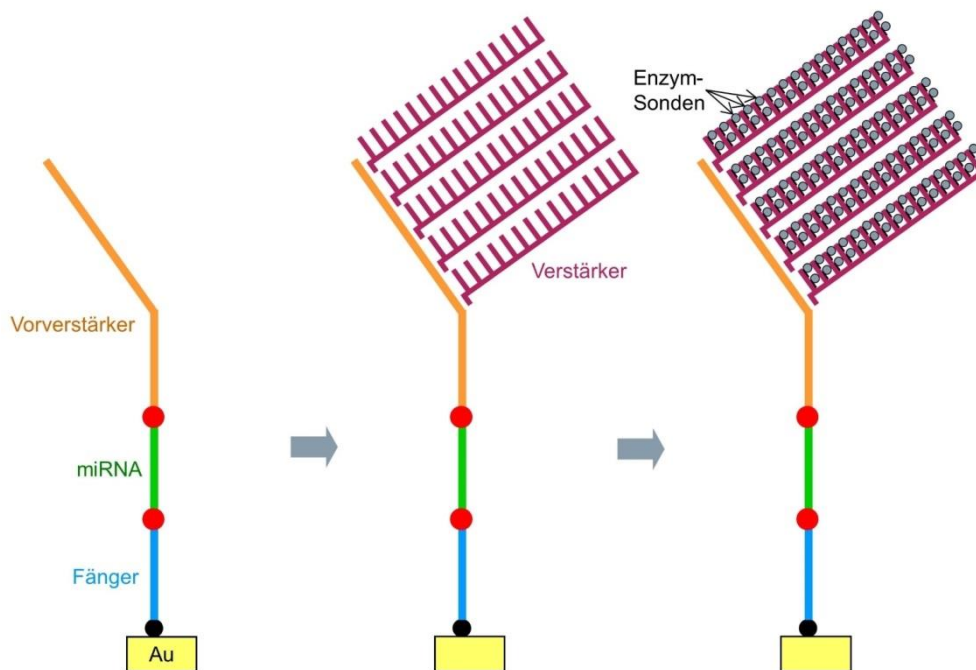


Abbildung 45: Schematische Darstellung des Einsatzes von bDNA zur Signalamplifikation. Der bDNA-Vorverstärker wird bei der Herstellung der doppelsträngigen Reporterkomponente anstelle eines Enzym-Konjugats verwendet und entsprechend der Sandwich-Ligations-Methode über die Ziel-miRNA an den immobilisierten Fängerstrang ligiert (vgl. Abbildung 37). Dann wird der bDNA-Komplex durch Zugabe der verzweigten Verstärker-Nukleinsäuren und anschließender Hybridisierung der Enzym-Sonden aufgebaut. So können rechnerisch über ein Molekül der Ziel-Nukleinsäure mehr als 400 Reporterenzyme an die Sensoroberfläche gekoppelt werden. Enzym: Alkalische Phosphatase; Au: Goldelektrode.

Um diese Möglichkeit der Sensitivitätssteigerung zu untersuchen, wurde das in der Publikation beschriebene Vorverstärker-Oligonukleotid am 5'-Ende phosphoryliert und als Ligationstrang des doppelsträngigen Reporters eingesetzt. Nach der Ligation sollte nun das bDNA-Hybridisierungskonstrukt aus Verstärkersonden und enzymmarkierten Reportersonden (Alkalische Phosphatase) in zwei Schritten aufgebaut werden (Abbildung 45). Dazu wurde ein Protokoll entwickelt, das die nötigen Inkubations- und Waschschriffe aus der Publikation in die Sandwich-Ligations-Methode integriert und an die neuen Anforderungen wie kleine Volumina und schnelle Durchführung anpasst (siehe Abschnitt 3.4.4.4).

4.2.3.4.1 Oligo-Design

Bei Verwendung von bDNA wurde das Esterase-Reporter-Konjugat als Teil des doppelsträngigen Reporters durch einen Vorverstärker-Strang ersetzt. Da dieser mit bereits vorgegebener Sequenz bezogen wurde, musste der Überhang-Strang, der die Spezifität des doppelsträngigen Reporters für die Ziel-Nukleinsäure festlegt, entsprechend angepasst werden (Abbildung 46). Die zum Vorverstärker gehörigen Verstärker- und Reporter-Sonden wurden nicht modifiziert.

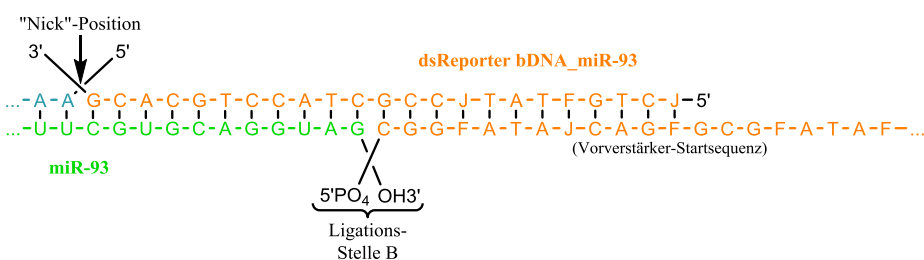


Abbildung 46: Änderung des Oligodesigns für die Sandwich-Ligations-Methode bei Verwendung von bDNA am Beispiel der Ziel-Nukleinsäure miR-93. Da sich die Startsequenz des phosphorylierten bDNA-Vorverstärkers von der Sequenz der zuvor verwendeten EST2-Konjugate unterscheidet, musste der spezifische Strang der Reporter-Komponente entsprechend abgeändert werden. Es ist nur der betroffene Teil des konzeptionellen Hybridisierungskomplexes dargestellt (vgl. Abbildung 39). F: iso-dC; J: iso-dG.

Tabelle 9: Detektionskomponenten bDNA. Die Reporter-Komponenten-Mischung wurde durch ein *Annealing* von 0,66 µM phosphoryliertem Vorverstärker (Siemens, Versant) mit je 0,5 µM der spezifischen Reporterstränge in einem Gesamtansatz aus 1x T4 DNA Ligase Puffer hergestellt. $T_m(F)$: Schmelztemperatur des Fängerüberhangs. ΔT_m : Differenz aus den Schmelztemperaturen der spezifischen Überhänge.

Ziel-miRNA	Fänger	Spezifischer Fängerstrang	$T_m(F)[^{\circ}C]$	Spezifischer Reporterstrang	$\Delta T_m[^{\circ}C]$
miR-26a	B5	sFS_26a_B5	38,5	sRS_26a_bDNA	12,9
miR-93	B6	sFS_93_B6	40,6	sRS_93_bDNA	0,6

4.2.3.4.2 Test und Sensitivität der bDNA-Variante

Anhand einer Konzentrationskurve wurde die Leistungsfähigkeit des bDNA-Sandwich-Ligations-Assays untersucht. Dabei wurden sehr niedrige Konzentrationen von 0,1 – 100 pM miR-93 gemessen, wobei die Signale der leeren (SP) und der miR-26 Sensorpositionen als Kontrollwerte herangezogen wurden. In der grafischen Darstellung ist ein etwas abgeflachter Anstieg des Positivsignals von 0,226 nA/s bei 0,1 pM über 0,786 nA/s bei 1 pM bis 4,16 nA/s bei 10 pM miRNA-93 Konzentration zu sehen (Abbildung 47), der dann in einen linearen Bereich mit gutem Dynamikumumfang übergeht (100 pM: 29,0 nA/s). Der 0 M miR-93 Kontrollwert wurde bei einer Messung von 10 pM miR-26a ermittelt (siehe unten) und liefert zusammen

mit der dreifachen Standardabweichung eine Kennlinie für das Signal an der unteren Nachweisgrenze von 0,126 nA/s (Abbildung 47).

Um größere Sicherheit für eine Aussage über die Nachweisbarkeit von 0,1 pM Ziel-Nukleinsäure zu erhalten, wurde diese Messung wiederholt und beide Ergebnisse zusammen mit dem Kontrollwert (10 pM miR-26a) im Detail dargestellt (Abbildung 48). Beim zweiten Durchlauf lag das Positivsignal für 0,1 pM miR-93 bei 0,291 nA/s und damit reproduzierbar oberhalb der Kontrolle (0,087 nA/s). Der Positiv-Wert für die Messung von 10 pM miR-26a lag mit 2,11 nA/s in der gleichen Größenordnung wie bei der Detektion der gleichen Menge miR-93 (siehe oben).

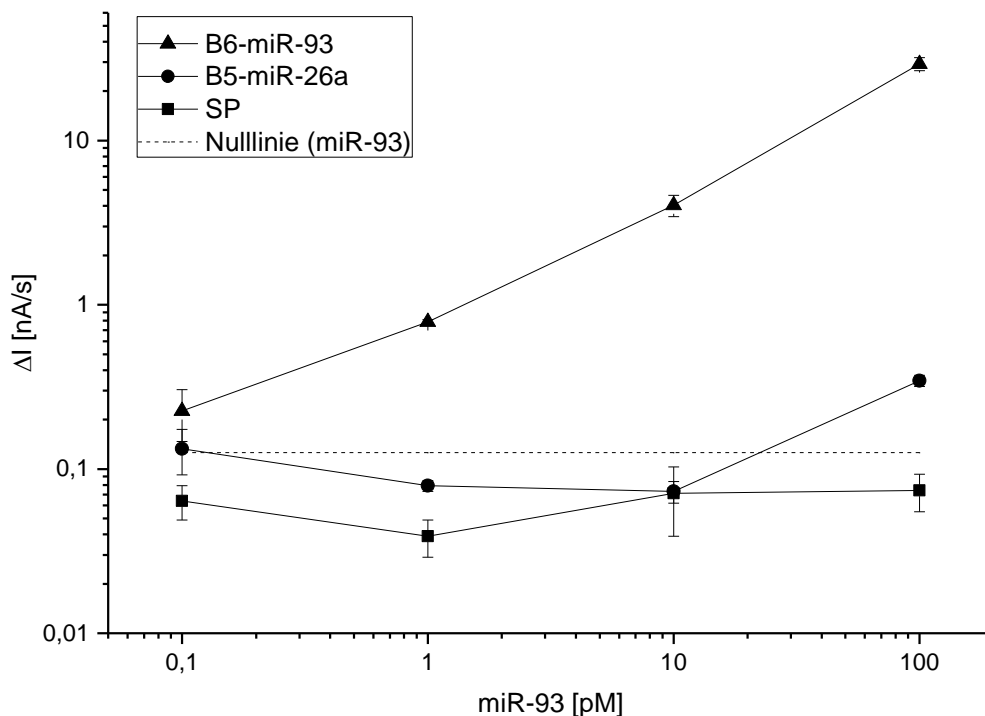


Abbildung 47: Messung einer Konzentrationsreihe mit einer Kombination aus Sandwich-Ligations-Methode und bDNA-Signalamplifikation. Es wurde eine Konzentrationsreihe für die Ziel-Nukleinsäure miR-93 mit der bDNA-Variante der Sandwich-Ligations-Methode auf dem QuickLab-Gerät durchgeführt. Für jede miR-93 Konzentration wurde ein neuer CMOS-Chip derselben Immobilisierungscharge verwendet und es wurden bDNA-Reporter-Komponenten für die Detektion von miR-93 und miR-26a (Tabelle 9) eingesetzt. Die ausgewerteten Mittelwerte und Standardabweichungen der Sensorsignale ΔI von je drei Wiederholungsmessungen pro Konzentration (technische Replikate) sind in Abhängigkeit von der eingesetzten miR-93-Konzentration für die Sensoren mit den immobilisierten Fänger-Komponenten zur Detektion von miR-26a und miR-93 dargestellt sowie für eine Kontrollgruppe ohne immobilisierte Nukleinsäure (SP). Die Nulllinie markiert den ausgewerteten Signalwert für die miR-93 Sensorgruppe bei einer Kontrollmessung mit 0 M miR-93 und 10 pM miR-26a zuzüglich der dreifachen Standardabweichung (MW+3xSD). Sensorpositionen: SP – Cluster 3, 13; miR-26a – Cluster 10; miR-93 – Cluster 11.

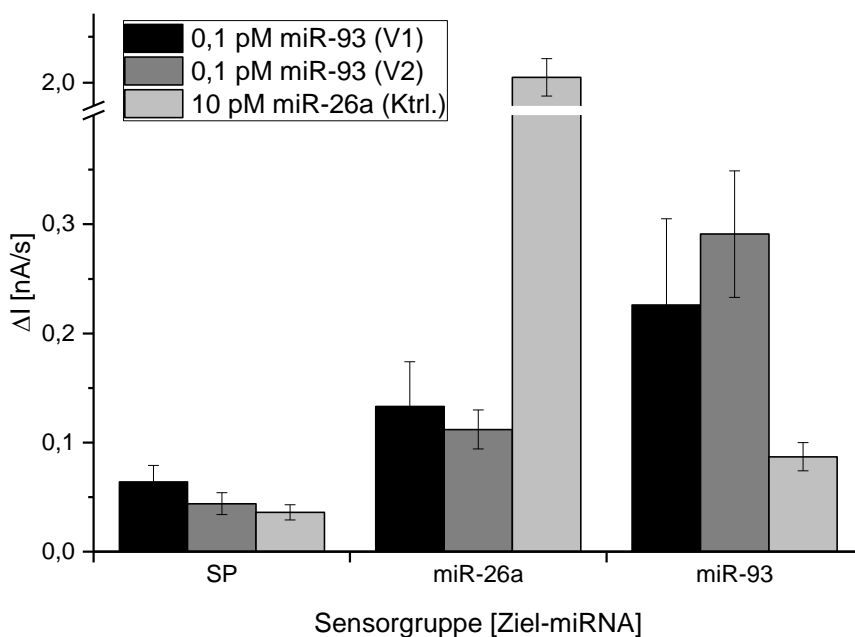


Abbildung 48: Sensitivität der Sandwich-Ligations-Methode bei Verwendung von bDNA zur Signalamplifikation. Die Messung von 0,1 pM miR-93 wurde wie in Abbildung 47 beschrieben auf einem CMOS-Chip einer anderen Immobilisierungschicht wiederholt (V2). Die ausgewerteten Mittelwerte und Standardabweichungen der Sensorsignale der 10 pM miR-26a Kontrollmessung und der 0,1 pM miR-93 Messung (V1) aus der Konzentrationsreihe (siehe Abbildung 47) sind zusammen mit dem Ergebnis der Wiederholung der 0,1 pM miR-93 Messung (V2) für Sensoren mit den immobilisierten Fänger-Komponenten zur Detektion von miR-26a und miR-93 sowie für Kontrollpositionen ohne immobilisierte Fängernukleotide (SP), in einem Balkendiagramm dargestellt. Sensorpositionen: SP – Cluster 3, 13; miR-26a - Cluster 10; miR-93 - Cluster 11.

Aufgrund von Problemen bei der Automatisierung und Reproduzierbarkeit der bDNA-Methode sowie der höheren Durchlaufzeit der Assays, wurde für die Validierung der Sandwich-Ligations-Methode als POC-Lösung durch die Quantifizierung endogener miRNAs in den folgenden Versuchen wieder das Esterase-Konjugat eingesetzt und auf eine Reporter-Amplifikation verzichtet.

4.3 Quantifizierung endogener miRNAs mit der Sandwich-Ligations-Methode

Die Anwendbarkeit der in dieser Arbeit entwickelten Methode zur Detektion kleiner Nukleinsäuren sollte anhand einer schnellen Quantifizierung endogener miRNAs eines festgelegten Panels gezeigt werden. Dieses miRNA-Panel sollte später auch zur vergleichenden Untersuchung von RNA-Extrakten aus Vollblut von AMI-Patienten und entsprechenden Kontrollen mit der Sandwich-Ligations-Methode eingesetzt werden. Zusammen mit der AG Meder des Universitätsklinikums Heidelberg wurden

daher miRNAs als Kandidaten für dieses kardiale Panel ausgewählt, die in vorausgegangenen Studien als mögliche Marker für Herzerkrankungen auftraten. Dabei wurde auf Ergebnisse in Heidelberg durchgeführter Studien und einige interne Sequenzierungsdaten aus entsprechenden Vergleichsexperimenten zurückgegriffen (Meder *et al.* 2011, Vogel *et al.* 2013a). Die ausgewählten miRNAs sind in Tabelle 10 gelistet.

4.3.1 Etablierung und Optimierung eines kardialen miRNA-Panels

Aus der Kandidatenliste ergaben sich durch die Notationen in der miRBase Datenbank (Griffiths-Jones *et al.* 2006) die kanonischen Sequenzen der zu messenden miRNAs (Tabelle 10). Als Variablen für das Design der Detektionskomponenten für die Sandwich-Ligations-Methode mussten nun folgende Aspekte betrachtet werden: Welche Fänger-miRNA-Kombinationen liefern das beste Ergebnis? An welcher Stelle der Komplementärsequenz zur jeweiligen miRNA führt der „Nick“ zwischen dem spezifischen Fänger- und Reporter-Überhang zur besten Stabilität des Detektionskonstrukts und damit zur höchsten Sensitivität?

Tabelle 10: Kardiales miRNA-Panel. Es sind die zu detektierenden miRNAs des festgelegten Panels mit den zugehörigen kanonischen Sequenzen aus der miRBase-Datenbank aufgeführt.

Kandidat	Sequenz (5'→3')
miR-191	caa cgg aau ccc aaa agc agc ug
miR-145	guc cag uuu ucc cag gaa ucc cu
miR-181a	aac auu caa cgc ugu cgg uga gu
miR-425	aau gac acg auc acu ccc guu ga
miR-636	ugu gcu ugc ucg ucc cgc ccg ca
miR-15a	uag cag cac aua aug guu ugu g
miR-30c	ugu aaa cau ccu aca cuc uca gc
miR-362	aau ccu ugg aac cua ggu gug agu

Da eine Klärung dieser Fragen durch Berechnungen und Simulationen nicht möglich war, mussten entsprechende Testreihen durchgeführt werden. Die Überprüfung aller Kombinationsmöglichkeiten hätte jedoch den Rahmen dieser Arbeit deutlich überschritten, weshalb zunächst eine willkürliche Zuordnung der ersten sieben miRNAs zum etablierten Fänger-Satz B (siehe Abschnitt 4.2.2.4.2) erfolgte (7 miRNAs + miR-Alien1 = 8 Fänger). Die spezifischen Überhänge wurden zunächst auf der Grundlage von Schmelztemperatur-Berechnungen entworfen (siehe Abschnitt

4.2.3.1). Diese Start-Konfiguration wurde mittels Multiplex-Testmessungen überprüft. Komponentengruppen, die dabei eine schwächere Performance zeigten, wurden anschließend variiert und optimiert. Schließlich wurden die besten ermittelten Detektionskomponenten ausgewählt und als Standard-Konfiguration für die Multiplex-Messung des 8-miRNA-Panels und der beiden Kontrollen festgelegt.

4.3.1.1 Test eines Teil-Panels aus sieben miRNAs

Die bereits zuvor verwendete Kombination aus Fänger B7 und der Kontroll-RNA miR-Alien1 wurde beibehalten und die Fänger-Oligonukleotide B1-6 und B8 wurden der Reihe nach den Kandidaten der miRNA-Liste zugewiesen. Die Gegenstränge wurden so designt, dass der Unterschied zwischen den Schmelztemperaturen der beiden Überhänge ΔT_m möglichst klein war (siehe Abschnitt 4.2.3.1). Dabei stellte die Ziel-Nukleinsäure miR-30c eine Ausnahme dar, bei der die Kombination mit dem zweitkleinsten ΔT_m -Wert ($3,5^\circ\text{C}$ statt $3,1^\circ\text{C}$) gewählt wurde, um die Schmelztemperatur des Fänger-Überhangs zu erhöhen. Dadurch sollte die ungünstigere Hybridisierung zwischen immobilisiertem Fänger und miRNA gegenüber der Hybridisierung der miRNA mit dem frei beweglichen Reporter-Doppelstrang bevorteilt werden, ohne ΔT_m maßgeblich zu verschlechtern (Tabelle 11).

Tabelle 11: Detektionskomponenten Cardiac-Mix1 (CM1). Die CM1-Reporter-Mischung wurde durch ein *Annealing* von je $0,33 \mu\text{M}$ der spezifischen Reporterstränge (Gesamtkonzentration $2,66 \mu\text{M}$) mit $2,7 \mu\text{M}$ Reporter-Konjugat EST2-Ra11 in einem Gesamtansatz aus 1x T4 DNA Ligase Puffer hergestellt. ΔT_m : Differenz aus den Schmelztemperaturen des spezifischen Reporter- und Fängerüberhangs.

Ziel-miRNA	Fänger	Spezifischer Fängerstrang	Spezifischer Reporterstrang (CM1)	$\Delta T_m [^\circ\text{C}]$
miR-Alien1	B7	sFS_Alien1_B7	sRS_Alien1_Ra	1,3
miR-191	B1	sFS_191_B1	sRS_191_Ra	4,4
miR-181a	B2	sFS_181a_B2	sRS_181a_Ra	0,3
miR-425	B3	sFS_425_B3	sRS_425_Ra	2,1
miR-636	B4	sFS_636_B4	sRS_636_Ra	0,5
miR-15a	B5	sFS_15a_B5	sRS_15a_Ra	1,6
miR-145	B6	sFS_145_B6	sRS_145_Ra	2,8
miR-30c	B8	sFS_30c_B8_2	sRS_30c_Ra_2	3,5

Die so erhaltenen doppelsträngigen Fänger- und Reporter-Oligonukleotide wurden in zwei Multiplex-Messungen entsprechend Abschnitt 4.2.3.2.2 untersucht. Dabei wurden im ersten Versuch je 1 nM miR-Alien1, miR-181a, miR-636 und miR-145

eingesetzt, im zweiten Durchgang je 1 nM miR-Alien1, miR-191, miR-425, miR-15a und miR-30c. Die Kombinationen B1-miR-191, B2-miR-181a, B3-miR-425 und B6-miR-145 zeigten hohe Positivsignale von 30,6 nA/s, 85,2 nA/s, 24,5 nA/s und 38,9 nA/s, während die übrigen drei Zusammenstellungen mit 3,47 nA/s (B4-miR-636), 1,39 nA/s (B5-miR-15a) und 10,9 nA/s (B8-mir-30c) nur eine geringe Sensitivität erwarten lassen konnten (Abbildung 49). Die Optimierung der Detektionsperformance für einzelne miRNAs zur Generierung einer zufriedenstellenden Multiplex-Gesamt-Konfiguration wird im Folgenden anhand einzelner Beispiele dargestellt.

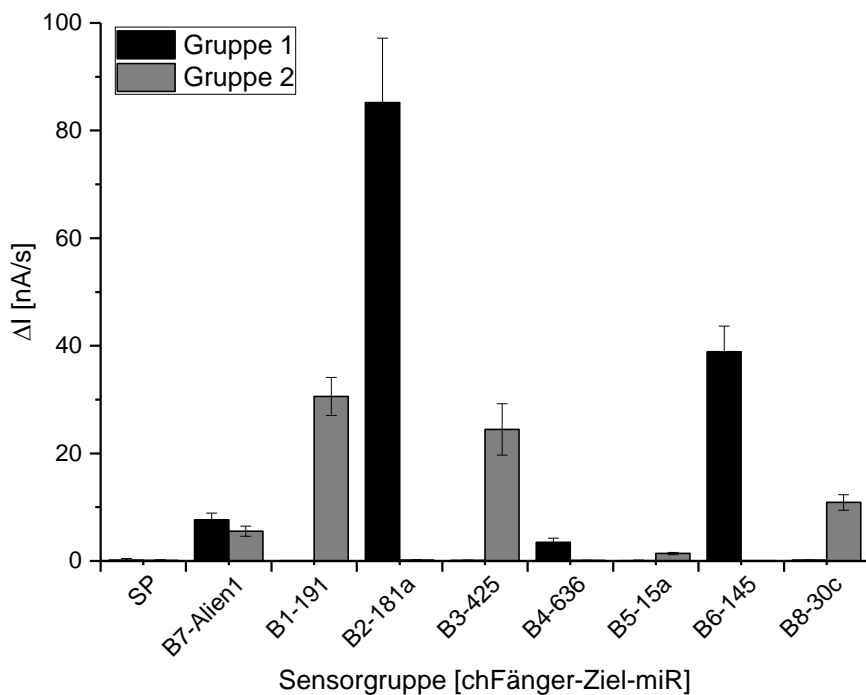


Abbildung 49: Detektion von 7 miRNAs eines Panels in zwei Multiplex-Messungen. Die Ziel-Nukleinsäuren wurden in zwei Gruppen (Gruppe 1: miR-181a, miR-636, miR-145; Gruppe 2: miR-191, miR-425, miR-15a, miR-30c) aufgeteilt und jede Gruppe separat mit Variante 1 der automatischen Durchführung der Sandwich-Ligations-Methode auf CMOS-Chips derselben Immobilisierungscharge detektiert. Je 1 nM der zur entsprechenden Gruppe gehörigen Ziel-Nukleinsäuren, 1 nM der Kontroll-RNA miR-Alien1 und je 5,6 nM der Reporter-Komponenten aus Ansatz CM1 (Tabelle 11) wurden in 5x SSC-Puffer mit 0,05% (v/v) Tween 20 im Proberöhrchen vorgegeben und die Makrodatei dsSandwichVar1-60µl verwendet. Die ausgewerteten Mittelwerte und Standardabweichungen der Signale aus je drei Wiederholungsmessungen (technische Replikate) für die Sensoren mit den angegebenen immobilisierten Fänger-Komponenten und Sensoren ohne immobilisierte Nukleinsäuren (SP) sind dargestellt. Sensorpositionen: SP – Cluster 3, 14; B7-miR-Alien1 – Cluster 4, 8, 13; B1-miR-191 – Cluster 5; B2-miR-181a – Cluster 6; B3-miR-425 – Cluster 7; B4-miR-636 – Cluster 9; B5-miR-15a – Cluster 10; B6-miR-145 – Cluster 11; B8-miR-30c – Cluster 12.

4.3.1.2 Variation der „Nick“-Position des Hybridisierungskonstrukts

Die „Nick“-Position, die durch die Aufteilung der miRNA-Komplementärsequenz auf die beiden spezifischen Überhänge bestimmt wird (vgl. Abbildung 39), wurde bei einzelnen miRNA-Hybridisierungskonstrukten variiert und die Ergebnisse miteinander verglichen, um bei Anwesenheit der Ziel-Nukleinsäure ein möglichst stabiles Detektionskonstrukt und damit ein hohes Positivsignal zu erhalten. Die Auswirkungen der Lokalisation des Gegenstrang-„Nicks“ sollen anhand zweier Beispiele – miR-30c und miR-15a – gezeigt werden.

Zu diesem Zweck wurden Chipmodule mit immobilisierten Fängern mit verschiedenen langen Überhängen für die gleiche miRNA vorbereitet und die zugehörigen Reporter-Komponenten hergestellt. Für miR-30c wurden vier Reporter-Fänger-Kombinationen so ausgewählt, dass die möglichen „Nick“-Positionen des Detektionskonstrukts im mittigen Bereich abgedeckt wurden (Tabelle 12, Tabelle 13). Während bei der Negativkontrolle alle Reporter-Doppelstränge ohne Ziel-Nukleinsäure eingesetzt wurden (dsR-30c_* (-)), wurde bei der Ermittlung der Positivsignale nur je eine der vier Reportervarianten zusammen mit 1 nM miRNA-30c verwendet. Dabei lieferte die Kombination Nr. 3 mit 42,6 nA/s das höchste Positiv-Ergebnis, während bei der Kontrollmessung für alle vier miR-30c-Reporter die unspezifische Antwort zwischen 0,004 nA/s und 0,011 nA/s, und damit in einem unproblematisch niedrigem Bereich lag (Abbildung 50). Die Kombination Nr. 1 zeigte ein Positivsignal von nur 12,8 nA/s, wodurch sich die dort gewählte „Nick“-Position als besonders destabilisierend für das Detektionskonstrukt erwies.

Tabelle 12: Nick-Variation miR-30c. Jede Komponentengruppe besteht aus einem doppelsträngigen Fänger mit B8 als Immobilisierungsstrang und einer doppelsträngigen Reporterkomponente dsR-30c_*, die durch *Annealing* von 0,7 µM Reporter EST2-Ra11 mit 1 µM des jeweiligen spezifischen Reporterstrangs in Hybridisierungspuffer Y hergestellt wurde. T_m(F): Schmelztemperatur des Fängerüberhangs. ΔT_m: Differenz aus den Schmelztemperaturen der spezifischen Überhänge.

Komponentengruppe	Spezifischer Fängerstrang	T _m (F)[°C]	Spezifischer Reporterstrang	ΔT _m [°C]
miR-30c_1	sFS_30c_B8_1	41,4	sRS_30c_Ra_1	13,6
miR-30c_2	sFS_30c_B8_2	37,6	sRS_30c_Ra_2	3,5
miR-30c_3	sFS_30c_B8_3	35,9	sRS_30c_Ra_3	3,1
miR-30c_4	sFS_30c_B8_4	31,6	sRS_30c_Ra_4	8,8

Ergebnisse

Tabelle 13: Sequenzvergleich der verschiedenen Fänger-Reporter-Kombinationen zur Detektion von miR-30c. Es sind nur die Sequenzen der spezifischen Überhangbereiche dargestellt (5'→3'). Von Kombination eins bis vier verschiebt sich die „Nick“-Position immer um genau ein Nukleotid.

sRS-Bezeichnung	Spez. Reporterüberhang	Spez. Fängerüberhang	sFS-Bezeichnung
sRS_30c_Ra_1	... GCT GAG AGT	GTA GGA TGT TTA CA ...	sFS_30c_B8_1
sRS_30c_Ra_2	... GCT GAG AGT G	TA GGA TGT TTA CA ...	sFS_30c_B8_2
sRS_30c_Ra_3	... GCT GAG AGT GT	A GGA TGT TTA CA ...	sFS_30c_B8_3
sRS_30c_Ra_4	... GCT GAG AGT GTA	GGA TGT TTA CA ...	sFS_30c_B8_4

Während sich Lücken zwischen dem Reporter- und Fänger-Überhang bei der Bildung des Hybridisierungsgebildes als nachteilig erwiesen (z.B. Kombination dsR-30c_2 mit sFS_30c_B8_3 (1 Nt.-Lücke): 17,0 nA/s statt 42,5 nA/s und 42,6 nA/s für die genau passenden Kombinationen Nr. 2 und 3), führten überschüssige Basen an der „Nick“-Position nur zu geringen Signaleinbußen (z.B. Kombination Nr. 4: 30,5 nA/s, dsR-30c_4 mit sFS_30c_B8_3 (1 Nt.-Überhang): 27,3 nA/s und dsR-30c_4 mit sFS_30c_B8_2 (2 Nt.-Überhang): 25,5 nA/s). Bei letzterer Situation bestimmt wohl der Reporter-Überhang die Position des „Nicks“ im Konstrukt, da er frei in der Flüssigkeit verfügbar ist, zeitlich früher mit der Ziel-Nukleinsäure in Kontakt kommt (beim Ansetzen der Hybridisierungs-/Proben-Lösung) und damit als erstes mit der miRNA hybridisiert. Dies wird deutlich, wenn man die Signale der Kombinationen Nr. 2 und 3 mit den Werten der Überhang-Paarungen des Reporter dsR-30c_4 mit den entsprechenden Fängern vergleicht (Abbildung 50, Werte siehe oben). Trotzdem gibt es Fänger-Überhänge, die unabhängig vom Reporter-Überhang nur schwache Positivsignale generieren. So konnten bei Paarung des Immobilisierungsstrangs B8 mit dem spezifischen Fängerstrang sFS_30c_B8_1 für alle eingesetzten miR-30c-Reporter nur Signale von 6,98 nA/s bis 12,8 nA/s bei der Detektion von 1 nM miR-30c erzielt werden.

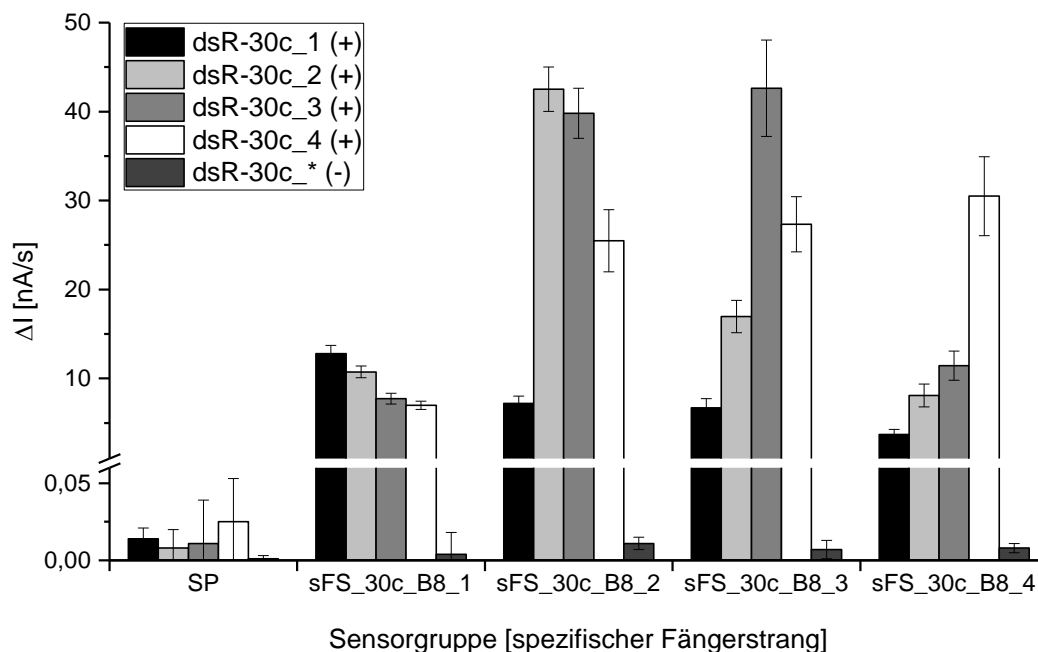


Abbildung 50: Variation der „Nick“-Position durch Verwendung von Reporter- und Fänger-Komponenten mit (spezifischen) Überhängen unterschiedlicher Länge. Pro doppelsträngige Reporter-Komponente (dsR-30c_1-4, **Tabelle 12**) wurde ein manueller Messdurchlauf mit 1 nM miR-30c (+) durchgeführt, und zusätzlich ein Kontrolllauf mit allen vier Reporter-Komponenten und ohne Ziel-Nukleinsäure (dsR-30c_*(-)). Die Reporterkomponenten wurden in einer Konzentration von je 11,7 nM eingesetzt und es wurden nur CMOS-Chips derselben Immobilisierungscharge verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Signale ΔI aus je drei Wiederholungsmessungen (technische Replikate) für die Sensoren mit den angegebenen bei der Herstellung der Fänger-Komponente verwendeten spezifischen Fängersträngen und Sensoren ohne immobilisierte Nukleinsäuren (SP) nach Auswertung. Sensorpositionen: SP – Cluster 4, 13; sFS_30c_B8_1 – Cluster 6, 10; sFS_30c_B8_2 – Cluster 5, 9; sFS_30c_B8_3 – Cluster 7, 11; sFS_30c_B8_4 – Cluster 8, 12.

Auch bei der Optimierung der Detektionskomponenten für miRNA-15a konnte bei der Änderung der „Nick“-Position ein starker Effekt beobachtet werden. Durch eine Verschiebung um ein Basenpaar wurde eine 3,5-fache Steigerung des auf die Kontroll-RNA normierten Positivsignals von 0,241 (Kombination Nr. 1) auf 0,854 (Kombination Nr. 2) erzielt (Abbildung 51). Auch hier führte ein 1bp-Überhang an der „Nick“-Stelle nur zu einem geringen Signalverlust (Kombination dsR-15a_1 mit sFS_15a_B5_2: 0,805), während sich eine Lücke zwischen den beiden hybridisierten Überhängen besonders destabilisierend auswirkte (Kombination dsR-15a_2 mit sFS_15a_B5_1: 0,009).

Ergebnisse

Tabelle 14: Alternative Detektionskomponenten. Die gelisteten alternativen Reporter-Komponenten (ARK) wurden in einem Ansatz durch *Annealing* von 1,3 μM EST2-Ra11 und je 0,5 μM der spezifischen Reporterstränge (Gesamtmenge 2 μM) in T4 DNA Ligase Puffer hergestellt. ΔT_m : Differenz aus den Schmelztemperaturen des spezifischen Reporter- und Fängerüberhangs.

Ziel-miRNA	Spezifischer Reporterstrang	ΔT_m [°C]
miR-15a	sRS_15a_Ra_2	8,6
miR-Alien1	sRS_Alien1_Ra	4,4
miR-636	sRS_636_Ra	0,5
miR-30c	sRS_30c_Ra_1	13,6

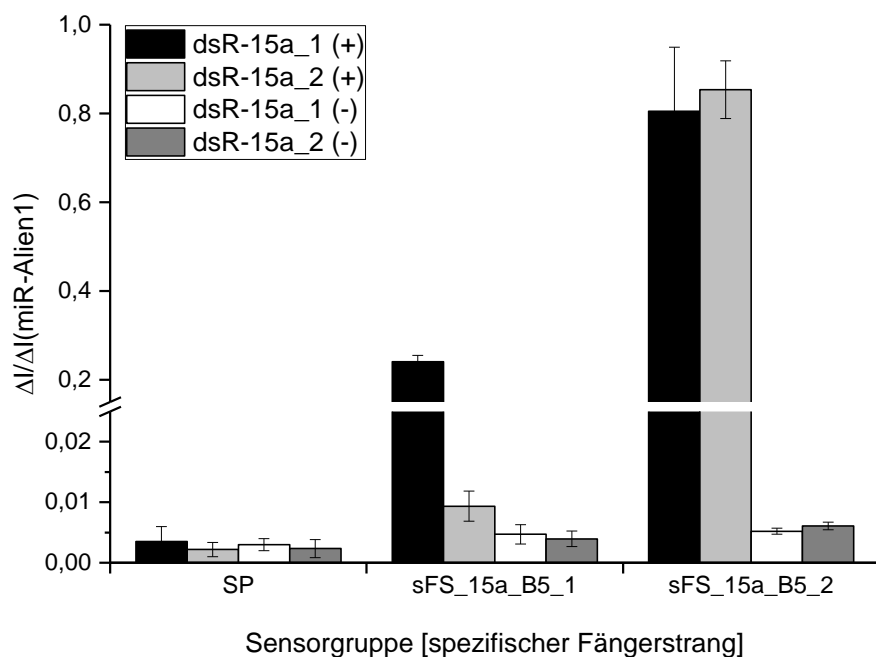


Abbildung 51: Variation der „Nick“-Position der Assay-Komponenten für die Detektion von miR-15a. Pro Reporter-Komponente (dsR-15a_1, dsR-15a_2) wurde jeweils ein manueller Messdurchlauf mit der passenden Ziel-Nukleinsäure 1 nM miR-15a (+) durchgeführt und eine Kontrolllauf mit 1 nM miR-30c (-). Die relevanten Reporter-Komponenten wurden in einer Konzentration von 5,6 nM als Teil der Reporter-Mischungen CM1 (dsR-15a_1, **Tabelle 11**) oder ARK (dsR-15a_2, **Tabelle 14**) eingesetzt und 1 nM miR-Alien1 als Kontroll-RNA zu den Proben gegeben. Es wurden nur CMOS-Chips derselben Immobilisierungscharge verwendet. Dargestellt sind die ausgewerteten Mittelwerte und Standardabweichungen der Signale ΔI aus je drei Wiederholungsmessungen (technische Replikate) für die Sensoren mit den angegebenen bei der Herstellung der Fänger-Komponenten verwendeten spezifischen Fängersträngen und Sensoren ohne immobilisierte Nukleinsäuren (SP). Die Werte wurden auf den Mittelwert der zugehörigen Kontroll-RNA miR-Alien1 normalisiert. Sensorpositionen: SP – Cluster 4, 14; sFS_Alien1_B7' – Cluster 3, 8, 13; sFS_15a_B5_1 – Cluster 12; sFS_15a_B5_2 – Cluster 7.

4.3.1.3 Zuordnung der Fängersequenzen

Als weitere Möglichkeit, die Performance der Detektion einer gegebenen miRNA zu optimieren, wurde eine Änderung der Fänger-miRNA-Paarung in Betracht gezogen. Um die Abhängigkeit des Positivsignals von der Sequenz des Fängers zu überprüfen, wurden 1 nM miR-15a auf einem Chip mit den chimären Fängern B1-B8

gemessen, die als Doppelstrang alle den gleichen Überhang (sFS_15a_B*_2) aufwiesen. Außerdem wurden auf einem anderen CMOS-Modul die Mitglieder des Chimär-Fänger-Satzes A als Immobilisierungs-Strang für die Detektion von miR-15a eingesetzt, wobei die Fängersequenzen A2 und A4 wegen ihrer Sequenzähnlichkeit zu den Fängern B2 und B4 nicht verwendet wurden. Um Effekte unspezifischer Interaktionen, die zu unerwünschten Hintergrundsignalen führen könnten, zu erkennen, wurde auch eine Kontrollmessung ohne Ziel-Nukleinsäure durchgeführt.

Die Signalunterschiede zwischen den einzelnen Chimär-Fängern des Sets A waren nur von geringem Ausmaß und im Bereich von 10,7 nA/s (A1) und 14,8 nA/s (A8) angesiedelt (Abbildung 52). Der positive Wert bei A8 zeigte jedoch auch eine erhöhte unspezifische Antwort von 0,25 nA/s bei der Leermessung.

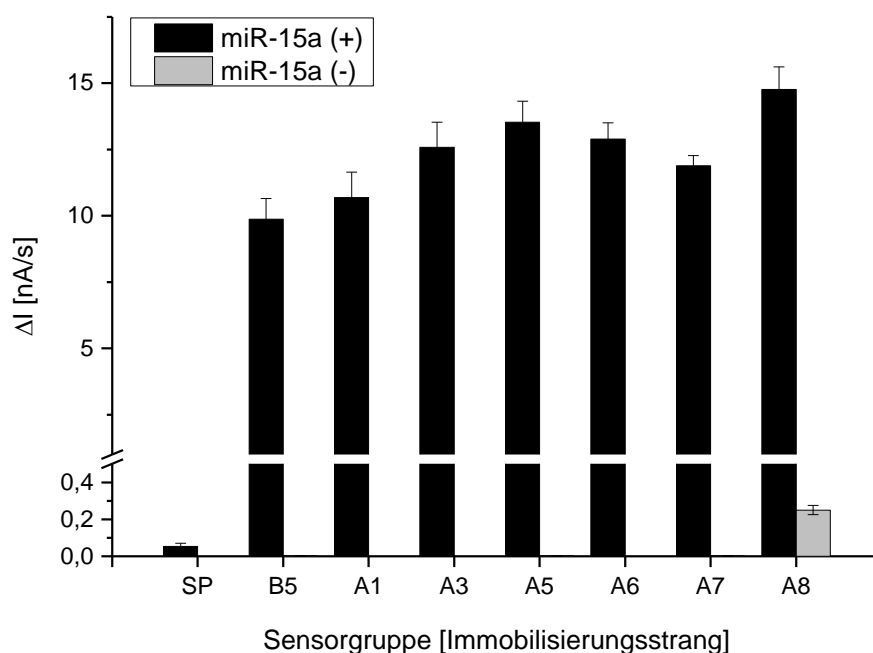


Abbildung 52: Verwendung verschiedener Immobilisierungsstränge des Chimär-Fänger-Satzes A zur Detektion von miR-15a. 1 nM miR-15a (+) und eine Kontrollprobe ohne Ziel-Nukleinsäure (-) wurden auf Chips derselben Immobilisierungscharge mit der manuellen Durchführung der Sandwich-Ligations-Methode detektiert. Die relevante Reporter-Komponente wurde in einer Konzentration von 5,6 nM als Teil der Reporter-Mischung ARK (Tabelle 14) eingesetzt. Die ausgewerteten Mittelwerte und Standardabweichungen der Signale ΔI aus drei Wiederholungsmessungen sind in Abhängigkeit vom bei der Herstellung der passenden miR-15a-Fänger-Komponente verwendeten chimären Immobilisierungsstrang für die entsprechenden Sensoren dargestellt. Die Kontrollsensoren SP sind ohne immobilisierte Ziel-Nukleinsäure. Sensorpositionen: SP – Cluster 4, 13; B5 – Cluster 5, 12; A1 – Cluster 6; A3 – Cluster 7; A5 – Cluster 8; A6 – Cluster 9; A7 – Cluster 10; A8 – Cluster 11.

Beim Chipmodul mit dem Fänger-Satz B zeigten sich dagegen deutlichere Unterschiede zwischen den getesteten Fängersequenzen: Hier reichten die Signale von 7,92 nA/s beim schwächsten Fänger B4 bis zu einem Maximalwert von 22,3 nA/s

bei Messung mit der Fängersequenz B8 (Abbildung 53). Leichte unspezifische Signale waren nur beim ohnehin ungeeigneten Fänger B4 messbar (0,072 nA/s).

Der auf beiden Chip-Varianten vorhandene miR-15a spezifische Fänger B5 lieferte bei beiden Messdurchläufen ein ähnlich starkes Signal (Satz A: 9,87 nA/s; Satz B: 8,61 nA/s) und stellte so die Vergleichbarkeit der Ergebnisse sicher.

Eine aus analog durchgeführten Experimenten für miR-425 erhaltene Kurve für den Fänger-Satz B zeigte einen ähnlichen Verlauf wie die für miR-15a (Abbildung 53). Bei der Fängersequenz B5 lag das Positivsignal für miR-425 mit 15,8 nA/s jedoch deutlich höher, ohne dass sich bei der Kontrollmessung problematische unspezifische Effekte zeigten. Die anfangs willkürlich entschiedene Zuordnung der Fänger für miR-15a und miR-425 wurde daher ausgetauscht, um die Gesamtperformance des Multiplex-Assays zu verbessern.

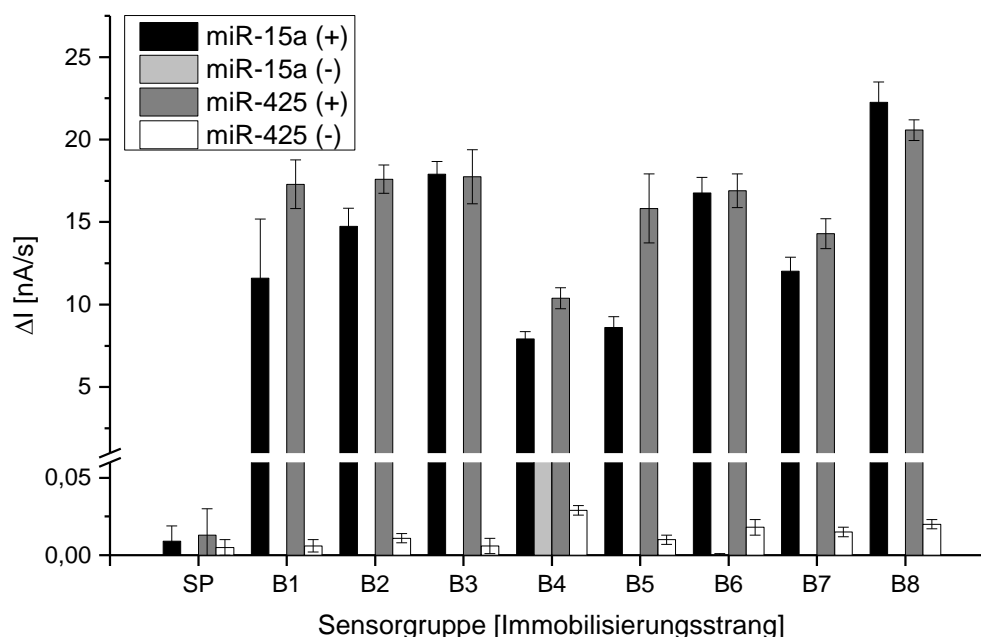


Abbildung 53: Verwendung verschiedener Immobilisierungsstränge des Chimär-Fänger-Satzes B zur Detektion von miR-15a und miR-425. Die Versuche gemäß Abbildung 52 wurden für miR-15a auf CMOS-Chips mit anderen Fänger-Komponenten wiederholt sowie für miR-425 auf Chips mit den entsprechenden zugehörigen Sensorpositionen durchgeführt. Für die Detektion von miR-425 wurden 5,6 nM der passenden Reporterkomponente als Teil der Reporter-Mischung CM1 (Tabelle 11) eingesetzt. Die ausgewerteten Mittelwerte und Standardabweichungen der Signale ΔI aus drei Wiederholungsmessungen sind in Abhängigkeit vom bei der Herstellung der jeweiligen passenden Fänger-Komponente verwendeten chimären Immobilisierungsstrang für die entsprechenden Sensoren dargestellt. Die Kontrollsensoren SP sind ohne immobilisierte Ziel-Nukleinsäure. Sensorpositionen: SP – Cluster 4, 13; B1 – Cluster 5; B2 – Cluster 6; B3 – Cluster 7; ... ; B8 – Cluster 12.

4.3.1.4 Performance des optimierten miRNA-Detektionspanels

Mit Hilfe der beschriebenen Möglichkeiten wurde schließlich ein optimierter Satz an Detektionskomponenten für das kardiale miRNA-Panel zusammengestellt (Tabelle 15), der später für die Messung endogener miRNAs aus Vollblut-Proben verwendet werden sollte. Er enthielt Reporter-Komponenten für die acht Ziel-miRNAs und die Kontroll-RNA miR-Alien1, die zugehörigen Fänger-Komponenten sowie einen doppelsträngigen Fänger für die konstruierte Ziel-Nukleinsäure miR-Alien2 als Negativkontrolle (siehe Abschnitt 4.2.3.2.3). Der Erfolg der Optimierungsmaßnahmen wurde in den folgenden Versuchen dokumentiert.

Tabelle 15: Detektionskomponenten Cardiac-Mix2 (CM2). Die CM2-Reporter-Komponenten wurden zunächst durch *Annealing* in Einzelansätzen aus 0,7 µM Reporter-Konjugat EST2-Ra11 und 1 µM des jeweiligen spezifischen Reporterstrangs hergestellt und anschließend zu einer Gesamtlösung vereinigt.

Ziel-miRNA	Fänger	Spezifischer Fängerstrang	Spezifischer Reporterstrang (CM2)
miR-Alien1	B7	sFS_Alien1_B7`	sRS_Alien1_Ra
miR-191	B1	sFS_191_B1`	sRS_191_Ra
miR-181a	B2	sFS_181a_B2	sRS_181a_Ra
miR-15a	B3	sFS_15a_B3_2	sRS_15a_Ra_2
miR-425	B5	sFS_425_B5	sRS_425_Ra
miR-145	B6	sFS_145_B6`	sRS_145_Ra
miR-30c	B8	sFS_30c_B8_3	sRS_30c_Ra_3
miR-636	A5	sFS_636_A5_3	sRS_636_Ra_3
miR-362	A6	sFS_362_A6	sRS_362_Ra
miR-Alien2	A1	sFS_Alien2_A1	-

Zur Überprüfung der Multiplex-Performance wurden die miRNAs des kardialen Panels zunächst in zwei Gruppen zu je vier Kandidaten aufgeteilt. Die miRNAs der einen Gruppe wurden in einem ersten Durchlauf bei einer Konzentration von je 100 pM gemessen und anschließend wurden je 100 pM der miRNAs der anderen Gruppe detektiert. Nur die in der Probelösung anwesenden Ziel-Nukleinsäuren führten jeweils zu einem hohen Signal (Abbildung 54, Gruppe A: B1-miR-191 11,7 nA/s, B3-miR-15a 7,45 nA/s, B6-miR-145 3,98 nA/s, A5-miR-636 10,0 nA/s; Gruppe B: B2-miR-181a 16,2 nA/s, B5-miR-425 8,65 nA/s, B8-miR-30c 20,3 nA/s, A6-miR-362 4,63 nA/s), während das höchste Negativsignal bei 0,089 nA/s lag (B6-miR-145 bei Messung von Gruppe B). Der Messwert der Kontroll-RNA lag mit 4,85 nA/s (Gruppe A) und 6,25 nA/s (Gruppe B) bei beiden Versuchen in einem ähnlichen Bereich. Diese Ergebnisse zeigen eine deutlich gleichmäßigere Multiplex-

Performance (vgl. Abbildung 49), die durch die vorgenommenen Optimierungen der Detektionskomponenten erreicht wurde.

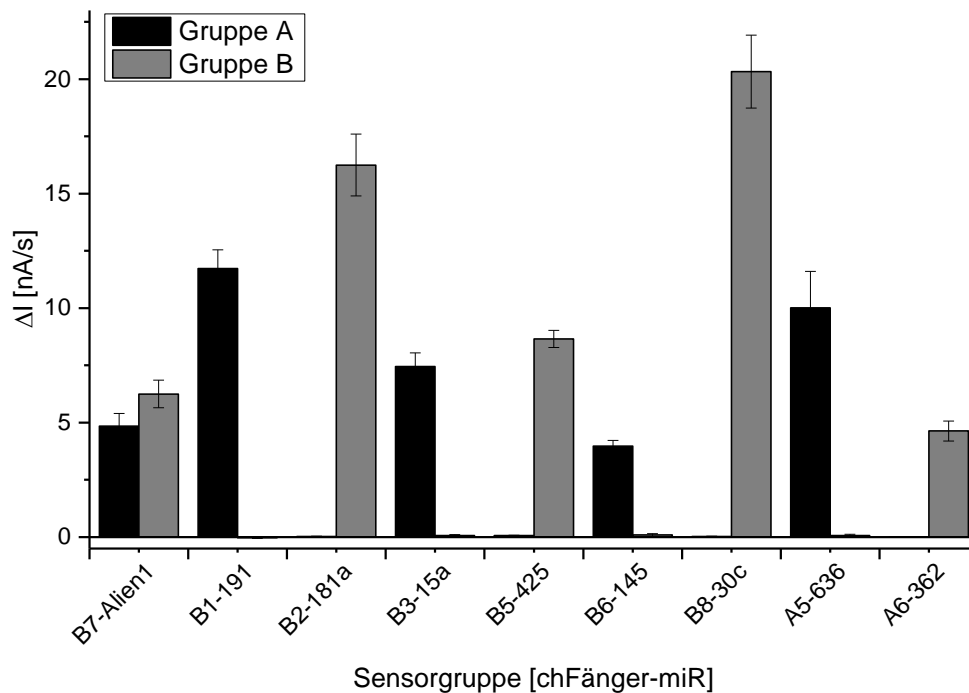


Abbildung 54: Multiplex-Performance der gewählten Assay-Komponenten für die Messung des kardialen miRNA-Panels. Die Ziel-Nukleinsäuren wurden in zwei Gruppen (Gruppe A: miR-191, miR-15a, miR-145, miR-636; Gruppe B: miR-181a, miR-425, miR-30c, miR-362) aufgeteilt und jede Gruppe separat mit Variante 2 der automatischen Durchführung der Sandwich-Ligations-Methode auf CMOS-Chips derselben Immobilisierungschicht detektiert. Je 100 pM der zur entsprechenden Gruppe gehörigen Ziel-Nukleinsäuren, 200 pM der Kontroll-RNA miR-Alien1 und je 5,8 nM der Reporter-Komponenten des CM2 (Tabelle 15) wurden in der Probelösung vorgegeben. Die ausgewerteten Mittelwerte und Standardabweichungen der Signale aus je drei Wiederholungsmessungen (technische Replikate) für die Sensoren mit den angegebenen immobilisierten Fänger-Komponenten sind nach Korrektur um den Mittelwert des zugehörigen Negativkontrollsignals (A1-miR-Alien2) dargestellt. Sensorpositionen: A1-miR-Alien2 – Cluster 3, 8, 14; B7-Alien1 – Cluster 2, 9, 15; B1-191 – Cluster 4; B2-181a – Cluster 5; B3-15a – Cluster 6; B5-425 – Cluster 7; B6-145 – Cluster 10; B8-30c – Cluster 11; A5-636 – Cluster 12; A6-362 – Cluster 13.

Der Multiplex-Doppelversuch wurde für weitere Konzentrationen der miRNAs zwischen 100 fM und 10 nM wiederholt und so schließlich für alle acht miRNAs des Panels ein Messdurchlauf pro Konzentrationsstufe ausgeführt. Die ermittelten Werte ergaben die in Abbildung 55 aufgetragene Kurvenschar. Diese gab Aufschluss über die Dynamik und die Sensitivität der Detektion der jeweiligen Ziel-Nukleinsäure bei Verwendung der optimierten Assay-Komponenten. Alle miRNAs zeigten einen linearen Signalanstieg im Bereich von 1 pM bis 1 nM.

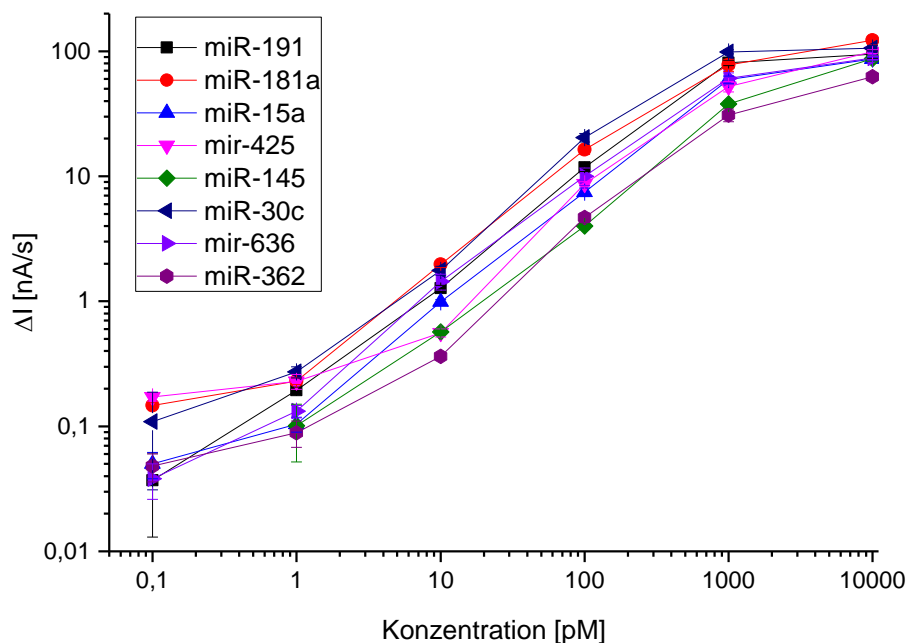


Abbildung 55: Messung von Konzentrationsreihen aller miRNAs des kardialen Panels im Multiplex-Verfahren. Je Konzentration wurden zwei Versuche mit je 4 Ziel-Nukleinsäuren gemäß Abbildung 54 durchgeführt. Die ausgewerteten Mittelwerte und Standardabweichungen der Sensorsignale ΔI von je drei Wiederholungsmessungen pro Versuch sind in Abhängigkeit von der eingesetzten miRNA-Konzentration für die Sensoren mit den zugehörigen immobilisierten Fänger-Komponenten (vgl. **Tabelle 15**) dargestellt. Sensorpositionen: miR-Alien2 – Cluster 3, 8, 14; miR-Alien1 – Cluster 2, 9, 15; miR-191 – Cluster 4; miR-181a – Cluster 5; miR-15a – Cluster 6; miR-425 – Cluster 7; miR-145 – Cluster 10; miR-30c – Cluster 11; miR-636 – Cluster 12; miR-362 – Cluster 13.

Die Messungen der miRNAs miR-30c und miR-191 zeigten besonders gute Ergebnisse bezüglich des dynamischen Messbereichs. Abbildung 56 zeigt die zugehörigen Messdaten nach weiterer Auswertung unter Einbezug der Negativkontrolle und der Kontroll-RNA miR-Alien1. Im unteren Messbereich ergab sich für miR-30c von 0,1 pM auf 1 pM Konzentration noch ein Signalanstieg um Faktor 2,4 und für miR-191 um Faktor 4,4.

Es wurde eine Leermessung ohne die acht miRNAs des kardialen Panels durchgeführt, um die tatsächliche Sensitivität des Detektionsassays abschätzen zu können. Mit Hilfe der Nulllinien ($MW+3xSD$) ist zu erkennen, dass die Nachweisgrenze für beide Ziel-Nukleinsäuren unter 1 pM liegt (Abbildung 56).

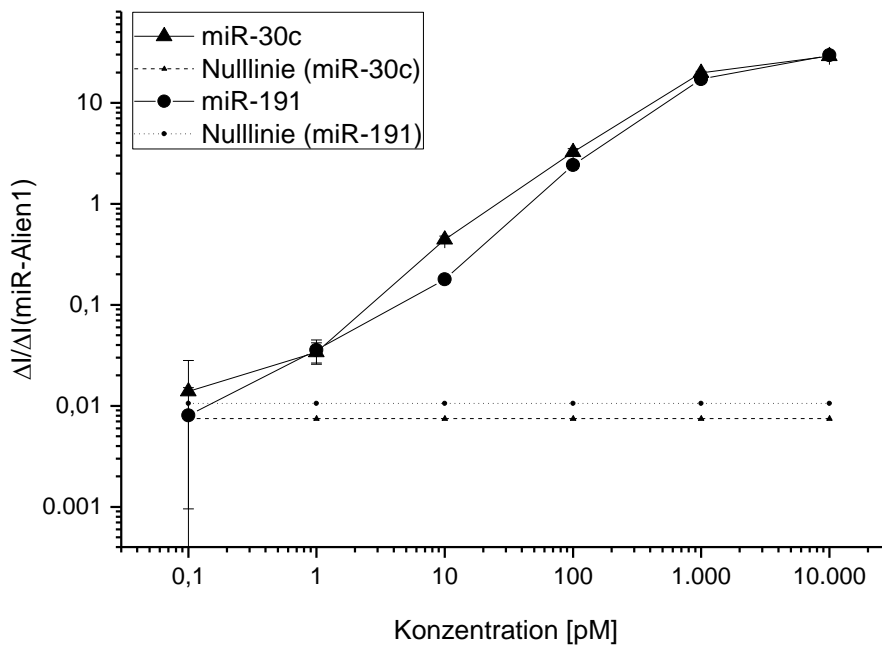


Abbildung 56: Genauere Betrachtung und Auswertung der Konzentrationsreihen für miR-30c und miR-191. Die in Abbildung 55 dargestellten Messergebnisse für die miRNAs miR-30c und miR-191 wurden um den Mittelwert des zugehörigen Negativkontrollsignals (miR-Alien2) korrigiert und auf den entsprechenden Wert der Kontroll-RNA (miR-Alien1) normalisiert. Zusätzlich wurden Nullwerte für die miRNAs aus einem Versuch ohne Ziel-Nukleinsäuren (aber mit Kontroll-RNA miR-Alien1 und allen Reporter-Komponenten) auf gleiche Weise ermittelt und ausgewertet. Die dargestellten Nulllinien wurden aus der Addition des ausgewerteten Mittelwerts mit der dreifachen Standardabweichung ($MW+3 \times SD$) aus den Nullmessungen berechnet.

4.3.2 Analyse endogener miRNAs aus Blutproben

Mit Hilfe des optimierten kardialen miRNA-Panels sollte abschließend die Möglichkeit demonstriert werden, mit der entwickelten Methode die Konzentrationen der ausgewählten miRNA-Kandidaten in aus Blut extrahierter Gesamt-RNA zu bestimmen. Dazu sollten beispielhaft sowohl Proben von Blutspendern gemessen werden, als auch solche von Patienten mit diagnostiziertem AMI und zugehörigen Kontrollprobanden.

4.3.2.1 Untersuchung von Spenderblut

Die Proben von anonymen Blutspendern wurden von der Transfusionsmedizin Erlangen in *PAXgene Blood RNA*-Röhrchen bezogen und die gesamte RNA (inklusive miRNA) aus je 5 ml Blut aufgereinigt (siehe Abschnitt 3.5). Aus einem Extrakt wurden verschiedene Gesamt-RNA-Konzentrationen in der Probelösung bei

gleichen Bedingungen nacheinander gemessen, um die benötigte RNA-Menge ermitteln zu können. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde das Grundsignal der miR-Alien2 Negativkontrolle von allen anderen Messwerten abgezogen. Bei den miRNAs miR-191, miR-181a, miR-15a, miR-425 und miR-30c stieg das gelieferte Signal mit Erhöhung der Gesamt-RNA-Konzentration in der Probelösung an (Abbildung 57). Der Kandidat miR-145 zeigte für die höchste Konzentration von 32 ng/μl zwar auch die größte Steigung ΔI (0,152 nA/s), jedoch waren die beiden niedrigeren Konzentrationen in der quantitativen Anordnung vertauscht (10 ng/μl: 0,047 nA/s; 16 ng/μl: 0,040 nA/s). Die miRNAs miR-636 und miR-362 zeigten keine gute Korrelation zwischen eingesetztem Ausgangsmaterial und gemessenen Signalen, was wohl auf eine zu niedrige Konzentration der entsprechenden Nukleinsäuren in der verwendeten Probe zurückzuführen war.

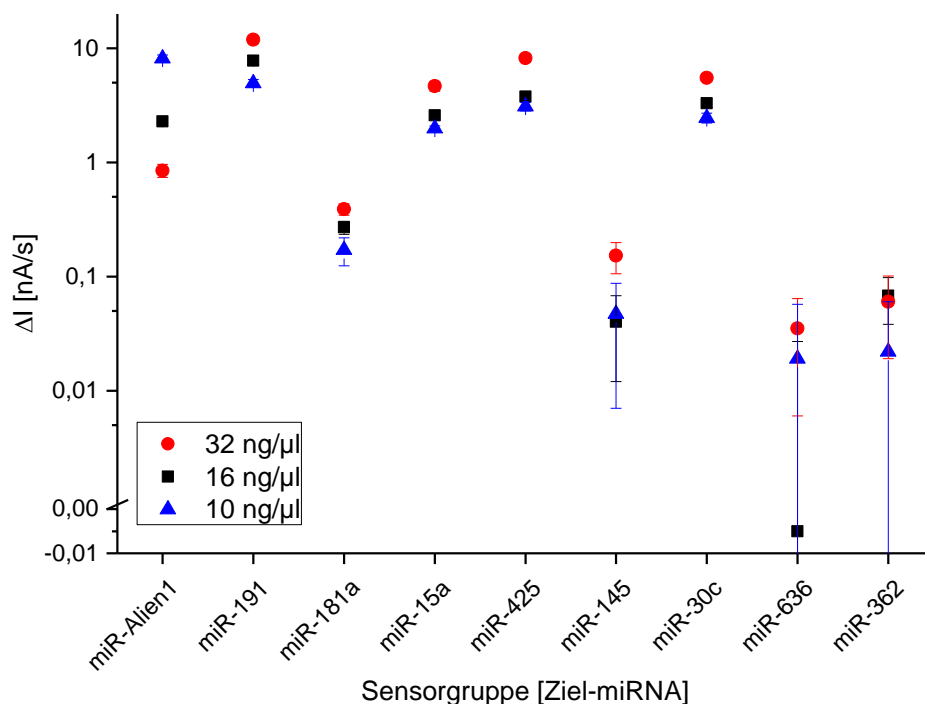


Abbildung 57: Einsatz verschiedener Mengen extrahierter Gesamt-RNA für die Quantifizierung endogener miRNAs. Verschiedene Mengen an extrahierter Gesamt-RNA wurden mit Variante 2 der automatischen Durchführung der Sandwich-Ligations-Methode und Chips der gleichen Immobilisierungscharge detektiert. Die RNA für alle drei Versuche wurde aus dem Eluat derselben Aufreinigung entnommen. Zusätzlich enthielt die Probelösung 200 pM miR-Alien1 Kontroll-RNA und je 5,8 nM der CM2-Reporterkomponenten. Für die angegebenen Sensorgruppen (vgl. **Tabelle 15**) sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Signale aus je drei Wiederholungsmessungen (technische Replikate) für die drei Gesamt-RNA-Konzentrationen in der Probelösung nach Auswertung und Korrektur um den Mittelwert des zugehörigen Negativkontrollsignals (miR-Alien2) dargestellt. Die y-Achse wurde so geteilt, dass oberhalb der Unterbrechung eine logarithmische Skalierung aufgetragen ist, während der lineare Achsenabschnitt unterhalb der Unterbrechung auch die Darstellung negativer Werte ermöglicht. Sensorpositionen: miR-Alien2 – Cluster 3, 8, 14; miR-Alien1 – Cluster 2, 9, 15; miR-191 – Cluster 4; miR-181a – Cluster 5; miR-15a – Cluster 6; miR-425 – Cluster 7; miR-145 – Cluster 10; miR-30c – Cluster 11; miR-636 – Cluster 12; miR-362 – Cluster 13.

Obwohl bei allen Messungen die gleiche Konzentration miR-Alien1 zur Probelösung gegeben wurde, verringerte sich das Signal an den zugehörigen Sensoren mit Erhöhung der Gesamt-RNA-Konzentration. Dies kann eventuell darauf zurückgeführt werden, dass durch den Einsatz eines größeren Volumens an RNA-Extrakt auch mehr Verunreinigungen, die bei der Aufreinigung aus der Vollblutprobe nicht vollständig entfernt worden waren, in die Probenlösung gelangten und die synthetische miRNA degradierten. So konnte im Rahmen einer Studie zu zirkulierenden miRNAs als stabile Marker bei der Krebsdiagnostik gezeigt werden, dass synthetisch hergestellte und daher „nackte“ miRNAs in Plasma sehr schnell degradiert werden, während endogene miRNAs stabil bleiben (Mitchell *et al.* 2008). Daher wurde bei Vergleichsexperimenten mit Gesamt-RNA-Proben aus verschiedenen Aufreinigungen auf eine Normalisierung der Ergebnisse auf die Kontroll-RNA verzichtet.

Da für die Messungen der AMI-Patientenproben genau 1 µg aufgereinigte Gesamt-RNA von einzelnen Spendern von der Universität Heidelberg bereitgestellt wurde, sollte die Reproduzierbarkeit des Detektions-Assays bei Verwendung dieser Menge untersucht werden. Dazu wurden die Ergebnisse von drei unter gleichen Bedingungen durchgeführten Versuchsdurchläufen verglichen, bei denen immer das gleiche Volumen derselben Blutspender-RNA-Probe eingesetzt worden war. Für die fünf höher konzentrierten miRNAs miR-191 (CV=0,04), miR-181a (CV=0,04), miR-15a (CV=0,08), miR-425 (CV=0,09) und miR-30c (CV=0,13) zeigte sich eine gute Reproduzierbarkeit der Messsignale (Abbildung 58). Von den niedrig konzentrierten Vertretern zeigte miR-362 einen schwachen CV-Wert von 0,35, während die Ergebnisse für miR-145 und miR-636 hohe Schwankungen mit CV-Werten von 0,78 und 5,32 aufwiesen und die Resultate daher nicht verwendet werden konnten (Tabelle 16).

Ergebnisse

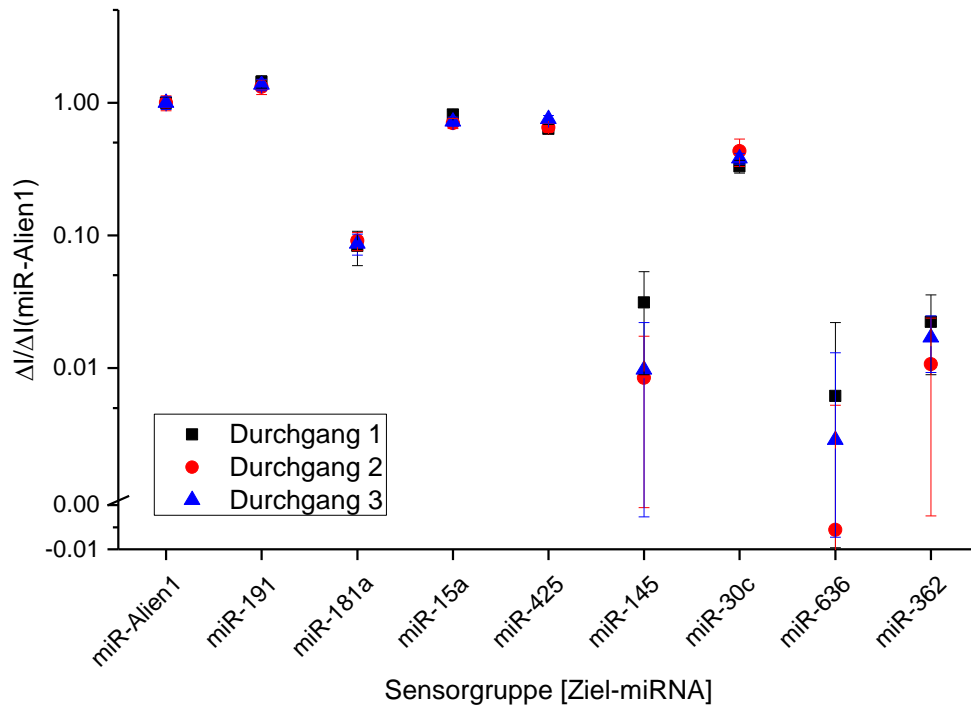


Abbildung 58: Reproduktion einer Quantifizierung extrahierter miRNAs aus Vollblut. Dreimal wurde 1 µg extrahierte Gesamt-RNA aus dem Eluat derselben Aufreinigung entnommen und mit Variante 2 der automatischen Sandwich-Ligations-Methode untersucht. Die Probelösung enthielt außerdem 200 pM miR-Alien1 Kontroll-RNA und je 5,8 nM der CM2-Reporterkomponenten. Die ausgewerteten Mittelwerte und Standardabweichungen der Signale aus je drei Wiederholungsmessungen (technische Replikate) für die angegebenen Sensorgruppen (vgl. **Tabelle 15**) sind nach Korrektur um den Mittelwert des zugehörigen Negativkontrollsignals (miR-Alien2) und Normalisierung auf den Mittelwert des jeweiligen Positivkontrollsignals (miR-Alien1) dargestellt. Die y-Achse wurde so geteilt, dass oberhalb der Unterbrechung eine logarithmische Skalierung aufgetragen ist, während der lineare Achsenabschnitts unterhalb der Unterbrechung auch die Darstellung negativer Werte ermöglicht. Die Variationskoeffizienten zu den gezeigten Ergebnissen sind in **Tabelle 16** gelistet. Sensorpositionen: miR-Alien2 – Cluster 3, 8, 14; miR-Alien1 – Cluster 2, 9, 15; miR-191 – Cluster 4; miR-181a – Cluster 5; miR-15a – Cluster 6; miR-425 – Cluster 7; miR-145 – Cluster 10; miR-30c – Cluster 11; miR-636 – Cluster 12; miR-362 – Cluster 13.

Tabelle 16: Reproduzierbarkeit der Messsignale. Die verwendeten Daten stammen aus den in Abbildung 58 dargestellten Experimenten. MW1-3: Normalisierte Mittelwerte aus den einzelnen Versuchen. MW(ges.): Mittelwert aus den drei Versuchsergebnissen. Stabw.: Standardabweichung der drei Versuchsergebnisse. CV-Wert: Variationskoeffizient.

miRNA	MW1	MW2	MW3	MW(ges.)	Stabw.	CV-Wert
miR-191	1,440	1,318	1,367	1,375	0,061	0,04
miR-181a	0,083	0,091	0,087	0,087	0,004	0,04
miR-15a	0,815	0,700	0,722	0,746	0,061	0,08
miR-425	0,634	0,650	0,752	0,678	0,064	0,09
miR-145	0,031	0,008	0,010	0,016	0,013	0,78
miR-30c	0,331	0,431	0,380	0,381	0,050	0,13
miR-636	0,006	-0,006	0,003	0,001	0,006	5,32
miR-362	0,022	0,011	0,017	0,017	0,006	0,35

4.3.2.2 Vergleich mit quantitativer Polymerase-Kettenreaktion

Die qRT-PCR gilt als etablierte sensitive Methode zur Bestimmung der Konzentration von Ziel-RNAs im Laborbereich. Durch spezielle Anpassungen wie den Einsatz eines Haarnadelstruktur-Primers bei der Reversen Transkription wurde die Methode an die Detektion von miRNAs angepasst (Chen *et al.* 2005) und ist in dieser Form als vollständiges Versuchs-Kit, inklusive passender Primer für die gewünschte miRNA, kommerziell erhältlich. Die Ergebnisse der Quantifizierung endogener miRNAs wurden zwischen dieser amplifikationsbasierten Technik und der in dieser Arbeit entwickelten Sandwich-Ligations-Methode verglichen. Dazu wurde zunächst ein Pool aus mehreren Gesamt-RNA-Extrakten von Spenderblutproben hergestellt. Daraus wurden 2 µg Gesamt-RNA pro Multiplex-Messung des kardialen miRNA-Panels mit der Sandwich-Ligations-Methode auf dem CMOS-Chip verwendet (vgl. Abschnitt 4.3.2.1) und je 0,66 µg für die Quantifizierung einzelner miRNAs mit qRT-PCR. Zum Vergleich der Ergebnisse wurden die erhaltenen Messwerte für die fünf höher konzentrierten miRNAs des kardialen Panels (miR-191, -181a, -15a, -425 und -30c) mit Hilfe zugehöriger Standardkurven auf die molaren Konzentrationen im untersuchten Gesamt-RNA-Extrakt umgerechnet. Dabei ergab sich nur eine schwache Korrelation zwischen den beiden betrachteten Quantifizierungsmethoden (Abbildung 59). Bei Verwendung der Sandwich-Ligations-Methode wurden durchschnittliche Konzentrationen von 155 pM (miR-191), 21 pM (miR-181a), 329 pM (miR-15a), 334 pM (miR-425) und 61 pM (miR-30c) gemessen. Die qRT-PCR lieferte entsprechende Werte von 583 pM, 7 pM, 244 pM, 104 pM und 121 pM.

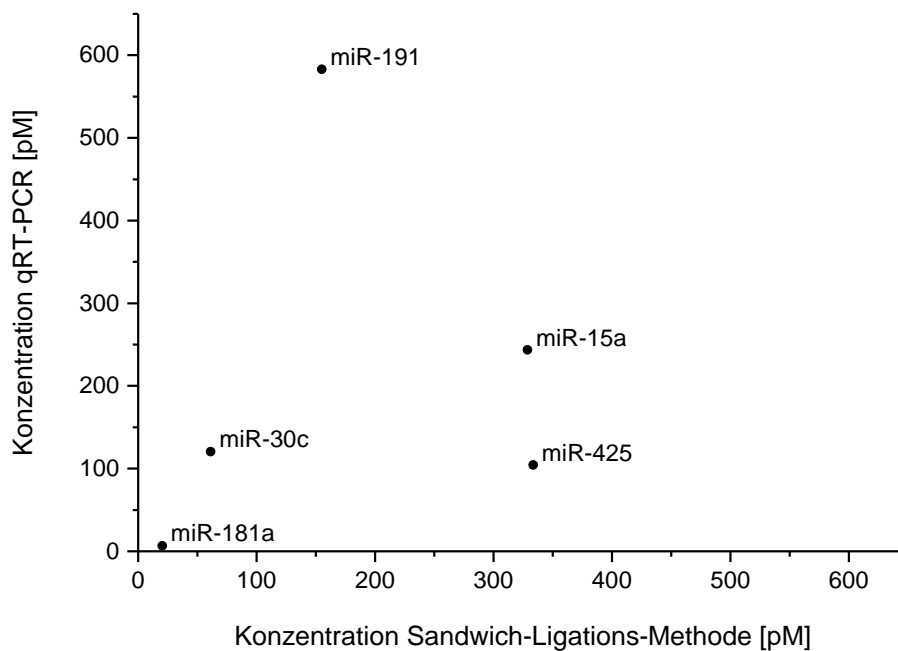


Abbildung 59: Korrelation der gemessenen Konzentrationen bei Verwendung der Sandwich-Ligations-Methode mit Werten aus qRT-PCR-Experimenten. Die Quantifizierung der dargestellten miRNAs mit dem CMOS-Chip wurde mit 2 µg Gesamt-RNA aus einem Pool mit Extrakten aus mehreren Aufreinigungen von Spenderblutproben wie in **Abbildung 57** beschrieben durchgeführt. Je 0,66 µg Gesamt-RNA des gleichen Pools wurden pro miRNA bei der qRT-PCR eingesetzt. Anhand zusätzlich erstellter Standardkurven wurden die gemessenen Konzentrationen der Ziel-Nukleinsäuren in der Gesamt-RNA-Probe aus den Ergebnissen der beiden Detektionsmethoden ermittelt. Die Mittelwerte der berechneten Konzentrationen aus drei qRT-PCR-Experimenten pro miRNA sind in einem Streudiagramm über den Mittelwerten der Konzentrationen aus zwei Durchläufen der Sandwich-Ligations-Methode dargestellt.

4.3.2.3 Untersuchung von AMI-Patientenproben

Die miRNAs des gewählten Detektionspanels wurden mit der Sandwich-Ligations-Methode in zwei STEMI-Patientenproben (ST-Hebungsinfarkt; engl. **ST Elevation Myocardial Infarction**; Variante des AMI) und einer Kontrollprobe, die von der Universität Heidelberg bereitgestellt worden waren, quantifiziert. Dazu wurde je 1 µg Gesamt-RNA in 60 µl Probenlösung unter gleichen Bedingungen gemessen. Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Verringerung der miR-15a-Konzentration bei den analysierten Patientenproben (Patient 1: 0,623 nA/s; Patient 2: 0,736 nA/s) im Vergleich zur Kontrolle (4,49 nA/s), während alle anderen untersuchten miRNAs nur kleinere Unterschiede aufwiesen (Abbildung 60).

Ergebnisse

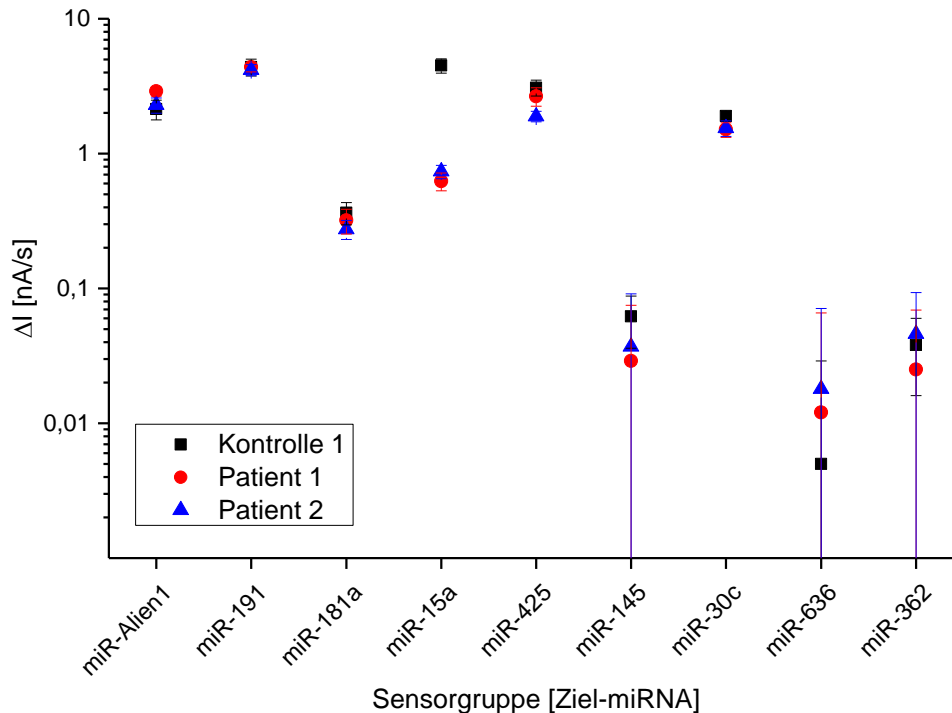


Abbildung 60: Messung von AMI-Patientenproben. Es wurden die endogenen miRNAs des kardialen Panels in je 1 μg extrahierter Gesamt-RNA aus zwei AMI-Patientenblutproben und einer Kontrollblutprobe mit der automatischen Durchführung der Sandwich-Ligations-Methode (Variante 2) quantifiziert. Die Probelösung enthielt jeweils auch 200 pM Kontroll-RNA miR-Alien1 und je 5,8 nM der CM2-Reporterkomponenten. Die ausgewerteten Mittelwerte und Standardabweichungen der Signale aus je drei Wiederholungsmessungen (technische Replikate) für die angegebenen Sensorgruppen (vgl. **Tabelle 15**) sind nach Korrektur um den Mittelwert des zugehörigen Negativkontrollsignals (miR-Alien2) dargestellt. Sensorpositionen: miR-Alien2 – Cluster 3, 8, 14; miR-Alien1 – Cluster 2, 9, 15; miR-191 – Cluster 4; miR-181a – Cluster 5; miR-15a – Cluster 6; miR-425 – Cluster 7; miR-145 – Cluster 10; miR-30c – Cluster 11; miR-636 – Cluster 12; miR-362 – Cluster 13.

Die Messwerte für miR-145, miR-636 und miR-362 zeigten wie bei der Analyse der Spenderproben sehr hohe Standardabweichungen (siehe Abschnitt 4.3.2.1). Die Sensoren für miR-191, miR-181a und miR-30c lieferten solide Messwerte, die innerhalb der untersuchten Proben jedoch nur wenig variierten. Für miR-425 konnte bei einem der beiden Patienten (Patient 2) ein um 39% geringeres Signal im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden.

5. Diskussion

5.1 Grundlegendes Detektionssystem

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung, Überprüfung und Charakterisierung eines schnellen, quantitativen, amplifikations- und vormarkierungsfreien miRNA-Detektionsassays für eine vorhandene CMOS-Biochip-Plattform. Dabei lag der Hauptfokus auf der Etablierung eines neuen molekularbiologischen Konzepts, das in Kombination mit der gegebenen Grundtechnologie einen leistungsfähigen Gesamtassay liefert. Mit der Durchführung von Versuchen, bei denen markierte Ziel-Nukleinsäuren direkt an die immobilisierten Fänger-Oligonukleotide hybridisiert wurden, konnte die Funktionsfähigkeit der grundlegenden Messmethodik verifiziert werden (siehe Abschnitt 4.1.1). Dazu zählen die effektive Immobilisierung thiolmodifizierter Oligonukleotide, die spezifische Hybridisierung gelöster Nukleinsäuren mit immobilisierten Fängersträngen und die enzymvermittelte Umwandlung des inaktiven Substrats in ein elektrochemisch aktives Produkt (pAP), das an den Elektroden in einem Redox-Cycling-Prozess oxidiert/reduziert wird.

Durch die Verwendung der LockSpot-Technik (siehe Abschnitt 1.7.4) und den Einsatz eines Esterase 2-Konjugats anstelle der biotinvermittelten Kopplung von Alkalischer Phosphatase wurde die Leistungsfähigkeit der Detektionsplattform zusätzlich verbessert (siehe Abschnitt 4.1.2). Die zugehörige Konzentrationskurve zeigte einen linearen Signalanstieg ausreichender Größe für etwa drei Dekaden Reportersonden-Konzentration (1 pM – 1 nM) bei einer Hybridisierungszeit von nur 5 min und damit eine gute Voraussetzung für die Entwicklung eines miRNA-Detektionsassays auf Basis des validierten Grundsystems.

5.2 3-Komponenten-Methode

Das erste Konzept für die quantitative Detektion von miRNAs, das in dieser Arbeit entworfen und getestet wurde, war die 3-Komponenten-Methode. Die Grundlage stellte eine spezifische Verlängerung des hybridisierten Reporter-Konjugats durch eine Ligation mit der benachbarten Ziel-Nukleinsäure und die sich daraus ergebende Erhöhung der Schmelztemperatur T_m dar. Durch stringentes Waschen bei der passenden Temperatur sollten nicht ligierte Reporter-Konjugate entfernt werden, während die ligierten Stränge durch die erhöhte Schmelztemperatur T_m mit dem

Fänger-Oligonukleotid verbunden bleiben. Die Anzahl der anschließend noch auf der Sensoroberfläche vorhandenen Reporterenzyme – und damit die Signalhöhe bei der Messung – wäre dann abhängig von der Ausgangskonzentration der Ziel-Nukleinsäure in der Probelösung.

In den Experimenten zeigte sich jedoch, dass und warum die 3-Komponenten-Methode nicht die für einen Quantifizierungs-Assay erforderliche Dynamik und Sensitivität liefern kann. Die erstellte Konzentrationsreihe für die Ziel-Nukleinsäure miDNA-96 (Abbildung 19) zeigt einen flachen Signalverlauf für die positiven Sensoren (Fänger_96-3comp) von 1 pM bis 100 pM, der sich kaum von dem der negativen Kontrollsensoren (Fänger_rnd-3comp), die eine Komplementärsequenz für das Reporter-Konjugat, aber nicht für die Ziel-Nukleinsäure aufwiesen, unterscheidet. Besonders im Vergleich zu den Kontrollsensoren ohne immobilisierte Nukleinsäure weisen die Negativsensoren ein sehr hohes Grundsignal auf, von dem sich das Positivsignal erst ab dem Bereich zwischen 100 pM und 1000 pM abhebt. Die Effektivität des Entfernens hybridisierter, aber nicht ligierter Reporter-Konjugate von der Sensoroberfläche ist also bei den gewählten Waschbedingungen zu gering. Daher sollte durch eine Schmelzkurve die optimale Temperatur experimentell ermittelt werden, bei der hybridisierte Reporter-Konjugate möglichst vollständig entfernt, ligierte Konjugate aber nicht von den Fänger-ODNs abgeschmolzen werden. Hierfür wurde als Waschpuffer ein Tris-Puffer mit besonders niedriger Salzkonzentration gewählt, die jedoch noch ausreicht, um die Esterase 2 nicht irreversibel zu schädigen. Außerdem wurde mit 100 nM eine sehr hohe Konzentration an Ziel-Nukleinsäure gewählt, die der Konzentration an Reporter-Konjugat entsprach. An der etwa gleichen Höhe der Signale der positiven (Fänger_96-3comp) und negativen (Fänger_rnd-3comp) Sensoren bei der Referenzmessung ist zu erkennen, dass bei der Hybridisierung jeweils etwa gleich viele Reporterenzyme an die Sensoroberfläche gebunden worden waren (Abbildung 20A). Während das Signal der Negativsensoren bereits durch den ersten Waschschrift mit Niedrigsalzpuffer bei 40°C stark reduziert wurde, verringerte sich das Signal der Positivsensoren bis zum Abschmelzen des ligierten Stranges bei 48°C nicht, was auf eine Sättigung und eine effektive Ligation aller hybridisierten Reporter-Konjugate mit den spezifisch hybridisierten Ziel-Nukleinsäuren schließen lässt. Die Detailansicht im Bereich der Waschttemperaturen 44 - 48°C zeigt jedoch, dass die Signale der Negativsensoren vor Abschmelzen der ligierten Stränge nicht

auf das Niveau der Leersensoren gesenkt werden können. Etwa 1 % des Referenzsignals bleibt auch nach mehrmaligem Waschen bei 44°C und 46°C erhalten, was durch den sigmoidalen Kurvenverlauf des Schmelzvorgangs doppelsträngiger Nukleinsäuren begründet werden kann. Dadurch ergibt sich ein möglicher dynamischer Bereich von etwa zwei Dekaden, der vor allem für die gleichzeitige Quantifizierung mehrerer in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen vorliegenden Ziel-Nukleinsäuren unzureichend ist.

5.3 4-Komponenten-Methode

5.3.1 1-Schritt-Variante

Der Grundgedanke bei der Entwicklung der 4-Komponenten-Methode war die kovalente Bindung des Reporterenzym an den immobilisierten Fängerstrang unter Verwendung der Ziel-Nukleinsäure als Verbindungsstück. Durch einen Gegenstrang sollten die beiden Enden der Ziel-Nukleinsäure in einem Hybridisierungskonstrukt in direkte Nachbarschaft zu den jeweiligen Enden der Reporter- und Fängerstränge gebracht und anschließend enzymatisch ligiert werden (Abbildung 21). Wie bei der 3-Komponenten-Methode wurde auch dabei zunächst ein Überschuss an Reporter-Konjugat mit den Fänger-Oligonukleotiden aller Sensorpositionen assoziiert. Durch die kovalente Bindung des Reporterenzym an den immobilisierten Fängerstrang bei Anwesenheit der Ziel-Nukleinsäure konnte zum Entfernen nicht ligierten Reporter-Konjugats jedoch bei der 4-Komponenten-Methode mit niedriger Salzkonzentration und bei hoher Temperatur gewaschen werden – ohne ligiertes Konjugat zu verlieren. Die Härte der Waschbedingungen wurde dabei nur durch die Stabilität des EST2-Enzyms begrenzt.

Die Vorteile dieses Verfahrens sind bei Betrachtung der Konzentrationsreihe mit der Ziel-Nukleinsäure miDNA-96 (Abbildung 23) an der starken Annäherung der Signale der Negativsensoren (Fänger_rnd) an die der Leersensoren (SP) im Vergleich zur 3-Komponenten-Methode zu erkennen. Gleichzeitig befanden sich die Signale der Positivsensoren (Fänger_96) bei hohen Konzentrationen (1000 pM, 10000 pM) in der gleichen Größenordnung wie bei der 3-Komponenten-Methode, was auf eine effektive Ligation beider Enden der Ziel-DNA hindeutet. Durch die erreichte Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses wurden Dynamik und Sensitivität der Detektion bei Verwendung der 4-Komponenten-Methode also deutlich erhöht.

5.3.2 2-Schritte-Variante

Da endogene Ziel-Nukleinsäuren in einem Hintergrund aus zahlreichen verschiedenen anderen Nukleinsäuren detektiert werden müssen, ist die Spezifität der Quantifizierung von großer Wichtigkeit. Die 1-Schritte-Variante der 4-Komponenten-Methode zeigte jedoch ein hohes falsch-positives Signal bei Anwesenheit einer sehr hohen Konzentration eines nicht komplementären Oligonukleotids in der Probelösung (Abbildung 24). Die gleichzeitige Hybridisierung und Ligation der Assay-Komponenten bringt nämlich zwei Probleme mit sich. Zum einen ist die Variabilität der Hybridisierungstemperatur und der Ionenstärke des Puffers durch die für die Ligation notwendigen Bedingungen beschränkt, was zu einer niedrigen Stringenz führt. Zum anderen ist die Substrat-Spezifität der T4 DNA Ligase limitiert, was zur kovalenten Kopplung eines signifikanten Anteils des im Überschuss vorhandenen Reporter-Konjugats an die Fänger-Oligonukleotide durch zufällige *Template*-Sequenzen führen kann (Harada and Orgel 1993, Alexander *et al.* 2003). Durch die Trennung von Hybridisierung und Ligation in der 2-Schritte-Variante konnten beide Schwachpunkte umgangen und die Spezifität deutlich erhöht werden (Abbildung 24).

5.3.3 3-Schritte-Variante

Während der Weiterentwicklung der Versuchsprotokolle wurden bei der Anfertigung dieser Arbeit auch immer wieder Prozesse bei der Vorbereitung der technischen Assay-Komponenten optimiert. Zwischen der Anfertigung der Konzentrationsreihe mit der 1-Schritt-Variante und der Einführung der 2-Schritte-Variante der 4-Komponenten-Methode war das Blocken der verwendeten Santoprene-LockSpot-Dichtung mit BS vor Einbau in die Chiphalterung eingeführt worden (siehe Abschnitt 3.4.3.2.1). Der positive Effekt der Absättigung der Dichtung mit Blockreagenzien vor der Durchführung des Detektionsversuch ist vor allem beim Vergleich der Signale der Leersensoren (SP) zwischen den beiden Versuchen zu erkennen (ohne „Blockieren“ der Dichtung: 0,289 nA/S, 1 pM, Abbildung 23; mit „Blockieren“ der Dichtung: 0,051 nA/s, 1-Schritt-Variante, Abbildung 24). Die Negativsensoren bei der Messung von miDNA-21 zeigten jedoch auch bei Verwendung des 2-Schritte-Protokolls noch ein deutlich höheres Signal als die Leersensoren (Fänger_96: 0,472 nA/s; SP: 0,033 nA/s). Dieser Effekt konnte auch in weiteren Versuchen bestätigt werden (nicht

gezeigt) und deutet auf stabile unspezifische Bindungen des Reporter-Konjugats an die Chipoberfläche hin, die durch dessen Aufkonzentrierung an Sensorpositionen mit entsprechenden immobilisierten Hybridisierungsstellen verursacht werden (Abbildung 21). Sowohl die DNA, als auch das Enzym des Konjugats könnten an den anorganischen Materialien der Chipoberfläche (Siliziumnitrid, Gold) adsorbieren (Wahlgren and Arnebrant 1991, Lao *et al.* 2005, Willett *et al.* 2005, Fears *et al.* 2013). Um die Aufkonzentrierung des Reporter-Konjugats an Sensorpositionen in Abwesenheit der zugehörigen Ziel-Nukleinsäure zu verhindern, wurde die 3-Schritte-Variante der 4-Komponenten-Methode etabliert und untersucht (Hofmann *et al.* 2015b).

Bei dieser Variante wird das Reporter-Konjugat erst auf die Chipoberfläche gegeben, nachdem die Ziel-Nukleinsäure mit Hilfe des Gegenstrangs spezifisch an das immobilisierte Fänger-Oligonukleotid ligiert wurde und mit nicht ligierten Fängersträngen hybridisierte Gegenstränge durch einen Waschschrift entfernt worden sind (Abbildung 25, Abbildung 26). Dieser erste Waschschrift funktioniert nach dem Grundprinzip der 3-Komponenten-Methode, weshalb wohl nicht alle, aber ein erheblicher Teil der unbenötigten Gegenstränge entfernt werden können (siehe Abschnitt 5.2). Bei anschließender Zugabe des Reporter-Konjugates ist die Zahl der komplementären Bindungssequenzen an Fänger-Positionen ohne ligierte Ziel-Nukleinsäure bereits stark reduziert, was eine hohe unspezifische Aufkonzentration des Konjugats verhindert. In der Folge konnte das Signal der Negativsensoren deutlich reduziert werden (Abbildung 27B) und die Dynamik und Sensitivität der Detektion sichtbar optimiert (Abbildung 27C). Die zusätzliche Verbesserung des Positivsignals (Abbildung 27A) könnte durch die erhöhte Gesamtligationszeit oder den größeren relativen Überschuss an Reporter-Konjugat zu Gegensträngen auf der Chipoberfläche verursacht werden.

Weiterhin bietet die 3-Schritte-Variante der 4-Komponenten-Methode eine gute Möglichkeit, bei Multiplex-Messungen mit einem definierten Fänger-Satz die Waschbedingungen beim Entfernen der Gegenstränge von nicht ligierten Fänger-Oligonukleotiden für alle Ziel-Nukleinsäuren zu vereinheitlichen. Dies wird durch die richtige Zuordnung der Zielsequenzen zu den verfügbaren Fänger-Oligonukleotiden und eine Variation der Länge des Gegenstrangs am fängerseitigen 3'-Ende (Abbildung 22) realisiert, wodurch die Schmelztemperatur für den durch die Ligation

mit der Ziel-Nukleinsäure entstehenden doppelsträngigen Bereich des Hybridisierungskonstrukts für alle Ziel-Nukleinsäuren angeglichen werden kann. Diese Methode wurde beim Design der Gegenstränge für die Detektion eines 8-miRNA-Panels mit dem Chimär-Fänger-Satz B angewendet (Abschnitt 4.2.2.4.2) und führte zu einer guten Multiplex-Performance und Sensitivität (Abbildung 35, Abbildung 36).

5.4 Besonderheiten bei der Detektion von miRNA

Obwohl zunächst wegen der leichteren Handhabung kurze phosphorylierte DNAs, die analog zu miRNAs designt worden waren, als Ziel-Nukleinsäuren verwendet wurden, war die Zielsetzung dieser Arbeit die schnelle Quantifizierung endogener miRNAs. Dazu wurde der Detektions-Assay zunächst mit Hilfe synthetischer miRNAs an den Einsatz von RNA als Ziel-Nukleinsäure angepasst. Da endogene miRNAs genauso wie siRNAs Produkte der RNase III Dicer sind, besitzen sie nach der Synthese ein 3'-Hydroxy-Ende und ein 5'-Phosphat-Ende, das für die Funktion in der Zelle wichtig ist und daher erhalten bleibt (Bernstein *et al.* 2001, Hutvagner *et al.* 2001, Nykanen *et al.* 2001, Ambros *et al.* 2003). Dadurch sind miRNAs, die beispielsweise aus dem Blut eines Patienten extrahiert wurden, ohne vorherige Modifizierung der Enden beidseitig ligierbar. Um eine Ziel-RNA effektiv zwischen ein Reporter-Konjugat und ein immobilisiertes Fänger-Oligonukleotid mit Hilfe verfügbarer Polynukleotid Ligasen einfügen zu können, musste jedoch eine Anpassung der Substratkombination an einer der Ligationsstellen durch eine Umwandlung der Desoxyribonukleotide am 3'-OH-Ende der Assay-Komponente in Ribonukleotide stattfinden (Abschnitt 4.2.2.3.2). Der Einsatz einer chimären Assay-Komponente anstelle eines reinen RNA-Strangs versprach dabei aufgrund der höheren Stabilität wirkungsvoller zu sein (Shimayama *et al.* 1993, Nakano *et al.* 2004), was auch experimentell im Kontext der untersuchten Detektionsmethode bestätigt werden konnte (Abbildung 29A). Der chimäre Fänger führte außerdem gegenüber dem analogen DNA-Fänger zu keinem Nachteil bei der Assay-Performance, wie ein Vergleichsversuch mit DNA als Ziel-Nukleinsäure demonstrierte (Abbildung 29B). Dass bei der Detektion synthetischer miRNA die 4-Komponenten-Methode mit T4 DNA Ligase genauso hohe Positivsignale liefert wie bei der Verwendung von T4 RNA Ligase II (Abbildung 29A), widerspricht den

Ergebnissen von Bullard und Bowater (Bullard and Bowater 2006). Da jedoch bereits 1970 gezeigt wurde, dass RNA-Stränge mit einem DNA-Template durch T4 DNA Ligase effektiv verbunden werden können (Kleppe *et al.* 1970) und dies auch in weiteren Studien bestätigt wurde (Moore and Sharp 1992, Kershaw and O'Keefe 2012), kann diese Abweichung nur durch eine Besonderheit in der Untersuchungsmethode von Bullard und Bowater (Substrate, Reaktionspuffer) erklärt werden.

Durch die Untersuchung verschiedener Chimär-Fänger mit 1-4 Ribonukleotiden am 3'-Ende (Abbildung 29D) konnte gezeigt werden, dass bei der Verwendung eines chimären Substrats zur Ligation mit dem 5'-Phosphat-Ende eines RNA-Strangs 3-4 Ribonukleotide am 3'-Ende des Chimärs ausreichen, um unter den untersuchten Reaktionsbedingungen mit T4 DNA Ligase eine vergleichbare Ligationseffizienz zu erreichen wie beim Einsatz reiner RNA-Substrate (Abbildung 29A, Chimär-Fänger: 4 Ribonukleotide). Waren nur eine oder zwei Ribonukleotide am 3'-OH-Ende der Ligationsstelle vorhanden reduzierte sich das Detektionssignal der entsprechenden Sensoren jedoch deutlich (Abbildung 29D).

Bei der Quantifizierung von miRNA mit der 4-Komponenten-Methode unter Verwendung chimärer Fänger konnte nur ein Signal von 52% relativ zur Vergleichsmessung der analogen miDNA erzielt werden (Abbildung 29C). Die geringere Ligationseffizienz bei der Verbindung zweier RNA-Enden im Vergleich zur Ligation eines 3'-RNA-Endes mit einem 5'-DNA-Ende wurde auch von Bullard und Bowater berichtet. Sie verzeichneten eine Verringerung der Ligrationsrate (T4 RNA Ligase II) auf 24% (Bullard and Bowater 2006).

Der Einsatz eines chimären Reporter-Konjugats durch Veränderung der 5'-3'-Orientierung des Hybridisierungskonstrukts wurde zwar untersucht (Abbildung 32), hätte sich aufgrund der problematischeren Handhabung jedoch nur bei einer signifikanten Steigerung der Assay-Performance etablieren können, die nicht eintrat.

Die durchgeführten Experimente zeigten, dass für die Messung von miRNAs mit der 4-Komponenten-Methode chimäre Fänger-Oligonukleotide mit 4 Ribonukleotiden am 3'-Ende ein gutes Positivsignal liefern, da sie eine vorteilhafte Stabilität aufweisen und eine effiziente Ligation mit dem 5'-Phosphat-Ende der Ziel-Nukleinsäure

ermöglichen. T4 DNA Ligase konnte dabei weiterhin als Ligationsenzym eingesetzt werden, so dass ein Wechsel zu T4 RNA Ligase II nicht erforderlich war.

5.5 Sandwich-Ligations-Methode

5.5.1 Entstehung und Konzept

Die Sensitivität der 4-Komponenten-Methode verringerte sich bei der Quantifizierung von synthetischen miRNAs im Vergleich zu den Versuchen mit kurzer DNA als Ziel-Nukleinsäure (Abbildung 36, Abbildung 27C). Dies konnte auf die geringere Effektivität der Ligation zwischen Ziel-RNA und Fänger-Oligonukleotide zurückgeführt werden (siehe Abschnitt 4.2.2.3.2). Um das daraus resultierende geringere Positivsignal auszugleichen, sollte durch Einführung einer neuen Variante des beidseitigen Ligations-Assays das Negativsignal weiter reduziert werden. Die spezifische Assoziation des Reporter-Konjugats mit dem Fänger-Oligonukleotid in Abwesenheit der passenden Ziel-Nukleinsäure, die bei der 3-Schritte-Variante der 4-Komponenten-Methode verringert worden war (siehe oben), sollte dabei durch Aufteilung des Gegenstrangs in zwei kleinere Einzelstränge vollständig eliminiert werden. Die Zahl der mit der Ziel-Nukleinsäure hybridisierenden Basen reduzierte sich dadurch für die einzelnen Gegenstränge deutlich, was zu einer niedrigeren Schmelztemperatur und damit zu Problemen bei der Hybridisierung führen würde. Das gesamte Hybridisierungskonstrukt aus allen fünf Nukleinsäuren ist jedoch sehr stabil, da die Unterbrechungen zwischen den einzelnen Strängen („Nicks“) das durchgehende *Base-Stacking* der Gesamthelix nicht stören, welches hauptverantwortlich für die Stabilität des Doppelstrangs ist (Yakovchuk *et al.* 2006).

Da zur Bildung eines stabilen Hybridisierungskonstrukts dabei jedoch die Assoziation von fünf einzelnen Assay-Komponenten notwendig ist, verringerte sich das Positivsignal zunächst massiv (Daten nicht gezeigt). Durch die Einführung doppelsträngiger Assay-Komponenten konnte die Komplexität jedoch maßgeblich verringert und schließlich eine sehr gute Sensitivität erreicht werden (Abbildung 40). Die Ziel-Nukleinsäure wird dabei durch die sandwichartige Stapelung der Komponenten eingeschlossen und das *Base-Stacking* an beiden Enden der miRNA und an der Kontaktstelle der Gegenstränge („Nick“-Position, Abbildung 39) führt trotz der kurzen Überlappungssequenzen der miRNA mit den einzelnen Gegensträngen zu einer stabilen Hybridisierung (Yuan *et al.* 2008).

Der resultierende Ablauf der Sandwich-Ligations-Methode ist einfach und schnell, da das Hybridisierungskonstrukt mit allen Komponenten in einem Schritt aufgebaut werden kann, ohne problematische Assoziationen des Reporter-Konjugats mit immobilisierten Fängern in Abwesenheit der zugehörigen Ziel-Nukleinsäure zu verursachen (Abbildung 37, Abbildung 38, Hofmann *et al.* 2015a). Da die Anzahl der verwendeten Reaktionslösungen gering ist, konnte der Versuch problemlos in die vollautomatische Auto-Reader-Plattform integriert werden. Die Zeit vom Start der Detektionsroutine bis zum Messergebnis betrug dabei nur 30 min. Da die Ligation und die erforderlichen Waschschrte nur wenig Zeit in Anspruch nahmen, konnte die Hälfte der Gesamtzeit für die Bildung des Hybridisierungskonstrukts verwendet werden, was die gute Sensitivität der Methode ermöglichte (siehe auch Abschnitt 3.4.4.3).

5.5.2 Komponentendesign und Assay-Performance

Die Messungen von miRNA-Panels mit Assay-Komponenten für die Sandwich-Ligations-Methode, die nach den in Abschnitt 4.2.3.1 festgelegten Richtlinien designt worden waren, zeigten bereits gute Ergebnisse ohne signifikante Kreuzhybridisierungen (Abbildung 41, Abbildung 49). Die Positivsignale für verschiedene miRNAs gleicher Konzentration variierten jedoch stark untereinander. Durch Standardkurven für alle Ziel-Nukleinsäuren eines Panels kann eine solche Differenz bei der Quantifizierung unbekannter Mengen an miRNAs berücksichtigt werden. Die miRNAs miR-16, miR-636, miR-15a und miR-30c zeigten in Kombination mit den gewählten Assay-Komponenten jedoch recht schwache Signale bei den entsprechenden Messungen von 1 nM Konzentration, die auf Einbußen beim Detektionslimit für diese Kandidaten schließen lassen. Als Ursachen kommen die Stabilität des jeweiligen Hybridisierungskonstrukts, die Effektivität der Ligation an den Enden der miRNA, aber auch die bei der Immobilisierung entstandene Dichte und Anordnung der Fänger-Komponenten auf der Goldoberfläche in Frage. Zur Optimierung der verwendeten Detektionskomponenten für eine festgelegte Ziel-miRNA bieten sich bei der Sandwich-Ligations-Methode hauptsächlich zwei Parameter an. Die Sequenz und Länge des thiolmodifizierten Immobilisierungsstrangs kann variiert werden und die „Nick“-Position des Hybridisierungskomplexes kann durch Variation der Gegenstränge verändert werden

(Abbildung 39). Für beide Parameter konnte der Einfluss auf die Höhe des Positivsignals bei der Optimierung des kardialen miRNA-Panels gezeigt werden (Abschnitt 4.3.1). Die energetische Auswirkung des Stacking-Effekts auf die Stabilität von Duplex-DNA wurde bereits für verschiedene Basen direkt an der „Nick“-Stelle, in nächster Nachbarschaft, sowie für Lücken und Überhänge untersucht (Vasiliskov *et al.* 2001, Pyshnyi and Ivanova 2004). Die Ergebnisse dieser Studien reichen jedoch nicht aus, um verlässliche Schlüsse auf die optimale Position des Gegenstrang-„Nicks“ bei der Sandwich-Ligations-Methode ziehen zu können. Bei den meisten Untersuchungen wurden zwei oder mehr kurze Nukleinsäurestränge an einen längeren Gegenstrang hybridisiert, während das hier diskutierte Hybridisierungskonstrukt durch drei „Nick“-Stellen charakterisiert ist, die auf verschiedenen Seiten des Duplex positioniert sind. Zusätzlich wirken sich weitere Faktoren, wie die Stabilität bereits in Lösung entstehender Teilhybride oder die Immobilisierungseigenschaften der resultierenden Fängerkomponente, auf das Detektionssignal aus. So ergaben sich für den spezifischen Fängerstrang sFS_30c_B8_1 bei der Messung der Ziel-Nukleinsäure miR-30c nur vergleichsweise niedrige Signale, unabhängig von der eingesetzten Reporter-Komponente (Abbildung 50).

Entsprechend hat auch der zugeordnete Immobilisierungsstrang Einfluss auf die Performance der designten Assay-Komponenten. Dabei kommt es neben der generellen Eignung einer Fängersequenz auch auf die Kombination mit der Ziel-Nukleinsäure und dem spezifischen Gegenstrang an. Dies ist bei der Zuordnung des Fänger-Satzes B zu den Ziel-Nukleinsäuren miR-15a und miR-425 zu erkennen (Abbildung 53). Obwohl die spezifischen Überhänge der Fänger-Komponenten für eine miRNA bei den verschiedenen Kombinationen gleich waren, variierten die zugehörigen Signale deutlich. Außerdem ergaben sich für manche Immobilisierungsstränge große Signalunterschiede zwischen den beiden untersuchten miRNAs (Beispiel: B5), während andere eine fast identische Steigung ΔI für miR-15a und miR-425 aufwiesen (Beispiele: B3, B6). Hierbei spielt sicherlich nicht nur das Immobilisierungsverhalten des jeweiligen Doppelstrangs eine Rolle, sondern auch die durch die Basensequenz bestimmte energetische Stabilität der Ligationsstelle am 5'-Ende der miRNA (Stacking-Energie, siehe oben). Neben den Immobilisierungssträngen des Fänger-Satzes B wurden auch die zuvor aufgrund möglicher intramolekularer Sekundärstrukturen aussortierten chimären A-Fänger

untersucht. Durch die Ausbildung von Doppelsträngen bei der Herstellung der Fängerkomponenten für die Sandwich-Ligations-Methode, wurden die in Abschnitt 4.2.2.4.1 erörterten Bedenken relativiert. Diese Aussage wird durch die Ergebnisse der entsprechenden Versuche mit der Ziel-Nukleinsäure miR-15a unterstützt (Abbildung 52).

Aufgrund der Komplexität der verschiedenen Einflüsse der ausgewählten Komponenten auf die resultierende Detektionsperformance, konnten durch Vergleiche der vorhandenen Ergebnisse mit den beim Oligodesign kalkulierten Schmelztemperaturen keine brauchbaren Zusammenhänge hergestellt werden. Dies galt auch für detailliertere Kalkulationen, bei denen beispielsweise die Kombinationen aus DNA- und RNA-Nukleotiden im Detektionskonstrukt berücksichtigt wurden (Daten nicht gezeigt). Daher blieb die Optimierung der Komponenten zur Detektion eines gegebenen miRNA-Panels hauptsächlich auf die Auswertung durchgeführter Vergleichsexperimente beschränkt.

5.5.3 Spezifität

5.5.3.1 Sequenzähnlichkeit

Dass die Sandwich-Ligations-Methode eine gute Spezifität aufweist, konnte bereits aus den Multiplex-Messungen gefolgert werden, bei denen nur die in der gemessenen Lösung enthaltenen Ziel-Nukleinsäuren zu hohen Positivsignalen führten, während die Assay-Komponenten für abwesende miRNAs zu keinen signifikanten Signalen an den zugehörigen Sensoren führten. Bei manchen Biomarkern kann es jedoch nötig sein, miRNAs mit einem Sequenzunterschied von nur wenigen, oder sogar nur einer Base zu unterscheiden. Vor allem wenn eine sehr ähnliche endogene miRNA in der zu untersuchenden Gesamt-RNA-Probe in deutlich höherer Konzentration vorhanden ist als die Ziel-Nukleinsäure, ist eine besonders gute Spezifität erforderlich, um eventuell auftretende krankhafte Veränderungen in der Konzentration des Biomarkers erkennen zu können. Bei hybridisierungsbasierten Methoden stellt die Wahl der Wasch- und Inkubationsbedingungen immer einen Kompromiss aus Sensitivität und Spezifität dar (Religio *et al.* 2002). Bei der genaueren Untersuchung der Spezifität der Sandwich-Ligations-Methode wurde zur Erhöhung der Stringenz bei der Hybridisierung 2x SSC-Puffer statt 5x SSC-Puffer verwendet, d.h. die Salzkonzentration bei der Bildung des Hybridisierungskonstruktes

deutlich verringert. Dadurch konnte eine besonders gute Spezifität erreicht werden, die sogar die Differenzierung von miRNAs mit nur einer Base Unterschied ermöglichte (Abbildung 42, Abbildung 43). Der sich ergebende Rückgang in der Sensitivität kann durch einen Vergleich des so erhaltenen miR-Alien1 Signals mit den Ergebnissen in Abbildung 54 abgeschätzt werden. Dort wurden bei gleichem Messprotokoll, aber mit 5x SSC-Puffer in der Probelösung, für ein fünftel der miR-Alien1 Konzentration (200 pM statt 1 nM) ähnlich hohe Signale erzielt. Eine Veränderung der Salzkonzentration in der Hybridisierungslösung stellt also ein effektives Mittel für die Justierung zwischen hoher Spezifität und hoher Sensitivität dar. Je nach Anforderungen, die an die Detektion eines miRNA-Panels gestellt werden, kann die Sandwich-Ligations-Methode also auf einfache Art angepasst und optimiert werden. Zusätzlich ist auch eine Modifikation der Gegenstränge bezüglich der „Nick“-Position möglich, um Nukleinsäuren mit Einzelbasenunterschieden über bestimmte energetische Konformationen des Hybridisierungskonstrukts zu differenzieren (siehe auch Abschnitt 5.5.2).

5.5.3.2 IsomiRs

Wie bei der Differenzierung verschiedener miRNAs mit großer Sequenzähnlichkeit ist auch die Notwendigkeit der Unterscheidung von IsomiRs von der Auswahl der miRNAs eines Biomarker-Panels abhängig. So ist die Variante einer miRNA mit der kanonischen Sequenz, wie sie in Datenbanken wie miRBase (Griffiths-Jones *et al.* 2006) vorgegeben ist, nicht unbedingt auch die in der untersuchten biologischen Probe am häufigsten vertretene. Beim Vergleich von Sequenzierungsdaten für Proben aus verschiedenen Maus- und Humangeweben stellten Forscher sogar fest, dass bei 34-51% der von ihnen detektierten miRNAs eine andere Variante – eine IsomiR (Morin *et al.* 2008) – die meisten Zählereignisse generierte (Lee *et al.* 2010). Dabei ergaben sich für manche miRNAs sogar von Gewebe zu Gewebe Unterschiede für die meist repräsentierte Sequenz-Variante (Lee *et al.* 2010). Eine Quantifizierungsmethode, die besonders sensitiv für Unterschiede an den Enden der Ziel-Nukleinsäure ist, könnte daher bei der Messung der gleichen Probe für manche miRNAs andere Ergebnisse liefern, als eine weniger spezifische Methode. Diese Variabilität kann letztlich sogar darüber entscheiden, ob ein miRNA-Kandidat bei Verwendung einer bestimmten Detektionsmethode als Biomarker geeignet ist oder

nicht. Ein von Lee et al durchgeführter Vergleich der Messergebnisse für verschiedene miR-18a IsomiRs für drei qPCR-Systeme zeigt, dass jedes System unterschiedlich auf Heterogenität am 3'-Ende, wie sie häufig in biologischen Proben vorkommt, reagiert. Eine Verlängerung um ein Nukleotid – im Vergleich zur zu detektierenden kanonischen Nukleinsäure – führte bei allen drei untersuchten Methoden zu einer nur kleinen Verringerung des Signals auf etwa 75% des Kontrollsignals aus der Messung mit der gleichen Konzentration der genau passenden miRNA, während eine Verkürzung um ein Nukleotid nur bei Verwendung der Taqman-Methode (Applied Biosystems) zu einer Verringerung des Signals auf etwa 40% führte (Lee *et al.* 2010). Die Simulation von Variationen der Sequenzlänge am 3'-Ende von miR-93 dagegen deutet auf eine gute Fähigkeit zur Diskriminierung von IsomiRs bei der Sandwich-Ligationsmethode hin (siehe Abschnitt 4.2.3.3). So ergaben sich relative Signalintensitäten von 2% für einen Überhang (entspricht Verlängerung um ein Nukleotid) und 19% für eine Lücke (entspricht Verkürzung um ein Nukleotid) an der Ligationsstelle mit dem 3'-Ende der miRNA (Abbildung 44).

Wie bei den Experimenten zur Optimierung der „Nick“-Position bei der Konstruktion der Gegenstränge festgestellt, wirkt ein Überhang an der Stelle der Strangunterbrechung nur wenig destabilisierend auf das Hybridisierungskonstrukt, während eine Lücke einen stärkeren negativen Einfluss auf die Stabilität der Doppelhelix hat (Abschnitt 4.3.1.2). Da diese Konstellationen bei den Versuchen zur Unterscheidung von IsomiRs das Signal jedoch genau umgekehrt stark beeinträchtigen, ist hier wohl der negative Einfluss auf die Ligationseffektivität am 3'-Ende der miRNA der entscheidende Faktor. So konnte bereits gezeigt werden, dass die Ligation von Strangunterbrechungen auch mit einer Lücke von einem Nukleotid sowohl in flüssiger Phase (Goffin *et al.* 1987), als auch bei immobilisierten Nukleinsäurehybriden (Kim *et al.* 2013) durch T4 DNA Ligase katalysiert werden kann, wenn auch mit geringerer Effektivität. Die Festphasenligation von Kim et al zeigte bei einer Lücke von einem Nukleotid eine relative Ligationsrate von 10%, was mit dem in dieser Arbeit bei anderen Reaktionsbedingungen erhaltenen Wert von 19% vergleichbar ist. Eine andere Arbeitsgruppe, die ähnliche Versuche durchführte und die Ergebnisse mit Massenspektrometrie analysierte, konnte weder für eine Lücke, noch für einen Überhang von einem Nukleotid an der Ligationsstelle eine messbare Verbindung der Enden durch T4 DNA Ligase feststellen (Kim and Mrksich 2010).

Die Sandwich-Ligations-Methode ermöglicht durch die gegenstrangvermittelte beidseitige Ligation der Ziel-Nukleinsäure eine sehr gute Differenzierungsfähigkeit für verschiedene IsomiRs einer miRNA. Gerade im Vergleich mit verbreiteten qPCR-Methoden schneidet die in dieser Arbeit etablierte Quantifizierungsmethode dabei besonders gut ab (siehe oben). Ob eine solche Unterscheidung im diagnostischen Bereich nötig sein wird, ist noch nicht klar. Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass krankhaft veränderte Gewebe neben quantitativen Unterschieden in der Gesamtkonzentration einer miRNA auch eine qualitative Abweichung in der Zusammensetzung der auftretenden IsomiRs aufweisen können (Hu *et al.* 2013). Solche Effekte könnten die Erkennung einer Dysregulation durch Betrachtung einer einzelnen IsomiR maßgeblich verbessern.

5.5.3.3 miRNA-Vorstufen

Die durch die Sandwich-Ligations-Methode gegebene Spezifität für die Länge der Ziel-Nukleinsäure führt weiterhin dazu, dass die Ergebnisse der Quantifizierung nicht durch miRNA-Vorstufen, die die Zielsequenz beinhalten, verfälscht werden. Da ein Überhang von einem Nukleotid an der Ligationsstelle bereits zu einem extremen Signalverlust führte (siehe Abschnitt 4.2.3.3), kann angenommen werden, dass weder Primärtranskripte (pri-miRNAs; >1000 Basen) noch Vorläufer-miRNAs (pre-miRNAs; 60-70 Basen) unspezifische Signale verursachen (Bartel 2004). Dadurch wird eine selektive Quantifizierung der reifen Ziel-miRNAs aus Gesamt-RNA-Extrakten ermöglicht.

5.5.4 Steigerung der Sensitivität durch Signalamplifikation mit bDNA

Während eine Amplifikation der Ziel-Nukleinsäure bei der Entwicklung der Detektionsmethode in dieser Arbeit wegen des zeitlichen und eventuell auch technischen Mehraufwandes sowie einer möglichen Verzerrung der Konzentrationsverhältnisse nicht beabsichtigt war, führte das Redox-Cycling des Enzymprodukts pAP an den Interdigitalelektroden bereits zu einer Amplifikation des Messsignals bei der Quantifizierung der gebundenen Reporter-Moleküle. Um zusätzlich die Anzahl der Reporterenzyme pro detektiertem Ziel-Molekül zu erhöhen, wurde die Sandwich-Ligations-Methode um ein bDNA-Konstrukt erweitert (Abbildung

45). Über ein neues Sequenzdesign des spezifischen Reporterstrangs wurden die Vorverstärker-, Verstärker- und Enzym-Sonden der kommerziell erhältlichen Versant bDNA Kits, die erfolgreich zur diagnostischen Quantifizierung von Viren wie HCV oder HIV eingesetzt wurden (Gleaves *et al.* 2002, Elbeik *et al.* 2004), in den erprobten Assay integriert. Das von Collins *et al.* in die bDNA-Komponenten eingeführte künstliche Basenpaar Isoguanosin (5-Methyl-2'-Desoxyisoguanosin, iso-dG) und Isocytidin (5-Methyl-2'-Desoxyisocytidin, iso-dC) sollte dabei zur Verbesserung der Spezifität der Sonden beim Aufbau der bDNA-Struktur beitragen (Horn *et al.* 1995, Collins *et al.* 1997).

Tatsächlich konnte durch die Erweiterung der Methode eine sichtbare Verbesserung der Sensitivität erreicht werden, die die Detektion von miRNAs bereits ab einer Konzentration von 100 fM erlaubte (Abbildung 47, Abbildung 48). Durch die Notwendigkeit des schrittweisen Aufbaus der bDNA-Struktur auf der Chipoberfläche stieg jedoch auch die Komplexität der Versuchsdurchführung (Abbildung 45). Die Erhöhung der Anzahl der Reaktionsschritte und vor allem die Erweiterung der benötigten Reaktionslösungen führte (vor allem beim „*Liquid Handling*“) zu technischen Herausforderungen bei der Integration in die vollautomatische Plattform, die starke Probleme bei der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse verursachten (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde für die Untersuchung der Quantifizierung endogener miRNAs die robustere Esterase-Variante der Sandwich-Ligations-Methode verwendet.

5.6 Detektion endogener miRNAs

5.6.1 Validierung der Detektionsmethode

Die Assay-Komponenten für die Quantifizierung eines kardialen Biomarker-Panels aus acht miRNAs mit der Sandwich-Ligations-Methode wurden designt und optimiert (Abschnitt 4.3.1). Die Auswahl der Ziel-miRNAs erfolgte dabei in Zusammenarbeit mit der AG Meder des Universitätsklinikums Heidelberg (Innere Medizin III) aus vorhandenen Sequenzierungsdaten und Studienergebnissen. Es wurde eine Standardkonfiguration des Quantifizierungsversuchs festgelegt, die nicht nur die erforderliche Spezifität bei der Messung mehrerer Ziel-Nukleinsäuren im Multiplexverfahren lieferte (Abbildung 54), sondern auch eine gute analytische

Sensitivität für alle miRNAs, die teilweise unterhalb von 1 pM Ausgangskonzentration in der Probelösung lag (Abbildung 55, Abbildung 56).

Als Detektionsstrang für die Herstellung der Reporter-Komponenten wurde – wie auch in den meisten Versuchen mit synthetischen miRNAs – bei der Detektion endogener miRNAs das Konjugat EST2-Ra11 eingesetzt. Im Gegensatz zur 15 Nukleotide langen Grundsequenz (Ra15), ist diese kürzere Variante keine humane *Alien*-Sequenz (siehe Abschnitt 4.2.1.1). Da die Reporter-Komponenten bei der Sandwich-Ligations-Methode jedoch in Form eines Doppelstrangs eingesetzt werden, ist der Einsatz des EST2-Ra11 Konjugats bei der Untersuchung von Gesamt-RNA-Extrakten unproblematisch.

Mit der erarbeiteten Assay-Konfiguration für die Detektion des kardialen miRNA-Panels wurden RNA-Extrakte aus Vollblut-Proben von Blutspendern im Hinblick auf Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und Quantifizierbarkeit untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass nur fünf der acht miRNAs des Panels verlässliche Ergebnisse lieferten (Abbildung 57, Abbildung 58). Die anderen drei lagen zumindest bei Einsatz von 1 µg Gesamt-RNA und weniger zu nah an der Nachweisgrenze, was zu großen Messungenauigkeiten (siehe Fehlerbalken), schwacher Reproduzierbarkeit und fehlerhafter Quantifizierung führte. Eine Verbesserung der Messergebnisse für die miRNAs miR-145, miR-636 und miR-362 könnte bei Bedarf durch eine weitere Optimierung der jeweiligen Assay-Komponenten, durch Verwendung der bDNA-Variante oder durch den Einsatz größerer Mengen Gesamt-RNA – falls verfügbar – erreicht werden.

Die miRNAs miR-191, miR-181a, miR-15a, miR-425 und miR-30c zeigten dagegen sowohl eine gute Korrelation der Signalintensitäten mit der eingesetzten RNA-Menge, als auch eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Messergebnisse mit CV-Werten zwischen 4% und 13% (Tabelle 16). Es wurde also demonstriert, dass mit der Sandwich-Ligations-Methode endogene miRNAs schnell und zuverlässig quantifiziert werden können (Hofmann *et al.* 2015c). Das multiplexfähige Design des Assays erlaubt dabei in Kombination mit der CMOS-Chiptechnologie die Detektion mehrerer Ziel-Nukleinsäuren aus einer einzigen RNA-Probe in einem Durchlauf.

Beim Vergleich der gemessenen Werte mit durch qRT-PCR ermittelten Ergebnissen zeigte sich nur eine schwache Korrelation der jeweils abgeleiteten miRNA-

Konzentrationen in der analysierten Probe. Diskrepanzen bei der Gegenüberstellung der Messergebnisse verschiedener Plattformen und Methoden sind eine grundsätzliche Herausforderung, die die verlässliche Validierung von miRNA-Biomarkern erschwert (Moldovan *et al.* 2014). Als Gründe dafür werden Unterschiede bei der Normalisierung, bei der Prozessierung der Ziel-Nukleinsäuren und bei der Exklusion anwesender miRNA-Vorstufen (vgl. Abschnitt 5.5.3.3) genannt. Aber auch die IsomiR-Spezifität der jeweiligen Detektionsmethoden kann einen großen Einfluss auf die gemessenen Konzentrationswerte haben, wie in Abschnitt 5.5.3.2 detailliert beschrieben ist. Entsprechend berichten auch andere Arbeitsgruppen von mangelnder Korrelation zwischen den Ergebnissen hybridisierungs- und PCR-basierter Methoden bei der Quantifizierung von miRNAs (Chen *et al.* 2009, Camarillo *et al.* 2011, Wang *et al.* 2011). Daher muss die klinische Anwendbarkeit eines Detektionsverfahrens für jedes potenzielle miRNA-Panel einzeln validiert werden.

5.6.2 Analyse von AMI-Patientenproben

Eine Menge von je 1 µg aus Vollblutproben extrahierter Gesamt-RNA von zwei STEMI-Herzinfarktpatienten und zwei zugehörigen Kontrollspendern wurde von der AG Meder vom Universitätsklinikum Heidelberg für Messungen mit der in dieser Arbeit etablierten Quantifizierungsmethode bereitgestellt. Um möglichst hohe und verlässliche Signale zu erhalten, wurde die gesamte Menge jeder Probe für je einen einzelnen Detektionsdurchlauf mit der Standardkonfiguration zur Quantifizierung der miRNAs des kardialen miRNA-Panels verwendet. Aufgrund eines Fehlers bei der Durchführung der Messung für eine der beiden Kontrollen konnten nur Daten für die beiden Patienten- und eine Kontrollprobe ermittelt werden (Abbildung 60). Eine der untersuchten miRNAs wies dabei einen deutlichen Konzentrationsunterschied zwischen der Kontrolle und den beiden Patientenproben auf. Die Sensoren für die miRNA miR-15a zeigten bei Messung der Patientenproben nur etwa 15% des Signals, das die Kontrollprobe lieferte. Und auch im Vergleich mit dem entsprechend ausgewerteten Signal aus den Messungen der Spenderprobe B zur Analyse der Reproduzierbarkeit (vgl. Abbildung 58) konnte eine Verringerung um etwa 80% für miR-15a in der extrahierten Gesamt-RNA der Patienten ermittelt werden (nicht gezeigt).

Ein medizinisch-biologischer Zusammenhang zwischen miR-15a und akutem Koronarsyndrom (ACS – *Acute Coronary Syndrome*) kann über die Coaktivator-assoziierte Arginin Methyltransferase 1 (CARM-1) hergestellt werden, deren Expression durch miR-15a gehemmt wird (Liu *et al.* 2014). So wurde gezeigt, dass Patienten mit ACS eine geringere Menge miR-15a in den mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC – *Peripheral Blood Mononuclear Cell*) aufweisen als gesunde Kontrollen. Dadurch steigt in diesen Zellen die Expression des Proteins CARM-1, welches als Koaktivator des Transkriptionsfaktors NF- κ B an der Aktivierung entzündungsfördernder Chemokine beteiligt ist (Covic *et al.* 2004, Liu *et al.* 2014). So führte eine Überexpression von CARM-1 in HEK293T-Zellen zu einer erhöhten Expression der Chemokine IP-10, IL-8 und MCP-1 (Liu *et al.* 2014). In vivo werden durch die Bildung dieser kleinen Proteine Entzündungszellen rekrutiert, die u.a. Matrix Metalloproteinasen (MMPs) absondern (Hansson 2005). Es wird angenommen, dass MMPs zur Entstehung von ACS beitragen, indem sie atherosklerotische Plaques destabilisieren, was im Zusammenspiel mit weiteren Faktoren zur Ruptur führen kann (Johnson 2007). Die gemessene Abweichung der miR-15a Konzentration in Gesamt-RNA Proben aus Vollblut von STEMI-Patienten könnte also durch Regulationsmechanismen von Entzündungsvorgängen, die die Pathogenese von ACS begleiten, erklärt werden.

Auch für die deutlich verringerte Konzentration von miR-425, die in einer der beiden Patientenproben gemessen wurde, kann ein Zusammenhang mit anderen Studien hergestellt werden. So konnte gezeigt werden, dass die Expression von NPPA – dem Gen für das Hormon atriales natriuretisches Peptid (ANP) – und die Sekretion von N-terminalem proANP (Nt-proANP) in humanen Kardiomyozyten durch Transfektion von miR-425 herunterreguliert wird (Arora *et al.* 2013). Das Hormon ANP liegt in Zellen auch als proANP gespeichert vor, das bei mechanischem Stress gespalten und als Nt-proANP ins Blut abgegeben wird (Michener *et al.* 1986, Ruskoaho 1992). Bei einem Infarkt führt hauptsächlich die Dehnung von Myozyten im Herzen zu einer schnellen Steigerung der ANP-Abgabe (Kinnunen *et al.* 1993). Eine geringere miR-425 Konzentration in Vollblut-Lysat könnte daher mit einer erhöhten Nt-proANP Menge im Plasma korrelieren, wie sie bei AMI-Patienten bereits bei Aufnahme ins Krankenhaus vorgefunden wird (Clerico *et al.* 2000, Magga *et al.* 2004).

Die Messung der nur wenigen Patienten- und Kontrollproben lässt zwar in jedem Fall keine ausreichenden Schlüsse auf die diagnostische Bedeutsamkeit der einzelnen Kandidaten-miRNAs oder des Gesamt-Panels zu, demonstrierte jedoch die Fähigkeit des etablierten Assays, Konzentrationsunterschiede einzelner miRNAs eines Panels zwischen zwei RNA-Extrakten aufzudecken. Die Ergebnisse der drei niedrig konzentrierten Nukleinsäuren miR-145, miR-636 und miR-362 können dabei nicht für eine erste Interpretation herangezogen werden, da sich die Werte zu nah an der unteren Nachweisgrenze bewegten (siehe auch Spenderblut, Abschnitt 4.3.2.1). Um die Signale zu verbessern, könnte man die zugehörigen Assay-Komponenten weiter optimieren oder die Menge der eingesetzten Gesamt-RNA erhöhen. Dass für miR-191, miR-181a und miR-30c keine deutlichen Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollproben gemessen wurden, könnte neben der niedrigen Probenzahl auch daran liegen, dass für alle gemessenen miRNAs bei der Konstruktion der Detektionskomponenten nur die kanonischen Sequenzen berücksichtigt wurden. Da die Sandwich-Ligations-Methode jedoch im Vergleich zu den meisten anderen Methoden besonders sensitiv für Abweichungen an den Enden der Ziel-Nukleinsäuren ist (siehe Abschnitt 5.5.3.2, IsomiRs), wäre eine Festlegung der aussagekräftigsten IsomiR-Sequenzen anhand von Sequenzierungsdaten ein weiterer wichtiger Schritt bei der Etablierung eines geeigneten Biomarker-Panels.

5.7 Ausblick

Das Wissen über die Funktionen, die Wirkmechanismen und die Bedeutung von miRNAs ist seit ihrer Entdeckung in den 90er Jahren bis heute rasant gestiegen. Zahlreiche Forschungsgruppen bemühen sich weiterhin, die vielen noch offenen Fragen dieses komplexen Feldes zu beantworten. Parallel dazu werden immer mehr Vergleichsstudien durchgeführt, die Hinweise auf eine potenzielle Nutzung von miRNA-Panels als vielseitige Biomarker liefern. Vor allem die Analyse zirkulierender miRNAs, die aus Körperflüssigkeiten wie Blut gewonnen werden können, stellt eine zukünftige Verwendung von miRNA-Markern in der medizinischen Routine in Aussicht. Daher steigt auch die Nachfrage nach kostengünstigen, spezifischen und sensitiven miRNA-Detektionsmethoden für die breite Anwendung im klinischen Labor oder im POC-Bereich. Letzterer stellt besonders hohe Anforderungen an das

verwendete Verfahren, da eine schnelle, platzsparende und automatisierte Durchführung erfolgen muss.

Die in dieser Arbeit untersuchte Sandwich-Ligations-Methode kommt der Erfüllung dieser Anforderungen in Verbindung mit dem verwendeten CMOS-Chip, einem elektrochemischen Ausleseverfahren und dem automatischen Analysegerät bereits sehr nahe. Sie ermöglicht die spezifische Quantifizierung eines Multiplex-miRNA-Panels in nur 30 Minuten. Das Verfahren ist dabei kostengünstig und robust.

Da bei dieser Methode zur Vermeidung von Analysefehlern auf eine Amplifikation des Ausgangsmaterials vollständig verzichtet wird, stellen die teils sehr niedrigen Konzentrationen endogener miRNAs eine besondere Herausforderung dar. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Sensitivität des Verfahrens durch den Einsatz von *branched* DNA weiter gesteigert werden kann. Durch technische Modifikationen könnte diese Erweiterung in das automatische Analysesystem integriert werden.

Die Extraktion der Gesamt-RNA aus Blutproben wurde in dieser Arbeit vor der Durchführung des Analyseverfahrens manuell und auf Basis von Zentrifugation durchgeführt. Für eine Anwendung im POC-Bereich müsste jedoch auch die Probenvorbereitung automatisiert werden. Es gibt bereits entsprechende Aufreinigungsmethoden für Nukleinsäuren, bei denen die Zentrifugationsschritte beispielsweise durch den Einsatz von Magnetbeads umgangen werden (z.B. Versant Sample Preparation, Siemens Healthcare). Durch die technische Miniaturisierung eines solchen Verfahrens oder eine geeignete Neuentwicklung könnte zusammen mit dem vorgestellten Detektionssystem eine kompakte Lösung für die miRNA-POC-Diagnostik der Zukunft entstehen. Zusätzlich könnte ein solches Komplettsystem als robuster Standard bei der Validierung der zahlreichen publizierten miRNA-Biomarkerkandidaten fungieren und damit den Weg der miRNA-Quantifizierung vom Labor in die Klinik erleichtern.

6. Zusammenfassungen

6.1 Deutsche Zusammenfassung

MicroRNAs sind kurze, nicht-kodierende Ribonukleinsäuren, die eine wichtige Rolle bei der Genregulation spielen. Sie sind an vielen physiologischen Prozessen beteiligt und werden als vielversprechende Kandidaten für eine neue Generation von Biomarkern gehandelt. Die Quantifizierung von miRNAs aus Blut oder anderen Körperflüssigkeiten verspricht eine frühe Diagnose verschiedener Krankheitsbilder. Dazu zählen neben zahlreichen Krebsformen unter anderem auch Autoimmun- oder Herz-Kreislaufkrankungen. Um diese Biomarker schnell, sensitiv und spezifisch detektieren zu können, werden geeignete Detektionssysteme benötigt. Dabei liegt ein besonderer Fokus auf der Entwicklung von *Point-of-Care*-Systemen, die eine automatisierte Durchführung mit einfacher Handhabung verlangen.

Mikrochips können als leistungsfähige technische Hilfsmittel für eine robuste und miniaturisierte Signalerfassung an biochemischen Grenzflächen dienen. Auf der Grundlage eines CMOS-Chips mit einem Sensorarray aus interdigitalen Gold-Elektroden sollte in dieser Arbeit eine quantitative und multiplexfähige miRNA-Detektionsmethode mit elektrochemischer Signaltransduktion entworfen und untersucht werden. Weitere wichtige Zielfaktoren waren eine einfache und schnelle Durchführbarkeit, eine hohe Spezifität und eine gute Sensitivität bei gleichzeitigem Verzicht auf Amplifikation und Vormarkierung des Ausgangsmaterials.

Es wurden verschiedene Methoden entworfen, überprüft, untersucht, optimiert und weiterentwickelt. Das beste Ergebnis wurde letztlich mit einem als Sandwich-Ligations-Methode bezeichneten Verfahren erzielt. Dabei wird zunächst ein aus zwei doppelsträngigen Assay-Komponenten und der Ziel-miRNA bestehender dreiteiliger Hybridisierungskomplex gebildet, der eine beidseitige spezifische Ligation der miRNA mit einem auf der Sensoroberfläche immobilisierten Fängerstrang und einem enzymmarkierten Reporterstrang vermittelt. Durch einen anschließenden Waschschrift werden alle überschüssigen Markierungen vom Detektionsbereich entfernt, so dass bei der Detektion nur Reporterenzyme ausgelesen werden, die über die Ziel-miRNA kovalent mit dem immobilisierten Strang verbunden sind. Dieses Signal ist daher proportional zur Ausgangskonzentration der gesuchten miRNA.

Die Methode wurde mit Hilfe von synthetischen miRNAs etabliert und optimiert. Sie erreichte eine analytische Sensitivität von unter 1 pM Ziel-Nukleinsäure bei einer Gesamt-Versuchsdauer von nur 30 Minuten. Konzentrationsreihen demonstrierten einen linearen dynamischen Messbereich zwischen 1 pM und 1 nM, der eine verlässliche Quantifizierung der detektierten miRNAs in diesem Bereich ermöglicht. Die sehr gute Spezifität des Assays zeigte sich bei der Untersuchung des Einflusses verschiedener IsomiRs auf das Messergebnis sowie im Rahmen von Experimenten mit miRNAs der let-7-Familie. Dabei konnten Ziel-Nukleinsäuren mit Einzelbasenunterschieden klar differenziert werden. Die Multiplexfähigkeit der vorgestellten Methode wurde durch die gleichzeitige Quantifizierung von bis zu acht miRNAs auf einem CMOS-Chip demonstriert, zuzüglich Kontrollen.

Die Validierung der Detektionsmethode erfolgte mit Gesamt-RNA-Extrakten aus Vollblutproben. Dazu wurde ein kardiales Panel aus acht miRNAs, die auf Basis von Studien zu zirkulierenden miRNAs bei Herzerkrankungen ausgewählt wurden, festgelegt. Mit Hilfe der entsprechenden optimierten Detektionskomponenten wurden aus Spenderblut gewonnene endogene miRNAs analysiert. Dabei zeigte sich für fünf der acht Kandidaten sowohl eine solide Korrelation zwischen eingesetzter Gesamt-RNA-Menge und Messsignal, als auch eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Die Konzentrationen der übrigen drei miRNAs lagen nah am unteren Detektionslimit und lieferten daher keine verlässlichen Daten. Mit Hilfe sogenannter *branched* DNA zur Signalamplifikation könnte bei Bedarf die Sensitivität des Assays noch verbessert werden, was durch weitere Experimente dieser Arbeit demonstriert wurde.

Ein Vergleichsexperiment zwischen der Sandwich-Ligations-Methode und qRT-PCR zeigte nur eine schwache Korrelation der Messergebnisse. Dies ist jedoch konsistent mit anderen Studien zur Vergleichbarkeit unterschiedlicher Detektionsmethoden.

Abschließend wurden die miRNAs des kardialen Panels in Gesamt-RNA-Extrakten aus Vollblut von Herzinfarktpatienten und Kontrollen mit der entwickelten Detektionsmethode analysiert und die Ergebnisse verglichen. Dabei konnten Abweichungen in den Konzentrationen von miR-15a und miR-425 aufgedeckt werden. Eine entsprechende diagnostische Untersuchung mit der hier vorgelegten und validierten Detektionsmethode könnte eine Alternative oder Ergänzung zu aktuell eingesetzten proteinbasierten Tests bieten.

6.2 English Summary

MicroRNAs are short, non-coding ribonucleic acids that play an important role in gene regulation. They are involved in many physiological processes and therefore considered as auspicious candidates for a new generation of biomarkers. The quantification of miRNAs from blood or other body fluids promises early diagnosis of various diseases, including autoimmune disorders, cardiovascular disease as well as different types of cancer. For a fast, sensitive and specific detection of these biomarkers, suitable detection systems are needed. A particular focus is thereby on the development of point-of-care systems, which require an automatized work-flow with easy handling.

Microchips are powerful technical tools for a robust and miniaturized signal acquisition at biochemical interfaces. Based on a CMOS chip providing an array of interdigitated gold electrode sensors, a quantitative multiplex miRNA detection method with electrochemical readout should be designed and investigated in this work. A fast and easy workflow, a high specificity and a good sensitivity without amplification or prelabeling of the target material were additional important goals.

Several approaches were designed, tested, investigated, optimized and refined. In the end a method labeled as Sandwich Ligation Assay provided the best results. In this procedure, a tripartite hybridization complex is created by two double-stranded assay components and the target nucleic acid. This formation mediates a specific both-sided ligation of the miRNA to an immobilized capture strand on the sensor surface and to an enzyme-linked reporter strand. A subsequent washing step removes all excessive label conjugates from the sensor array. Thus only reporter enzymes that are covalently bound to the immobilized capture strand via the target miRNA are measured during detection. The acquired signal is therefore proportional to the initial concentration of the respective target.

The Sandwich Ligation Assay was established and optimized using synthetic miRNAs. A sensitivity of less than 1 pM nucleic acid target could be achieved at a time to result of only 30 minutes. Generated concentration curves showed a linear dynamic range between 1 pM and 1 nM allowing a reliable quantification of detected miRNAs in this scope of measurement. Experiments with miRNAs of the let-7 family that exhibited only one or two nucleotide differences demonstrated a very good

specificity of the presented method, as did the investigation of the influence of IsomiRs on the measurement signal. The ability of multiplex measurement was verified by the simultaneous quantification of up to eight miRNAs plus controls on one CMOS chip.

The detection method was validated using total RNA extracts gained from whole blood samples. Therefore a cardiac panel composed of eight miRNA candidates was assorted by leveraging the results of studies about circulating miRNAs in heart disease. The optimized corresponding detection components were used to analyze endogenous miRNAs from donor blood. Five of the eight candidates showed a solid correlation between the applied amount of total RNA and the measurement signal as well as a good reproducibility of results with CV values ranging from 0.04 to 0.13.

The concentrations of the three remaining miRNAs were too close to the lower detection limit and hence didn't provide reliable data. A signal amplification using so-called branched DNA can be integrated into the measurement procedure to further enhance the sensitivity of the assay, if required. This was demonstrated by additional experiments of this thesis.

A comparison between the Sandwich Ligation Assay and qRT-PCR showed only weak correlation of measurement results, which is in line with previous studies about interplatform comparability.

Finally, the miRNAs of the cardiac panel were analyzed in total RNA samples extracted from whole blood of patients with myocardial infarction and controls using the established detection method. By comparison of the results dysregulations of the particular miRNAs miR-15a and miR-425 could successfully be identified. A respective diagnostic test using the proposed measurement procedure could provide an alternative or a complement to the currently applied immunoassays.

7. Literaturverzeichnis

- Alexander, R. C., Johnson, A. K., Thorpe, J. A., Gevedon, T. and Testa, S. M. (2003) 'Canonical nucleosides can be utilized by T4 DNA ligase as universal template bases at ligation junctions', *Nucleic Acids Res*, 31(12), 3208-16.
- Allawi, H. T. and SantaLucia, J., Jr. (1997) 'Thermodynamics and NMR of internal G.T mismatches in DNA', *Biochemistry*, 36(34), 10581-94.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. (1997) 'Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs', *Nucleic Acids Res*, 25(17), 3389-402.
- Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D. P., Burge, C. B., Carrington, J. C., Chen, X., Dreyfuss, G., Eddy, S. R., Griffiths-Jones, S., Marshall, M., Matzke, M., Ruvkun, G. and Tuschl, T. (2003) 'A uniform system for microRNA annotation', *RNA*, 9(3), 277-9.
- Arora, P., Wu, C., Khan, A. M., Bloch, D. B., Davis-Dusenbery, B. N., Ghorbani, A., Spagnoli, E., Martinez, A., Ryan, A., Tainsh, L. T., Kim, S., Rong, J., Huan, T., Freedman, J. E., Levy, D., Miller, K. K., Hata, A., Del Monte, F., Vandenwijngaert, S., Swinnen, M., Janssens, S., Holmes, T. M., Buys, E. S., Bloch, K. D., Newton-Cheh, C. and Wang, T. J. (2013) 'Atrial natriuretic peptide is negatively regulated by microRNA-425', *J Clin Invest*, 123(8), 3378-82.
- Arroyo, J. D., Chevillet, J. R., Kroh, E. M., Ruf, I. K., Pritchard, C. C., Gibson, D. F., Mitchell, P. S., Bennett, C. F., Pogosova-Agadjanyan, E. L., Stirewalt, D. L., Tait, J. F. and Tewari, M. (2011) 'Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(12), 5003-8.
- Bartel, D. P. (2004) 'MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function', *Cell*, 116(2), 281-97.
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. and Hannon, G. J. (2001) 'Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference', *Nature*, 409(6818), 363-6.
- Boehm, M. and Slack, F. (2005) 'A developmental timing microRNA and its target regulate life span in *C. elegans*', *Science*, 310(5756), 1954-7.
- Breving, K. and Esquela-Kerscher, A. (2010) 'The complexities of microRNA regulation: mirandering around the rules', *Int J Biochem Cell Biol*, 42(8), 1316-29.
- Bullard, D. R. and Bowater, R. P. (2006) 'Direct comparison of nick-joining activity of the nucleic acid ligases from bacteriophage T4', *Biochem J*, 398(1), 135-44.

- Camarillo, C., Swerdel, M. and Hart, R. P. (2011) 'Comparison of microarray and quantitative real-time PCR methods for measuring MicroRNA levels in MSC cultures', *Methods Mol Biol*, 698, 419-29.
- Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., Barbisin, M., Xu, N. L., Mahuvakar, V. R., Andersen, M. R., Lao, K. Q., Livak, K. J. and Guegler, K. J. (2005) 'Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR', *Nucleic Acids Res*, 33(20), e179.
- Chen, F. and Hu, S. J. (2012) 'Effect of microRNA-34a in cell cycle, differentiation, and apoptosis: a review', *J Biochem Mol Toxicol*, 26(2), 79-86.
- Chen, J. S., Revilla, A. C., Guerrero, M., Gumbayan, A. M. and Zeller, R. W. (2015) 'Properties and kinetics of microRNA regulation through canonical seed sites', *J RNAi Gene Silencing*, 11, 507-14.
- Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Guo, X., Li, Q., Li, X., Wang, W., Zhang, Y., Wang, J., Jiang, X., Xiang, Y., Xu, C., Zheng, P., Zhang, J., Li, R., Zhang, H., Shang, X., Gong, T., Ning, G., Wang, J., Zen, K., Zhang, J. and Zhang, C. Y. (2008) 'Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases', *Cell Res*, 18(10), 997-1006.
- Chen, Y., Gelfond, J. A., McManus, L. M. and Shireman, P. K. (2009) 'Reproducibility of quantitative RT-PCR array in miRNA expression profiling and comparison with microarray analysis', *BMC Genomics*, 10, 407.
- Cheng, G. (2015) 'Circulating miRNAs: roles in cancer diagnosis, prognosis and therapy', *Adv Drug Deliv Rev*, 81, 75-93.
- Chim, S. S., Shing, T. K., Hung, E. C., Leung, T. Y., Lau, T. K., Chiu, R. W. and Lo, Y. M. (2008) 'Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma', *Clin Chem*, 54(3), 482-90.
- Chin, C. D., Linder, V. and Sia, S. K. (2012) 'Commercialization of microfluidic point-of-care diagnostic devices', *Lab Chip*, 12(12), 2118-34.
- Clerico, A., Del Ry, S. and Giannessi, D. (2000) 'Measurement of cardiac natriuretic hormones (atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and related peptides) in clinical practice: the need for a new generation of immunoassay methods', *Clin Chem*, 46(10), 1529-34.
- Cloonan, N., Wani, S., Xu, Q., Gu, J., Lea, K., Heater, S., Barbacioru, C., Steptoe, A. L., Martin, H. C., Nourbakhsh, E., Krishnan, K., Gardiner, B., Wang, X., Nones, K., Steen, J. A., Matigian, N. A., Wood, D. L., Kassahn, K. S., Waddell, N., Shepherd, J., Lee, C., Ichikawa, J., McKernan, K., Bramlett, K., Kuersten, S. and Grimmond, S. M. (2011) 'MicroRNAs and their isomiRs function cooperatively to target common biological pathways', *Genome Biol*, 12(12), R126.

- Collins, M. L., Irvine, B., Tyner, D., Fine, E., Zayati, C., Chang, C., Horn, T., Ahle, D., Detmer, J., Shen, L. P., Kolberg, J., Bushnell, S., Urdea, M. S. and Ho, D. D. (1997) 'A branched DNA signal amplification assay for quantification of nucleic acid targets below 100 molecules/ml', *Nucleic Acids Res*, 25(15), 2979-84.
- Condorelli, G., Latronico, M. V. and Cavarretta, E. (2014) 'microRNAs in cardiovascular diseases: current knowledge and the road ahead', *J Am Coll Cardiol*, 63(21), 2177-87.
- Couzin, J. (2005) 'Cancer biology. A new cancer player takes the stage', *Science*, 310(5749), 766-7.
- Covic, M., Hassa, P. O., Sacconi, S., Buerki, C., Meier, N. I., Lombardi, C., Imhof, R., Bedford, M. T., Natoli, G. and Hottiger, M. O. (2004) 'Arginine methyltransferase CARM1 is a promoter-specific regulator of NF- κ B-dependent gene expression', *The EMBO Journal*, 24(1), 85-96.
- Cox, M. B., Cairns, M. J., Gandhi, K. S., Carroll, A. P., Moscovis, S., Stewart, G. J., Broadley, S., Scott, R. J., Booth, D. R., Lechner-Scott, J. and Consortium, A. N. M. S. G. (2010) 'MicroRNAs miR-17 and miR-20a inhibit T cell activation genes and are under-expressed in MS whole blood', *PLoS One*, 5(8), e12132.
- De Guire, V., Robitaille, R., Tetreault, N., Guerin, R., Menard, C., Bambace, N. and Sapieha, P. (2013) 'Circulating miRNAs as sensitive and specific biomarkers for the diagnosis and monitoring of human diseases: promises and challenges', *Clin Biochem*, 46(10-11), 846-60.
- de Planell-Saguer, M. and Rodicio, M. C. (2011) 'Analytical aspects of microRNA in diagnostics: a review', *Anal Chim Acta*, 699(2), 134-52.
- Drummond, T. G., Hill, M. G. and Barton, J. K. (2003) 'Electrochemical DNA sensors', *Nat Biotechnol*, 21(10), 1192-1199.
- Elbeik, T., Surtihadi, J., Destree, M., Gorlin, J., Holodniy, M., Jortani, S. A., Kuramoto, K., Ng, V., Valdes, R., Jr., Valsamakis, A. and Terrault, N. A. (2004) 'Multicenter evaluation of the performance characteristics of the bayer VERSANT HCV RNA 3.0 assay (bDNA)', *J Clin Microbiol*, 42(2), 563-9.
- Elsholz, B., Worl, R., Blohm, L., Albers, J., Feucht, H., Grunwald, T., Jurgen, B., Schweder, T. and Hintsche, R. (2006) 'Automated detection and quantitation of bacterial RNA by using electrical microarrays', *Anal Chem*, 78(14), 4794-802.
- Fears, K. P., Clark, T. D. and Petrovykh, D. Y. (2013) 'Residue-dependent adsorption of model oligopeptides on gold', *J Am Chem Soc*, 135(40), 15040-52.

- Ferretti, L. and Sgaramella, V. (1981) 'Temperature dependence of the joining by T4 DNA ligase of termini produced by type II restriction endonucleases', *Nucleic Acids Res*, 9(1), 85-93.
- Friedrich, K., Gumbrecht, W., Huang, Y. and Sprinzl, M., Siemens Aktiengesellschaft, Munich (DE) (2013) *Method and kit for identification and quantification of a single-strand target nucleic acid*, WO 2013087630 A1.
- Gilad, S., Lithwick-Yanai, G., Barshack, I., Benjamin, S., Krivitsky, I., Edmonston, T. B., Bibbo, M., Thurm, C., Horowitz, L., Huang, Y., Feinmesser, M., Hou, J. S., St Cyr, B., Burnstein, I., Gibori, H., Dromi, N., Sanden, M., Kushnir, M. and Aharonov, R. (2012) 'Classification of the four main types of lung cancer using a microRNA-based diagnostic assay', *J Mol Diagn*, 14(5), 510-7.
- Gleaves, C. A., Welle, J., Campbell, M., Elbeik, T., Ng, V., Taylor, P. E., Kuramoto, K., Aceituno, S., Lewalski, E., Joppa, B., Sawyer, L., Schaper, C., McNairn, D. and Quinn, T. (2002) 'Multicenter evaluation of the Bayer VERSANT HIV-1 RNA 3.0 assay: analytical and clinical performance', *J Clin Virol*, 25(2), 205-16.
- Goffin, C., Bailly, V. and Verly, W. G. (1987) 'Nicks 3' or 5' to AP sites or to mispaired bases, and one-nucleotide gaps can be sealed by T4 DNA ligase', *Nucleic Acids Res*, 15(21), 8755-71.
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R. J., van Dongen, S., Bateman, A. and Enright, A. J. (2006) 'miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature', *Nucleic Acids Res*, 34(Database issue), D140-4.
- Gruber, A. R., Lorenz, R., Bernhart, S. H., Neubock, R. and Hofacker, I. L. (2008) 'The Vienna RNA websuite', *Nucleic Acids Res*, 36(Web Server issue), W70-4.
- Gumbrecht, W., Hintsche, R., Mund, K. and Stanzel, M., Siemens Aktiengesellschaft (Munich, DE) (2010) *Method for preventing chemical crosstalk in enzyme-linked reactions, and associated system*, US 7,838,261 B2.
- Gumbrecht, W., Paulicka, P. and Stanzel, M., Siemens Aktiengesellschaft, Munich (DE) (2014) *Apparatus and method comprising a sensor array and a porous plunger and use thereof*, US 8,753,582 B2.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011) 'Hallmarks of cancer: the next generation', *Cell*, 144(5), 646-74.
- Hansson, G. K. (2005) 'Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease', *New England Journal of Medicine*, 352(16), 1685-1695.
- Harada, K. and Orgel, L. E. (1993) 'Unexpected substrate specificity of T4 DNA ligase revealed by in vitro selection', *Nucleic Acids Res*, 21(10), 2287-91.

- Hausler, S. F., Keller, A., Chandran, P. A., Ziegler, K., Zipp, K., Heuer, S., Krockenberger, M., Engel, J. B., Honig, A., Scheffler, M., Dietl, J. and Wischhusen, J. (2010) 'Whole blood-derived miRNA profiles as potential new tools for ovarian cancer screening', *Br J Cancer*, 103(5), 693-700.
- Hayes, J., Peruzzi, P. P. and Lawler, S. (2014) 'MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy', *Trends Mol Med*, 20(8), 460-9.
- Herne, T. M. and Tarlov, M. J. (1997) 'Characterization of DNA Probes Immobilized on Gold Surfaces', *Journal of the American Chemical Society*, 119(38), 8916-8920.
- Higerd, T. B. and Spizizen, J. (1973) 'Isolation of two acetyl esterases from extracts of *Bacillus subtilis*', *J Bacteriol*, 114(3), 1184-92.
- Hofmann, S., Gumbrecht, W. and Huang, Y., Siemens Aktiengesellschaft, Munich (DE) (2015a) *Vorrichtung und Verfahren zur Detektion und Quantifizierung von einzelsträngigen Ziel-Nukleinsäuren*, DE 102014210092 A1.
- Hofmann, S., Huang, Y. and Gumbrecht, W., Siemens Aktiengesellschaft, Munich (DE) (2015b) *Verfahren zur Detektion und Quantifizierung von einer einzelsträngigen Ziel-Nukleinsäure*, DE 102013221402 A1.
- Hofmann, S., Huang, Y., Paulicka, P., Kappel, A., Katus, H. A., Keller, A., Meder, B., Stahler, C. F. and Gumbrecht, W. (2015c) 'Double-Stranded Ligation Assay for the Rapid Multiplex Quantification of MicroRNAs', *Anal Chem*, 87(24), 12104-11.
- Horn, T., Chang, C.-A. and Collins, M. L. (1995) 'Hybridization properties of the 5-methyl-isocytidine/isoguanosine base pair in synthetic oligodeoxynucleotides', *Tetrahedron Letters*, 36(12), 2033-2036.
- Horn, T., Chang, C. A. and Urdea, M. S. (1997) 'An improved divergent synthesis of comb-type branched oligodeoxyribonucleotides (bDNA) containing multiple secondary sequences', *Nucleic Acids Res*, 25(23), 4835-41.
- Hu, V. W., Saito, K., Inagaki, K., Kamimoto, T., Ito, Y., Sugita, T., Nakajo, S., Hirasawa, A., Iwamaru, A., Ishikura, T., Hanaoka, H., Okubo, K., Onozaki, T. and Zama, T. (2013) 'MicroRNA-196a Is a Putative Diagnostic Biomarker and Therapeutic Target for Laryngeal Cancer', *PLoS One*, 8(8), e71480.
- Hunter, M. P., Ismail, N., Zhang, X., Aguda, B. D., Lee, E. J., Yu, L., Xiao, T., Schafer, J., Lee, M. L., Schmittgen, T. D., Nana-Sinkam, S. P., Jarjoura, D. and Marsh, C. B. (2008) 'Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles', *PLoS One*, 3(11), e3694.

- Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A. E., Balint, E., Tuschl, T. and Zamore, P. D. (2001) 'A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA', *Science*, 293(5531), 834-8.
- Johnson, B. N. and Mutharasan, R. (2014) 'Biosensor-based microRNA detection: techniques, design, performance, and challenges', *Analyst*, 139(7), 1576-88.
- Johnson, J. L. (2007) 'Matrix metalloproteinases: influence on smooth muscle cells and atherosclerotic plaque stability', *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 5(2), 265-282.
- Jones, M. R., Quinton, L. J., Blahna, M. T., Neilson, J. R., Fu, S., Ivanov, A. R., Wolf, D. A. and Mizgerd, J. P. (2009) 'Zcchc11-dependent uridylation of microRNA directs cytokine expression', *Nat Cell Biol*, 11(9), 1157-63.
- Katoh, T., Sakaguchi, Y., Miyauchi, K., Suzuki, T., Kashiwabara, S., Baba, T. and Suzuki, T. (2009) 'Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3' adenylation mediated by the cytoplasmic poly(A) polymerase GLD-2', *Genes Dev*, 23(4), 433-8.
- Keller, A., Leidinger, P., Borries, A., Wendschlag, A., Wucherpfennig, F., Scheffler, M., Huwer, H., Lenhof, H. P. and Meese, E. (2009) 'miRNAs in lung cancer - studying complex fingerprints in patient's blood cells by microarray experiments', *BMC Cancer*, 9, 353.
- Kern, D., Collins, M., Fultz, T., Detmer, J., Hamren, S., Peterkin, J. J., Sheridan, P., Urdea, M., White, R., Yeghiazarian, T. and Todd, J. (1996) 'An enhanced-sensitivity branched-DNA assay for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma', *J Clin Microbiol*, 34(12), 3196-202.
- Kershaw, C. J. and O'Keefe, R. T. (2012) 'Splint ligation of RNA with T4 DNA ligase', *Methods Mol Biol*, 941, 257-69.
- Kim, E. S., Lee, N., Park, J. W. and Choi, K. Y. (2013) 'Kinetic characterization of on-chip DNA ligation on dendron-coated surfaces with nanoscaled lateral spacings', *Nanotechnology*, 24(40), 405703.
- Kim, J. and Mrksich, M. (2010) 'Profiling the selectivity of DNA ligases in an array format with mass spectrometry', *Nucleic Acids Res*, 38(1), e2.
- Kinnunen, P., Vuolteenaho, O. and Ruskoaho, H. (1993) 'Mechanisms of atrial and brain natriuretic peptide release from rat ventricular myocardium: effect of stretching', *Endocrinology*, 132(5), 1961-1970.
- Kleppe, K., Van de Sande, J. H. and Khorana, H. G. (1970) 'Polynucleotide ligase-catalyzed joining of deoxyribo-oligonucleotides on ribopolynucleotide templates and of ribo-oligonucleotides on deoxyribopolynucleotide templates', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 67(1), 68-73.

- Knackmuss, U., Lindner, S. E., Aneichyk, T., Kotkamp, B., Knust, Z., Villunger, A. and Herzog, S. (2015) 'MAP3K11 is a tumor suppressor targeted by the oncomiR miR-125b in early B cells', *Cell Death Differ.*
- Laemmli, U. K. (1970) 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4', *Nature*, 227(5259), 680-5.
- Lao, R., Song, S., Wu, H., Wang, L., Zhang, Z., He, L. and Fan, C. (2005) 'Electrochemical interrogation of DNA monolayers on gold surfaces', *Anal Chem*, 77(19), 6475-80.
- Lawrie, C. H., Gal, S., Dunlop, H. M., Pushkaran, B., Liggins, A. P., Pulford, K., Banham, A. H., Pezzella, F., Boulwood, J., Wainscoat, J. S., Hatton, C. S. and Harris, A. L. (2008) 'Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma', *Br J Haematol*, 141(5), 672-5.
- Lee, L. W., Zhang, S., Etheridge, A., Ma, L., Martin, D., Galas, D. and Wang, K. (2010) 'Complexity of the microRNA repertoire revealed by next-generation sequencing', *RNA*, 16(11), 2170-80.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L. and Ambros, V. (1993) 'The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*', *Cell*, 75(5), 843-54.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S. and Kim, V. N. (2003) 'The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing', *Nature*, 425(6956), 415-9.
- Leidinger, P., Backes, C., Deutscher, S., Schmitt, K., Mueller, S. C., Frese, K., Haas, J., Ruprecht, K., Paul, F., Stahler, C., Lang, C. J., Meder, B., Bartfai, T., Meese, E. and Keller, A. (2013) 'A blood based 12-miRNA signature of Alzheimer disease patients', *Genome Biol*, 14(7), R78.
- Levicky, R., Herne, T. M., Tarlov, M. J. and Satija, S. K. (1998) 'Using Self-Assembly To Control the Structure of DNA Monolayers on Gold: A Neutron Reflectivity Study', *Journal of the American Chemical Society*, 120(38), 9787-9792.
- Li, C., Fang, Z., Jiang, T., Zhang, Q., Liu, C., Zhang, C. and Xiang, Y. (2013) 'Serum microRNAs profile from genome-wide serves as a fingerprint for diagnosis of acute myocardial infarction and angina pectoris', *BMC Med Genomics*, 6, 16.
- Liu, X., Wang, L., Li, H., Lu, X., Hu, Y., Yang, X., Huang, C. and Gu, D. (2014) 'Coactivator-associated arginine methyltransferase 1 targeted by miR-15a regulates inflammation in acute coronary syndrome', *Atherosclerosis*, 233(2), 349-56.
- Magga, J., Puhakka, M., Hietakorpi, S., Punnonen, K., Uusimaa, P., Risteli, J., Vuolteenaho, O., Ruskoaho, H. and Peuhkurinen, K. (2004) 'Atrial natriuretic peptide, B-type

- natriuretic peptide, and serum collagen markers after acute myocardial infarction', *J Appl Physiol* (1985), 96(4), 1306-11.
- Manco, G., Adinolfi, E., Pisani, F. M., Ottolina, G., Carrea, G. and Rossi, M. (1998) 'Overexpression and properties of a new thermophilic and thermostable esterase from *Bacillus acidocaldarius* with sequence similarity to hormone-sensitive lipase subfamily', *Biochem J*, 332 (Pt 1), 203-12.
- Mathews, D. H., Disney, M. D., Childs, J. L., Schroeder, S. J., Zuker, M. and Turner, D. H. (2004) 'Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(19), 7287-92.
- Meder, B., Keller, A., Vogel, B., Haas, J., Sedaghat-Hamedani, F., Kayvanpour, E., Just, S., Borries, A., Rudloff, J., Leidinger, P., Meese, E., Katus, H. A. and Rottbauer, W. (2011) 'MicroRNA signatures in total peripheral blood as novel biomarkers for acute myocardial infarction', *Basic Res Cardiol*, 106(1), 13-23.
- Meiri, E., Mueller, W. C., Rosenwald, S., Zepeniuk, M., Klinke, E., Edmonston, T. B., Werner, M., Lass, U., Barshack, I., Feinmesser, M., Huszar, M., Fogt, F., Ashkenazi, K., Sanden, M., Goren, E., Dromi, N., Zion, O., Burnstein, I., Chajut, A., Spector, Y. and Aharonov, R. (2012) 'A second-generation microRNA-based assay for diagnosing tumor tissue origin', *Oncologist*, 17(6), 801-12.
- Michener, M. L., Gierse, J. K., Seetharam, R., Fok, K. F., Olins, P. O., Mai, M. S. and Needleman, P. (1986) 'Proteolytic processing of atriopeptin prohormone', *Mol Pharmacol*, 30(6), 552-7.
- Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogosova-Agadjanyan, E. L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K. C., Allen, A., Lin, D. W., Urban, N., Drescher, C. W., Knudsen, B. S., Stirewalt, D. L., Gentleman, R., Vessella, R. L., Nelson, P. S., Martin, D. B. and Tewari, M. (2008) 'Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(30), 10513-8.
- Moldovan, L., Batte, K. E., Trgovcich, J., Wisler, J., Marsh, C. B. and Piper, M. (2014) 'Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers', *J Cell Mol Med*, 18(3), 371-90.
- Moore, M. J. and Sharp, P. A. (1992) 'Site-specific modification of pre-mRNA: the 2'-hydroxyl groups at the splice sites', *Science*, 256(5059), 992-7.
- Morin, R. D., O'Connor, M. D., Griffith, M., Kuchenbauer, F., Delaney, A., Prabhu, A. L., Zhao, Y., McDonald, H., Zeng, T., Hirst, M., Eaves, C. J. and Marra, M. A. (2008) 'Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells', *Genome Res*, 18(4), 610-21.

- Mortensen, R. D., Serra, M., Steitz, J. A. and Vasudevan, S. (2011) 'Posttranscriptional activation of gene expression in *Xenopus laevis* oocytes by microRNA-protein complexes (microRNPs)', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(20), 8281-6.
- Mozaffarian, D., Benjamin, E. J., Go, A. S., Arnett, D. K., Blaha, M. J., Cushman, M., de Ferranti, S., Despres, J. P., Fullerton, H. J., Howard, V. J., Huffman, M. D., Judd, S. E., Kissela, B. M., Lackland, D. T., Lichtman, J. H., Lisabeth, L. D., Liu, S., Mackey, R. H., Matchar, D. B., McGuire, D. K., Mohler, E. R., 3rd, Moy, C. S., Muntner, P., Mussolino, M. E., Nasir, K., Neumar, R. W., Nichol, G., Palaniappan, L., Pandey, D. K., Reeves, M. J., Rodriguez, C. J., Sorlie, P. D., Stein, J., Towfighi, A., Turan, T. N., Virani, S. S., Willey, J. Z., Woo, D., Yeh, R. W., Turner, M. B., American Heart Association Statistics, C. and Stroke Statistics, S. (2015) 'Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association', *Circulation*, 131(4), e29-322.
- Nakano, S., Kanzaki, T. and Sugimoto, N. (2004) 'Influences of ribonucleotide on a duplex conformation and its thermal stability: study with the chimeric RNA-DNA strands', *J Am Chem Soc*, 126(4), 1088-95.
- Nebling, E., Grunwald, T., Albers, J., Schafer, P. and Hintsche, R. (2004) 'Electrical detection of viral DNA using ultramicroelectrode arrays', *Anal Chem*, 76(3), 689-96.
- Neilsen, C. T., Goodall, G. J. and Bracken, C. P. (2012) 'IsomiRs--the overlooked repertoire in the dynamic microRNAome', *Trends Genet*, 28(11), 544-9.
- Newman, M. A., Mani, V. and Hammond, S. M. (2011) 'Deep sequencing of microRNA precursors reveals extensive 3' end modification', *RNA*, 17(10), 1795-803.
- Nygaard, S., Jacobsen, A., Lindow, M., Eriksen, J., Balslev, E., Flyger, H., Tolstrup, N., Moller, S., Krogh, A. and Litman, T. (2009) 'Identification and analysis of miRNAs in human breast cancer and teratoma samples using deep sequencing', *BMC Med Genomics*, 2, 35.
- Nykanen, A., Haley, B. and Zamore, P. D. (2001) 'ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway', *Cell*, 107(3), 309-21.
- Owczarzy, R., Moreira, B. G., You, Y., Behlke, M. A. and Walder, J. A. (2008) 'Predicting stability of DNA duplexes in solutions containing magnesium and monovalent cations', *Biochemistry*, 47(19), 5336-53.
- Owczarzy, R., You, Y., Moreira, B. G., Manthey, J. A., Huang, L., Behlke, M. A. and Walder, J. A. (2004) 'Effects of sodium ions on DNA duplex oligomers: improved predictions of melting temperatures', *Biochemistry*, 43(12), 3537-54.
- Pachl, C., Todd, J. A., Kern, D. G., Sheridan, P. J., Fong, S. J., Stempien, M., Hoo, B., Besemer, D., Yeghiazarian, T., Irvine, B. and et al. (1995) 'Rapid and precise quantification of HIV-1 RNA in plasma using a branched DNA signal amplification assay', *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 8(5), 446-54.

- Pasquinelli, A. E. (2012) 'MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship', *Nat Rev Genet*, 13(4), 271-82.
- Peterson, A. W., Heaton, R. J. and Georgiadis, R. M. (2001) 'The effect of surface probe density on DNA hybridization', *Nucleic Acids Res*, 29(24), 5163-8.
- Pöhlmann, C. and Sprinzl, M. (2010) 'Electrochemical detection of microRNAs via gap hybridization assay', *Anal Chem*, 82(11), 4434-40.
- Pyshnyi, D. V. and Ivanova, E. M. (2004) 'The influence of nearest neighbours on the efficiency of coaxial stacking at contiguous stacking hybridization of oligodeoxyribonucleotides', *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 23(6-7), 1057-64.
- Ramnani, P., Gao, Y., Ozsoz, M. and Mulchandani, A. (2013) 'Electronic detection of microRNA at attomolar level with high specificity', *Anal Chem*, 85(17), 8061-4.
- Religio, A., Schwager, C., Richter, A., Ansorge, W. and Valcarcel, J. (2002) 'Optimization of oligonucleotide-based DNA microarrays', *Nucleic Acids Res*, 30(11), e51.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L. and Bradley, A. (2004) 'Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units', *Genome Res*, 14(10A), 1902-10.
- Ruskoaho, H. (1992) 'Atrial natriuretic peptide: synthesis, release, and metabolism', *Pharmacol Rev*, 44(4), 479-602.
- Salehi, E., Eftekhari, R., Oraei, M., Gharib, A. and Bidad, K. (2015) 'MicroRNAs in rheumatoid arthritis', *Clin Rheumatol*, 34(4), 615-28.
- Schulte, C. and Zeller, T. (2015) 'microRNA-based diagnostics and therapy in cardiovascular disease-Summing up the facts', *Cardiovasc Diagn Ther*, 5(1), 17-36.
- Seitz, H., Ghildiyal, M. and Zamore, P. D. (2008) 'Argonaute loading improves the 5' precision of both MicroRNAs and their miRNA* strands in flies', *Curr Biol*, 18(2), 147-51.
- Sheinerman, K. S. and Umansky, S. R. (2013) 'Circulating cell-free microRNA as biomarkers for screening, diagnosis and monitoring of neurodegenerative diseases and other neurologic pathologies', *Front Cell Neurosci*, 7, 150.
- Shimayama, T., Nishikawa, F., Nishikawa, S. and Taira, K. (1993) 'Nuclease-resistant chimeric ribozymes containing deoxyribonucleotides and phosphorothioate linkages', *Nucleic Acids Res*, 21(11), 2605-11.

- Singhal, P. and Kuhr, W. G. (1997) 'Ultrasensitive voltammetric detection of underivatized oligonucleotides and DNA', *Anal Chem*, 69(23), 4828-32.
- Spector, Y., Fridman, E., Rosenwald, S., Zilber, S., Huang, Y., Barshack, I., Zion, O., Mitchell, H., Sanden, M. and Meiri, E. (2013) 'Development and validation of a microRNA-based diagnostic assay for classification of renal cell carcinomas', *Mol Oncol*, 7(3), 732-8.
- Tiberio, P., Callari, M., Angeloni, V., Daidone, M. G. and Appierto, V. (2015) 'Challenges in using circulating miRNAs as cancer biomarkers', *Biomed Res Int*, 2015, 731479.
- Tsongalis, G. J. and Silverman, L. M. (2006) 'Molecular diagnostics: a historical perspective', *Clin Chim Acta*, 369(2), 188-92.
- Urdea, M. S., Horn, T., Fultz, T. J., Anderson, M., Running, J. A., Hamren, S., Ahle, D. and Chang, C. A. (1991) 'Branched DNA amplification multimers for the sensitive, direct detection of human hepatitis viruses', *Nucleic Acids Symp Ser*, (24), 197-200.
- Vasiliskov, V. A., Prokopenko, D. V. and Mirzabekov, A. D. (2001) 'Parallel multiplex thermodynamic analysis of coaxial base stacking in DNA duplexes by oligodeoxyribonucleotide microchips', *Nucleic Acids Res*, 29(11), 2303-13.
- Vaz, C., Ahmad, H. M., Bharti, R., Pandey, P., Kumar, L., Kulshreshtha, R. and Bhattacharya, A. (2013) 'Analysis of the microRNA transcriptome and expression of different isomiRs in human peripheral blood mononuclear cells', *BMC Res Notes*, 6, 390.
- Vogel, B., Keller, A., Frese, K. S., Kloos, W., Kayvanpour, E., Sedaghat-Hamedani, F., Hassel, S., Marquart, S., Beier, M., Giannitis, E., Hardt, S., Katus, H. A. and Meder, B. (2013a) 'Refining diagnostic microRNA signatures by whole-miRNome kinetic analysis in acute myocardial infarction', *Clin Chem*, 59(2), 410-8.
- Vogel, B., Keller, A., Frese, K. S., Leidinger, P., Sedaghat-Hamedani, F., Kayvanpour, E., Kloos, W., Backe, C., Thanaraj, A., Brefort, T., Beier, M., Hardt, S., Meese, E., Katus, H. A. and Meder, B. (2013b) 'Multivariate miRNA signatures as biomarkers for non-ischaemic systolic heart failure', *Eur Heart J*, 34(36), 2812-22.
- Wahlgren, M. and Arnebrant, T. (1991) 'Protein adsorption to solid surfaces', *Trends Biotechnol*, 9(6), 201-8.
- Wang, B., Howel, P., Bruheim, S., Ju, J., Owen, L. B., Fodstad, O. and Xi, Y. (2011) 'Systematic evaluation of three microRNA profiling platforms: microarray, beads array, and quantitative real-time PCR array', *PLoS One*, 6(2), e17167.
- Wang, C., Hu, J., Lu, M., Gu, H., Zhou, X., Chen, X., Zen, K., Zhang, C. Y., Zhang, T., Ge, J., Wang, J. and Zhang, C. (2015) 'A panel of five serum miRNAs as a potential diagnostic tool for early-stage renal cell carcinoma', *Sci Rep*, 5, 7610.

- Wang, Y. R., Stanzel, M., Gumbrecht, W., Humenik, M. and Sprinzl, M. (2007) 'Esterase 2-oligodeoxynucleotide conjugates as sensitive reporter for electrochemical detection of nucleic acid hybridization', *Biosensors & Bioelectronics*, 22(8), 1798-1806.
- Welch, C., Chen, Y. and Stallings, R. L. (2007) 'MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells', *Oncogene*, 26(34), 5017-22.
- Willett, R. L., Baldwin, K. W., West, K. W. and Pfeiffer, L. N. (2005) 'Differential adhesion of amino acids to inorganic surfaces', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(22), 7817-22.
- Witwer, K. W. (2015) 'Circulating microRNA biomarker studies: pitfalls and potential solutions', *Clin Chem*, 61(1), 56-63.
- Wolff, A. C., Hammond, M. E., Schwartz, J. N., Hagerty, K. L., Allred, D. C., Cote, R. J., Dowsett, M., Fitzgibbons, P. L., Hanna, W. M., Langer, A., McShane, L. M., Paik, S., Pegram, M. D., Perez, E. A., Press, M. F., Rhodes, A., Sturgeon, C., Taube, S. E., Tubbs, R., Vance, G. H., van de Vijver, M., Wheeler, T. M., Hayes, D. F., American Society of Clinical, O. and College of American, P. (2007) 'American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer', *J Clin Oncol*, 25(1), 118-45.
- Wyman, S. K., Knouf, E. C., Parkin, R. K., Fritz, B. R., Lin, D. W., Dennis, L. M., Krouse, M. A., Webster, P. J. and Tewari, M. (2011) 'Post-transcriptional generation of miRNA variants by multiple nucleotidyl transferases contributes to miRNA transcriptome complexity', *Genome Res*, 21(9), 1450-61.
- Xu, P., Guo, M. and Hay, B. A. (2004) 'MicroRNAs and the regulation of cell death', *Trends Genet*, 20(12), 617-24.
- Yakovchuk, P., Protozanova, E. and Frank-Kamenetskii, M. D. (2006) 'Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix', *Nucleic Acids Res*, 34(2), 564-74.
- Yang, I. V. and Thorp, H. H. (2001) 'Modification of indium tin oxide electrodes with repeat polynucleotides: electrochemical detection of trinucleotide repeat expansion', *Anal Chem*, 73(21), 5316-22.
- Yuan, B. F., Zhuang, X. Y., Hao, Y. H. and Tan, Z. (2008) 'Kinetics of base stacking-aided DNA hybridization', *Chem Commun (Camb)*, (48), 6600-2.
- Zhang, Z.-L., Pang, D.-W., Zhang, R.-Y., Yan, J.-W., Mao, B.-W. and Qi, Y.-P. (2002) 'Investigation of DNA Orientation on Gold by EC-STM', *Bioconjugate Chemistry*, 13(1), 104-109.

Zor, T. and Selinger, Z. (1996) 'Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies', *Anal Biochem*, 236(2), 302-8.

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

ACS	Akutes Koronarsyndrom (<i>acute coronary syndrome</i>)
AG	Arbeitsgruppe
AMI	Akuter Myokardinfarkt
AMP	2-Amino-2-methylpropanol
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
bDNA	<i>branched</i> DNA
BS	The Blocking Solution (Candor Bioscience)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine serum albumine</i>)
CARM-1	Coaktivator-assoziierte Arginin Methyltransferase 1
CMOS	<i>complementary metal-oxide-semiconductor</i>
CT	Corporate Technology
CV	Variationskoeffizient
DEAE	Diethylaminoethyl(-Gruppen)
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
dUTP	Desoxy-Uridintriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST2	Esterase 2 (aus <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>)
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
h	Stunde(n)
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
I	Elektrische Stromstärke

iso-dC	Isocytidin (5-Methyl-2'-Desoxyisocytidin)
iso-dG	Isoguanosin (5-Methyl-2'-Desoxyisoguanosin)
MAD	Median der absoluten Abweichungen (<i>Median absolute deviation</i>)
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight</i>
MCH	6-Mercaptohexanol
min	Minute(n)
miRNA	microRNA
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MW	Mittelwert
NSP	Niedrigsalzpuffer
Nt.	Nukleotid(e)
ODN(s)	Oligodesoxyribonukleotid(e)
pAP	para-Aminophenol
pAPB	para-Aminophenylbutyrat
pAPP	para-Aminophenylphosphat
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDA	Persönlicher digitaler Assistent
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEG	Polyethylenglykol
POC	<i>Point-of-Care</i>
pre-miRNA	<i>precursor miRNA</i>
pri-miRNA	<i>primary miRNA</i>
QLB	<i>Quick Ligation Buffer</i>
qPCR	quantitative PCR
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase-PCR
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SAM	Selbstorganisierende Monoschicht (<i>self-assembled monolayer</i>)
SD	Standardabweichung

SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
SF	Systemflüssigkeit
SP	Spotting-Puffer
SSC	NaCl-Natriumcitrat-Puffer (<i>saline sodium citrate buffer</i>)
STEMI	ST-Hebungsinfarkt (<i>ST Elevation Myocardial Infarktion</i>)
Sulfo-SMCC	sulfo-Succinimidyl-4(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Units</i> , Einheit enzymatischer Aktivität
UNG	Uracil-N-Glycosylase
UTR	Untranslatierte Region
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Volumeneinheit (<i>volume/volume</i>)
W	Watt
WP	Waschpuffer
w/v	Gewicht pro Volumeneinheit (<i>weight/volume</i>)

8.2 Nukleinsäuresequenzen

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	(Anmerkung)
Oligonukleotide für die Esterase 2-Konjugation		
Ra15	Phosphat-GCA ACG AGC GCA ACC TTT T-Amino	(EST2-Ra15)
Ra11	Phosphat-GCA ACG AGC GCT TTT-Amino	EST2-Ra11
Rb15	Phosphat-TCA CGT CAC AAT CGA TTT T-Amino	EST2-Rb15
Ra11-rev	Amino-TTT TGC GCT CGu ugc	EST2-Ra-rev
Biotinmarkierte Sonden		
Syn-T-21-bio	Biotin-TTT TTT GTG CCT TCG GGA ACC G	
Syn-T-96-bio	Biotin-TTT TTT CGA GGG TGC CTT CGG AAC TG	
Kontroll-Fänger-Oligonukleotide		
Fänger_rnd	Thiol-TTT TTT TTT TTT TNN NNN NNN NNN NNN NNN	Sonderbasen N: Zufallsbase
Fänger_bio	Thiol-TTT TTT TTT TTT TCT CTT TAC GTG GCG TGA GCA-Biotin	
Oligonukleotide als DNA-Ziel-Nukleinsäuren		
miDNA-21	Phosphat-TAG CTT ATC AGA CTG ATG TTG A	
miDNA-96	Phosphat-TTT GGC ACT AGC ACA TTT TTG CT	
miDNA-Alien1	Phosphat-AGA TCG CCA TAC CCT GGA GAT A	
Oligonukleotide für 3-Komponenten-Methode		
Fänger_rnd-3comp	GGT TGC GCT CGT TGC NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNT TTT TT-Thiol	Sonderbasen N: Zufallsbase
Fänger_96-3comp	GGT TGC GCT CGT TGC AGC AAA AAT GTG CTA GTG CCA AAT TTT TT-Thiol	
Oligonukleotide für 4-Komponenten-Methode		
Fänger_21	Thiol-TTT TTT TTT CGG TTC CCG AAG GCA C	
Fänger_96	Thiol-TTT TTT TTT CAG TTC CGA AGG CAC CCT CG	
G_21-Ra	GGT TGC GCT CGT TGC TCA ACA TCA GTC TGA TAA GCT AGT GCC TTC GGG AAC CG	
G_96-Ra	GGT TGC GCT CGT TGC AGC AAA AAT GTG CTA GTG CCA AAC GAG GGT GCC TTC GGA ACT G	
Oligonukleotide als synthetische miRNAs		
miR-Alien1	Phosphat-aga ugc cca uac ccu gga gau a	
miR-Alien2	Phosphat-uag gau cgg uac uca cgc gag g	
miR-7-1	Phosphat-caa caa auc aca guc ugc cau a	
miR-380	Phosphat-ugg uug acc aua gaa cau gcg c	
miR-142	Phosphat-cau aaa gua gaa agc acu acu	
miR-1281	Phosphat-ucg ccu ccu ccu cuc cc	
miR-26a	Phosphat-uuc aag uaa ucc agg aua ggc u	
miR-92a	Phosphat-uau ugc acu ugu ccc ggc cug u	
miR-151a	Phosphat-ucg agg agc uca cag ucu agu	
miR-16	Phosphat-uag cag cac gua aau auu ggc g	
miR-93	Phosphat-caa agu gcu guu cgu gca ggu ag	
miR-486	Phosphat-ucc ugu acu gag cug ccc cga g	

Anhang

let-7a	Phosphat-uga ggu agu agg uug uau agu u
let-7b	Phosphat-uga ggu agu agg uug ugu ggu u
let-7c	Phosphat-uga ggu agu agg uug uau ggu u
let-7f	Phosphat-uga ggu agu aga uug uau agu u
DNA-Oligonukleotide des Fängersatz A	
Fänger_A1	Thiol-TTT TTT GCT AGA GCT GCG GTC G
Fänger_A2	Thiol-TTT TTT CCC AGC TCG TAG ACC G
Fänger_A3	Thiol-TTT TTT ACT GCT TTG CGT AGC G
Fänger_A4	Thiol-TTT TTT CAG ATC CTG CAC GCA T
Fänger_A5	Thiol-TTT TTT ACG TGT CTT CCG CTC G
Fänger_A6	Thiol-TTT TTT TAG GCT GAT GCC GCA A
Fänger_A7	Thiol-TTT TTT GTC AGG TCG TCA AGC G
Fänger_A8	Thiol-TTT TTT TTC GGC GAA ACT CAG C
Gegenstrang-Oligonukleotide für EST2-Ra11 Konjugat und Fängersatz A (4-Komponenten)	
G_380_A1_Ra	GGT TGC GCT CGT TGC GCG CAT GTT CTA TGG TCA ACC ACG ACC GCA GCT CTA GC
G_Alien1_A2_Ra	GGT TGC GCT CGT TGC TAT CTC CAG GGT ATG GCG ATC TCG GTC TAC GAG CTG GG
G_7-1_A3_Ra	GGT TGC GCT CGT TGC TAT GGC AGA CTG TGA TTT GTT GCG CTA CGC AAA GCA GT
G_93_A4_Ra	GGT TGC GCT CGT TGC CTA CCT GCA CGA ACA GCA CTT TGA TGC GTG CAG GAT CTG
G_142_A5_Ra	GGT TGC GCT CGT TGC AGT AGT GCT TTC TAC TTT ATG CGA GCG GAA GAC ACG T
G_1281_A6_Ra	GGT TGC GCT CGT TGC GGG AGA GGA GGA GGC GAT TGC GGC ATC AGC CTA
G_16_A7_Ra	GGT TGC GCT CGT TGC CGC CAA TAT TTA CGT GCT GCT ACG CTT GAC GAC CTG AC
G_151a_A8_Ra	GGT TGC GCT CGT TGC ACT AGA CTG TGA GCT CCT CGA GCT GAG TTT CGC CGA A
Gegenstrang-Oligonukleotide für Est-Rb15 Konjugat und Fängersatz A (4-Komponenten)	
G_380_A1_Rb	TCG ATT GTG ACG TGA GCG CAT GTT CTA TGG TCA ACC ACG ACC GCA GCT CTA GC
G_Alien1_A2_Rb	TCG ATT GTG ACG TGA TAT CTC CAG GGT ATG GCG ATC TCG GTC TAC GAG CTG GG
G_7-1_A3_Rb	TCG ATT GTG ACG TGA TAT GGC AGA CTG TGA TTT GTT GCG CTA CGC AAA GCA GT
G_93_A4_Rb	TCG ATT GTG ACG TGA CTA CCT GCA CGA ACA GCA CTT TGA TGC GTG CAG GAT CTG
G_142_A5_Rb	TCG ATT GTG ACG TGA AGT AGT GCT TTC TAC TTT ATG CGA GCG GAA GAC ACG T
G_1281_A6_Rb	TCG ATT GTG ACG TGA GGG AGA GGA GGA GGC GAT TGC GGC ATC AGC CTA
G_16_A7_Rb	TCG ATT GTG ACG TGA CGC CAA TAT TTA CGT GCT GCT ACG CTT GAC GAC CTG AC
G_151a_A8_Rb	TCG ATT GTG ACG TGA ACT AGA CTG TGA GCT CCT CGA GCT GAG TTT CGC CGA A
RNA-Fängeroligonukleotid	
RNA-Fänger_A2'	Thiol-ccc agc ucg uag acc g
Chimäre Oligonukleotide des Fängersatz A	
chFänger_A2'	Thiol-CCC AGC TCG TAG acc g
chFänger_A2_1RNt	Thiol-TTT TTT CCC AGC TCG TAG ACC g
chFänger_A2_2RNt	Thiol-TTT TTT CCC AGC TCG TAG ACc g
chFänger_A2_3RNt	Thiol-TTT TTT CCC AGC TCG TAG Acc g
chFänger_A1	Thiol-TTT TTT GCT AGA GCT GCG guc g
chFänger_A2	Thiol-TTT TTT CCC AGC TCG TAG acc g
chFänger_A3	Thiol-TTT TTT ACT GCT TTG CGT agc g

Anhang

chFänger_A4	Thiol-TTT TTT CAG ATC CTG CAC gca t
chFänger_A5	Thiol-TTT TTT ACG TGT CTT CCG ctc g
chFänger_A6	Thiol-TTT TTT TAG GCT GAT GCC gca a
chFänger_A7	Thiol-TTT TTT GTC AGG TCG TCA agc g
chFänger_A8	Thiol-TTT TTT TTC GGC GAA ACT cag c
Chimäre Oligonukleotide des Fängersatz B	
chFänger_B1	Thiol-TTT TTT CAG GAC GAT GAT GGc acg
chFänger_B2	Thiol-TTT TTT GAC CCA GCT CGT AGa ccg
chFänger_B3	Thiol-TTT TTT CGA CGA TAG CTT GG <u>u</u> acg
chFänger_B4	Thiol-TTT TTT CCC AGA TCC TGC ACg cau
chFänger_B5	Thiol-TTT TTT TCA ACT TGT GCA GCc agc
chFänger_B6	Thiol-TTT TTT CAC GTC AGA CAG CTc cag
chFänger_B7	Thiol-TTT TTT GAG TCA CCT GCG CTg aac
chFänger_B8	Thiol-TTT TTT CTT CTC GGT GTC CAc agg
Gegenstrang-Oligonukleotide für EST2-Ra11 Konjugat und Fängersatz B (4-Komponenten)	
G_151a_B1_Ra	GGT TGC GCT CGT TGC ACT AGA CTG TGA GCT CCT CGA CGT GCC ATC ATC GTC
G_142_B2_Ra	GGT TGC GCT CGT TGC AGT AGT GCT TTC TAC TTT ATG CGG TCT ACG AGC TGG GTC A
G_486_B3_Ra	GGT TGC GCT CGT TGC CTC GGG GCA GCT CAG TAC AGG ACG TAC CAA GCT ATC G
G_16_B4_Ra	GGT TGC GCT CGT TGC CGC CAA TAT TTA CGT GCT GCT AAT GCG TGC AGG ATC T
G_26a_B5_Ra	GGT TGC GCT CGT TGC AGC CTA TCC TGG ATT ACT TGA AGC TGG CTG CAC AAG TTG A
G_93_B6_Ra	GGT TGC GCT CGT TGC CTA CCT GCA CGA ACA GCA CTT TGC TGG AGC TGT CTG AC
G_Alien1_B7_Ra	GGT TGC GCT CGT TGC TAT CTC CAG GGT ATG GCG ATC TGT TCA GCG CAG GTG A
G_92a_B8_Ra	GGT TGC GCT CGT TGC ACA GGC CGG GAC AAG TGC AAT ACC TGT GGA CAC CGA G
Oligonukleotide für umgekehrte Orientierung des Hybridisierungskonstrukts (4-Komponenten)	
Fänger_B4-rev	Phosphat-CCC AGA TCC TGC ACG CAT TTT TTT-Thiol
G_16_B4-rev	ATG CGT GCA GGA TCT GGG CGC CAA TAT TTA CGT GCT GCT AGC AAC GAG CGC
Spezifische Oligonukleotide für Kontroll-Detektionskomponenten (Sandwich-Ligation)	
sRS_Alien1_Ra	GGT TGC GCT CGT TGC TAT CTC CAG GG
sRS_Alien2_Ra	GGT TGC GCT CGT TGC CCT CGC GTG A
sFS_Alien1_B7	TAT GGC GAT CTG TTC AGC GCA GGT GA
sFS_Alien1_B7'	TAT GGC GAT CTG TTC AGC GCA GGT GAC TC
sFS_Alien2_A1	GTA CCG ATC CTA CGA CCG CAG CTC TAG C
Spezifische Oligonukleotide für Detektionskomponenten des Testpanels (Sandwich-Ligation)	
sRS_151a_Ra	GGT TGC GCT CGT TGC ACT AGA CTG TG
sRS_142_Ra	GGT TGC GCT CGT TGC AGT AGT GC
sRS_486_Ra	GGT TGC GCT CGT TGC CTC GGG GCA G
sRS_16_Ra	GGT TGC GCT CGT TGC CGC CAA TAT TTA
sRS_26a_Ra	GGT TGC GCT CGT TGC AGC CTA TCC
sRS_93_Ra	GGT TGC GCT CGT TGC CTA CCT GCA CG
sRS_92a_Ra	GGT TGC GCT CGT TGC ACA GGC CGG

Anhang

sFS_151a_B1	AGC TCC TCG ACG TGC CAT CAT CGT C	
sFS_142_B2	TTT CTA CTT TAT GCG GTC TAC GAG CTG GGT CA	
sFS_486_B3	CTC AGT ACA GGA CGT ACC AAG CTA TCG	
sFS_16_B4	CGT GCT GCT AAT GCG TGC AGG ATC T	
sFS_26a_B5	TGG ATT ACT TGA AGC TGG CTG CAC AAG TTG A	
sFS_93_B6	AAC AGC ACT TTG CTG GAG CTG TCT GAC	
sFS_92a_B8	GAC AAG TGC AAT ACC TGT GGA CAC CGA G	
Spezifische Oligonukleotide für let-7a-Detektionskomponenten (Sandwich-Ligation)		
sFS_let-7a_B5	TAC TAC CTC AGC TGG CTG CAC AAG TTG A	
sRS_let-7a_Ra	GGT TGC GCT CGT TGC AAC TAT ACA ACC	
Spezifische Oligonukleotide für Detektionskomponenten zur IsomiR-Diskriminierung (Sandwich-Ligation)		
sRS_93_Überhang	GGT TGC GCT CGT TGC TAC CTG CAC G	
sRS_93_Lücke	GGT TGC GCT CGT TGC ACT ACC TGC ACG	
Spezifische Oligonukleotide für bDNA-Detektionskomponenten (Sandwich-Ligation)		
sRS_26a_bDNA	JCT GFT ATJ CCG AGC CTA TCC	F: iso-dC
sRS_93_bDNA	JCT GFT ATJ CCG CTA CCT GCA CG	J: iso-dG
Synthetische miRNAs des kardialen Panels		
miR-191	Phosphat-caa cgg aau ccc aaa agc agc ug	
miR-145	Phosphat-guc cag uuu ucc cag gaa ucc cu	
miR-181a	Phosphat-aac auu caa cgc ugu cgg uga gu	
miR-425	Phosphat-aau gac acg auc acu ccc guu ga	
miR-636	Phosphat-ugu gcu ugc ucg ucc cgc ccg ca	
miR-15a	Phosphat-uag cag cac aua aug guu ugu g	
miR-30c	Phosphat-ugu aaa cau ccu aca cuc uca gc	
miR-362	Phosphat-aau ccu ugg aac cua ggu gug agu	
Spezifische Oligonukleotide für Detektionskomponenten des kardialen Panels (Sandwich-Ligation)		
sRS_191_Ra	GGT TGC GCT CGT TGC CAG CTG CTT TTG	
sRS_145_Ra	GGT TGC GCT CGT TGC AGG GAT TCC TG	
sRS_181a_Ra	GGT TGC GCT CGT TGC ACT CAC CGA CA	
sRS_636_Ra	GGT TGC GCT CGT TGC TGC GGG CGG G	
sRS_636_Ra_3	GGT TGC GCT CGT TGC TGC GGG CGG	
sRS_362_Ra	GGT TGC GCT CGT TGC ACT CAC ACC TAG	
sRS_30c_Ra_1	GGT TGC GCT CGT TGC GCT GAG AGT	
sRS_30c_Ra_2	GGT TGC GCT CGT TGC GCT GAG AGT G	
sRS_30c_Ra_3	GGT TGC GCT CGT TGC GCT GAG AGT GT	
sRS_30c_Ra_4	GGT TGC GCT CGT TGC GCT GAG AGT GTA	
sRS_15a_Ra_1	GGT TGC GCT CGT TGC CAC AAA CCA TTA	
sRS_15a_Ra_2	GGT TGC GCT CGT TGC CAC AAA CCA TT	
sRS_425_Ra	GGT TGC GCT CGT TGC TCA ACG GGA GT	
sFS_191_B1	GGA TTC CGT TGC GTG CCA TCA TCG TC	
sFS_191_B1'	GGA TTC CGT TGC GTG CCA TCA TCG TCC TG	

Anhang

sFS_145_B6	GGA AAA CTG GAC CTG GAG CTG TCT GAC
sFS_145_B6'	GGA AAA CTG GAC CTG GAG CTG TCT GAC GTG
sFS_181a_B2	GCG TTG AAT GTT CGG TCT ACG AGC TGG GTC
sFS_636_B4	ACG AGC AAG CAC AAT GCG TGC AGG ATC TGG G
sFS_636_A5_3	GAC GAG CAA GCA CAC GAG CGG AAG ACA CGT
sFS_362_A6	GTT CCA AGG ATT TTG CGG CAT CAG CCT A
sFS_30c_B8_1	GTA GGA TGT TTA CAC CTG TGG ACA CCG AGA AG
sFS_30c_B8_2	TAG GAT GTT TAC ACC TGT GGA CAC CGA GAA G
sFS_30c_B8_3	AGG ATG TTT ACA CCT GTG GAC ACC GAG AAG
sFS_30c_B8_4	GGA TGT TTA CAC CTG TGG ACA CCG AGA AG
sFS_15a_B5	TGT GCT GCT AGC TGG CTG CAC AAG TTG A
sFS_15a_A1_2	ATG TGC TGC TAC GAC CGC AGC TCT AGC
sFS_15a_A3_2	ATG TGC TGC TAC GCT ACG CAA AGC AGT
sFS_15a_A5_2	ATG TGC TGC TAC GAG CGG AAG ACA CGT
sFS_15a_A6_2	ATG TGC TGC TAT TGC GGC ATC AGC CTA
sFS_15a_A7_2	ATG TGC TGC TAC GCT TGA CGA CCT GAC
sFS_15a_A8_2	ATG TGC TGC TAG CTG AGT TTC GCC GAA
sFS_15a_B1_2	ATG TGC TGC TAC GTG CCA TCA TCG TCC TG
sFS_15a_B2_2	ATG TGC TGC TAC GGT CTA CGA GCT GGG TC
sFS_15a_B3_2	ATG TGC TGC TAC GTA CCA AGC TAT CGT CG
sFS_15a_B4_2	ATG TGC TGC TAA TGC GTG CAG GAT CTG GG
sFS_15a_B5_2	ATG TGC TGC TAG CTG GCT GCA CAA GTT GA
sFS_15a_B6_2	ATG TGC TGC TAC TGG AGC TGT CTG ACG TG
sFS_15a_B7_2	ATG TGC TGC TAG TTC AGC GCA GGT GAC TC
sFS_15a_B8_2	ATG TGC TGC TAC CTG TGG ACA CCG AGA AG
sFS_425_B1	GAT CGT GTC ATT CGT GCC ATC ATC GTC CTG
sFS_425_B2	GAT CGT GTC ATT CGG TCT ACG AGC TGG GTC
sFS_425_B3	GAT CGT GTC ATT CGT ACC AAG CTA TCG TCG
sFS_425_B4	GAT CGT GTC ATT ATG CGT GCA GGA TCT GGG
sFS_425_B5	GAT CGT GTC ATT GCT GGC TGC ACA AGT TGA
sFS_425_B6	GAT CGT GTC ATT CTG GAG CTG TCT GAC GTG
sFS_425_B7	GAT CGT GTC ATT GTT CAG CGC AGG TGA CTC
sFS_425_B8	GAT CGT GTC ATT CCT GTG GAC ACC GAG AAG

8.3 Makrodateien

8.3.1 4-Komponenten1-TS50

Note:	Wert1	Wert2	Wert3	Wait	Zeit	Leer	Beschriftung
90	7000	0	0	0	0	0	Assay Start
25	0	1	37	1	1	0	Assay Start
50	1	1	500	0	0	0	Assay Start
30	50	20	0	0	4	0	Assay Start

Note: Das Abfallreservoir wird mit Systemflüssigkeit gefüllt.

72	1	10000	0	0	0	0	Waste filling
50	1	2	500	0	0	0	Waste filling
30	850	1	0	0	4	0	Waste filling
50	1	3	500	0	0	0	Waste filling
30	-850	1	0	0	4	0	Waste filling
50	1	2	500	0	0	0	Waste filling
30	850	1	0	0	4	0	Waste filling
50	1	3	500	0	0	0	Waste filling
30	-450	1	0	0	3	0	Waste filling

Note:

50	1	2	500	0	0	0	Waste filling
72	3	45	0	0	0	0	Waste filling
30	300	4	0	0	5	0	Waste filling
72	3	10000	0	0	0	0	Waste filling

Note: Die Probe wird aufgezogen und auf dem Chip inkubiert.

72	4	40	0	0	0	0	Sample aspiration
30	-350	20	0	0	20	0	Sample aspiration
72	4	10000	0	0	0	0	Sample aspiration

Note:

72	3	65	0	0	0	0	Sample aspiration
30	-50	25	0	0	5	0	Sample aspiration
72	3	10000	0	0	0	0	Sample aspiration
82	100	100	0	0	0	0	Sample incubation (1/4)
40	0	0	0	15	15	0	Sample incubation (1/4)
69	1	20	0	0	0	0	Sample incubation (1/4)
30	-30	50	0	0	6	0	Sample incubation (2/4)
40	0	0	0	95	95	0	Sample incubation (2/4)
82	0	0	0	0	0	0	Sample incubation (2/4)
30	-30	50	0	0	6	0	Sample incubation (3/4)
40	0	0	0	95	95	0	Sample incubation (3/4)
30	-30	50	0	0	6	0	Sample incubation (4/4)
50	1	3	500	0	0	0	Sample incubation (4/4)
30	-500	1	0	0	3	0	Sample incubation (4/4)
40	0	0	0	95	95	0	Sample incubation (4/4)

Anhang

69	0	0	0	0	0	0	Sample incubation (4/4)
----	---	---	---	---	---	---	-------------------------

50	1	0	500	0	0	0	Sample incubation (4/4)
----	---	---	-----	---	---	---	-------------------------

Note: Waschen mit WP1.

50	0	3	500	0	0	0	S1 pumping
30	125	20	0	0	7	0	S1 pumping
25	0	1	50	1	1	0	S1 Temperature
30	100	1000	0	0	300	0	S1 washing
50	0	0	0	0	0	0	S1 washing
82	0	0	0	15	15	0	S1 washing
82	0	0	0	0	0	0	S1 washing
50	1	3	500	0	0	0	S1 washing
30	-200	1	0	0	2	0	S1 washing
50	1	0	500	0	0	0	S1 washing

Note: Reporter und Ligase werden auf der Chipoberfläche inkubiert.

25	0	1	35	10	10	0	RLM Temperature
50	0	2	500	0	0	0	RLM pumping
30	200	20	0	0	12	0	RLM pumping
50	0	0	500	0	0	0	RLM pumping
50	1	3	500	0	0	0	RLM incubation (1/2)
30	-200	1	0	0	3	0	RLM incubation (1/2)
50	1	0	500	0	0	0	RLM incubation (1/2)
82	100	100	0	15	15	0	RLM incubation (1/2)
101	0	0	0	0	0	0	RLM incubation (1/2)
82	0	0	0	0	0	0	RLM incubation (1/2)
69	1	20	0	0	0	0	RLM incubation (1/2)
40	0	0	0	285	285	0	RLM incubation (2/2)
69	0	0	0	0	0	0	RLM incubation (2/2)
50	0	2	500	0	0	0	RLM flush
30	300	10	0	0	7	0	RLM flush
50	0	0	500	0	0	0	RLM flush
25	0	1	55	5	5	0	S2-Temperature

Note:

50	1	2	0	0	0	0	RLM flush
30	-40	10	0	0	2	0	RLM flush

Note: Waschen mit Systemflüssigkeit (NSP).

50	1	1	500	0	0	0	Stringency wash 2
30	600	500	0	0	900	0	Stringency wash 2
25	0	1	35	10	10	0	Measure-Temperature
50	1	2	0	0	0	0	Buffer flush
30	-40	20	0	0	3	0	Buffer flush
50	1	3	500	0	0	0	Buffer flush
30	-820	1	0	0	3	0	Buffer flush

Anhang

50	1	0	500	0	0	0	Buffer flush
Note: Substratlösung wird auf den Chip gepumpt.							
79	1	0	0	0	0	0	Substrate pumping
82	150	150	0	0	0	0	Substrate pumping
50	0	1	500	0	0	0	Substrate pumping
30	250	10	0	0	8	0	Substrate pumping
50	0	0	500	0	0	0	Substrate pumping
50	1	2	0	0	0	0	Substrate pumping
30	-40	20	0	0	3	0	Substrate pumping
50	1	0	0	0	0	0	Substrate pumping

Note: Messvorgang: 1x FlowStop, 4x LockSpot.

50	0	1	500	0	0	0	Measurement 1
30	100	20	0	0	6	0	Measurement 1
38	0	0	0	8	8	0	Measurement 1
30	140	70	0	0	30	0	Measurement 2
50	2	2	500	0	0	0	Measurement 2
38	0	0	0	5	5	0	Measurement 2
50	2	1	500	0	0	0	Measurement 2
30	140	70	0	0	30	0	Measurement 3
50	2	2	500	0	0	0	Measurement 3
38	0	0	0	5	5	0	Measurement 3
50	2	1	500	0	0	0	Measurement 3
30	140	70	0	0	30	0	Measurement 4
50	2	2	500	0	0	0	Measurement 4
38	0	0	0	5	5	0	Measurement 4
50	2	1	500	0	0	0	Measurement 4
30	140	70	0	0	30	0	Measurement 5
50	2	2	500	0	0	0	Measurement 5
38	0	0	0	5	5	0	Measurement 5
50	2	1	500	0	0	0	Measurement 5
50	0	0	500	0	0	0	Measurement done

Note: Beenden des Durchlaufs.

50	1	2	500	0	0	0	Assay end
30	-400	3	0	0	4	0	Assay end
50	1	3	500	0	0	0	Assay end
30	-470	1	0	0	2	0	Assay end
50	1	0	500	0	0	0	Assay end

Note:

25	0	1	25	0	0	0	Assay end
50	2	0	500	0	0	0	Assay end
90	500	0	0	0	0	0	Assay end

end

8.3.2 4-Komponenten2-TS55

Note: Wert1 Wert2 Wert3 Wait Zeit Leer Beschriftung

90	7000	0	0	0	0	0	Assay Start
25	0	1	37	1	1	0	Assay Start
50	1	1	500	0	0	0	Assay Start
30	50	20	0	0	4	0	Assay Start

Note: Das Abfallreservoir wird mit Systemflüssigkeit gefüllt.

72	1	10000	0	0	0	0	Waste filling
50	1	2	500	0	0	0	Waste filling
30	850	1	0	0	4	0	Waste filling
50	1	3	500	0	0	0	Waste filling
30	-850	1	0	0	4	0	Waste filling
50	1	2	500	0	0	0	Waste filling
30	850	1	0	0	4	0	Waste filling
50	1	3	500	0	0	0	Waste filling
30	-450	1	0	0	3	0	Waste filling

50	1	2	500	0	0	0	Waste filling
72	3	45	0	0	0	0	Waste filling
30	300	4	0	0	5	0	Waste filling
72	3	10000	0	0	0	0	Waste filling

Note: Die Probe wird aufgezogen und auf dem Chip inkubiert.

72	4	40	0	0	0	0	Sample aspiration
30	-350	20	0	0	22	0	Sample aspiration
72	4	10000	0	0	0	0	Sample aspiration

72	3	65	0	0	0	0	Sample aspiration
30	-50	25	0	0	5	0	Sample aspiration
72	3	10000	0	0	0	0	Sample aspiration
82	100	100	0	0	0	0	Sample aspiration
30	-120	50	0	0	20	0	Sample aspiration

30	30	50	0	0	6	0	Sample incubation (1/4)
40	0	0	0	15	15	0	Sample incubation (1/4)
69	1	1	0	0	0	0	Sample incubation (2/4)
30	30	50	0	0	6	0	Sample incubation (2/4)
69	0	0	0	0	0	0	Sample incubation (2/4)
40	0	0	0	95	95	0	Sample incubation (2/4)
82	0	0	0	0	0	0	Sample incubation (2/4)
69	1	1	0	0	0	0	Sample incubation (3/4)
30	30	50	0	0	6	0	Sample incubation (3/4)
69	0	0	0	0	0	0	Sample incubation (3/4)
40	0	0	0	95	95	0	Sample incubation (3/4)
69	1	1	0	0	0	0	Sample incubation (4/4)

Anhang

30	30	50	0	0	6	0	Sample incubation (4/4)
69	0	0	0	0	0	0	Sample incubation (4/4)
40	0	0	0	95	95	0	Sample incubation (4/4)
69	0	0	0	0	0	0	Sample incubation (4/4)
50	1	0	500	0	0	0	Sample incubation (4/4)

Note: Waschen mit WP1.

50	0	3	500	0	0	0	S1 pumping
30	125	20	0	0	7	0	S1 pumping
25	0	1	55	1	1	0	S1 temperature
69	1	2	0	0	0	0	S1 wash
30	100	1000	0	0	300	0	S1 wash
69	0	0	0	0	0	0	S1 wash
50	0	0	0	0	0	0	S1 was

Note: Reporter und Ligase werden auf der Chipoberfläche inkubiert.

25	0	1	35	10	10	0	RLM temperature
50	0	2	500	0	0	0	RLM pumping
30	100	20	0	0	7	0	RLM pumping
69	1	1	0	0	0	0	RLM pumping
30	100	20	0	0	7	0	RLM pumping
50	0	0	500	0	0	0	RLM pumping
69	0	0	0	0	0	0	RLM pumping
50	1	3	500	0	0	0	RLM incubation (1/2)
30	-750	1	0	0	3	0	RLM incubation (1/2)
50	1	0	500	0	0	0	RLM incubation (1/2)
82	100	100	0	15	15	0	RLM incubation (1/2)
101	0	0	0	0	0	0	RLM incubation (1/2)
40	0	0	0	285	285	0	RLM incubation (2/2)
82	0	0	0	0	0	0	RLM incubation (2/2)
50	0	2	500	0	0	0	RLM flush
30	300	10	0	0	10	0	RLM flush

Note: Waschen mit Systemflüssigkeit (NSP).

25	0	1	55	5	5	0	S2 temperature
69	1	2	0	0	0	0	S2 wash
30	560	500	0	0	840	0	S2 wash
69	0	0	0	0	0	0	S2 wash
50	0	0	500	0	0	0	S2 wash
25	0	1	35	10	10	0	Measurement temperature
50	1	2	0	0	0	0	Buffer flush
30	-40	20	0	0	3	0	Buffer flush
50	1	3	500	0	0	0	Buffer flush
30	-820	1	0	0	3	0	Buffer flush
50	1	0	500	0	0	0	Buffer flush

Note: Substratlösung wird auf den Chip gepumpt.

Anhang

79	1	0	0	0	0	0	Substrate pumping
82	150	150	0	0	0	0	Substrate pumping
50	0	1	500	0	0	0	Substrate pumping
30	250	10	0	0	8	0	Substrate pumping
50	0	0	500	0	0	0	Substrate pumping
50	1	2	0	0	0	0	Substrate pumping
30	-40	20	0	0	3	0	Substrate pumping
50	1	0	0	0	0	0	Substrate pumping

Note: Messvorgang: 1x FlowStop, 4x LockSpot.

50	0	1	500	0	0	0	Measurement 1
30	100	20	0	0	6	0	Measurement 1
38	0	0	0	8	8	0	Measurement 1
30	140	15	0	0	6	0	Measurement 2
50	2	2	500	0	0	0	Measurement 2
38	0	0	0	5	5	0	Measurement 2
50	2	1	500	0	0	0	Measurement 2
30	140	15	0	0	6	0	Measurement 3
50	2	2	500	0	0	0	Measurement 3
38	0	0	0	5	5	0	Measurement 3
50	2	1	500	0	0	0	Measurement 3
30	140	15	0	0	6	0	Measurement 4
50	2	2	500	0	0	0	Measurement 4
38	0	0	0	5	5	0	Measurement 4
50	2	1	500	0	0	0	Measurement 4
30	140	15	0	0	6	0	Measurement 5
50	2	2	500	0	0	0	Measurement 5
38	0	0	0	5	5	0	Measurement 5
50	2	1	500	0	0	0	Measurement 5
50	0	0	500	0	0	0	Measurement done

Note: Beenden des Durchlaufs.

50	1	2	500	0	0	0	Assay end
30	-400	3	0	0	4	0	Assay end
50	1	3	500	0	0	0	Assay end
30	-470	1	0	0	2	0	Assay end
50	1	0	500	0	0	0	Assay end

Note:

25	0	1	25	0	0	0	Assay end
50	2	0	500	0	0	0	Assay end
90	500	0	0	0	0	0	Assay end

end

8.3.3 dsSandwichVar1-10µl

Note: Wert1 Wert2 Wert3 Wait Zeit Leer Beschriftung

90	7000	0	0	0	0	0	Assay Start
25	0	1	37	1	1	0	Assay Start
50	1	1	500	0	0	0	Assay Start
30	50	20	0	0	4	0	Assay Start

Note: Das Abfallreservoir wird mit Systemflüssigkeit gefüllt.

72	1	10000	0	0	0	0	Waste filling
50	1	2	500	0	0	0	Waste filling
30	850	1	0	0	4	0	Waste filling
50	1	3	500	0	0	0	Waste filling
30	-850	1	0	0	4	0	Waste filling
50	1	2	500	0	0	0	Waste filling
30	850	1	0	0	4	0	Waste filling
50	1	3	500	0	0	0	Waste filling
30	-450	1	0	0	3	0	Waste filling

50	1	2	500	0	0	0	Waste filling
72	3	45	0	0	0	0	Waste filling
30	300	4	0	0	5	0	Waste filling
72	3	10000	0	0	0	0	Waste filling

Note: Die Probe wird aufgezogen und auf dem Chip inkubiert.

72	4	40	0	0	0	0	Sample aspiration
30	-350	20	0	0	22	0	Sample aspiration
72	4	10000	0	0	0	0	Sample aspiration

Note:

30	-50	25	0	0	4	0	Sample aspiration
82	100	100	0	0	0	0	Sample aspiration

40	0	0	0	15	15	0	Hybridization (1/4)
69	1	1	0	0	0	0	Hybridization (2/4)
30	10	100	0	0	4	0	Hybridization (2/4)
69	0	0	0	0	0	0	Hybridization (2/4)
40	0	0	0	295	295	0	Hybridization (2/4)

69	1	1	0	0	0	0	Hybridization (3/4)
30	10	100	0	0	4	0	Hybridization (3/4)
69	0	0	0	0	0	0	Hybridization (3/4)
40	0	0	0	295	295	0	Hybridization (3/4)

69	1	1	0	0	0	0	Hybridization (4/4)
30	10	100	0	0	4	0	Hybridization (4/4)
69	0	0	0	0	0	0	Hybridization (4/4)
40	0	0	0	295	295	0	Hybridization (4/4)

Anhang

69	0	0	0	0	0	0	Hybridization (4/4)
50	1	0	500	0	0	0	Hybridization (4/4)
82	0	0	0	0	0	0	Hybridization (4/4)

Note: Die Ligationslösung wird auf der Chipoberfläche inkubiert.

25	0	1	37	1	1	0	Ligation temperature
50	0	2	500	0	0	0	Ligase pumping
30	100	20	0	0	7	0	Ligase pumping
69	1	1	0	0	0	0	Ligase pumping
30	100	20	0	0	7	0	Ligase pumping
50	0	0	500	0	0	0	Ligase pumping
69	0	0	0	0	0	0	Ligase pumping
50	1	3	500	0	0	0	Ligation (1/2)
30	-580	1	0	0	3	0	Ligation (1/2)
50	1	0	500	0	0	0	Ligation (1/2)
82	100	100	0	15	15	0	Ligase incubation (1/2)
101	0	0	0	0	0	0	Ligation (1/2)
40	0	0	0	285	285	0	Ligation (2/2)
82	0	0	0	0	0	0	Ligation (2/2)
50	0	2	500	0	0	0	Ligase flush
30	300	10	0	0	10	0	Ligase flush

Note: Waschen mit Systemflüssigkeit.

25	0	1	55	5	5	0	Wash temperature
30	560	200	0	0	336	0	Washing
50	0	0	500	0	0	0	Washing
25	0	1	35	10	10	0	Measurement temperature
50	1	2	0	0	0	0	Buffer flush
30	-40	20	0	0	3	0	Buffer flush
50	1	3	500	0	0	0	Buffer flush
30	-820	1	0	0	3	0	Buffer flush
50	1	0	500	0	0	0	Buffer flush

Note: Substratlösung wird auf den Chip gepumpt.

79	1	0	0	0	0	0	Substrate pumping
82	150	150	0	0	0	0	Substrate pumping
50	0	1	500	0	0	0	Substrate pumping
30	250	10	0	0	8	0	Substrate pumping
50	0	0	500	0	0	0	Substrate pumping
50	1	2	0	0	0	0	Substrate pumping
30	-40	20	0	0	3	0	Substrate pumping
50	1	0	0	0	0	0	Substrate pumping

Note: Messvorgang: 1x FlowStop, 4x LockSpot.

50	0	1	500	0	0	0	Measurement 1
30	100	20	0	0	6	0	Measurement 1

Anhang

38	0	0	0	8	8	0	Measurement 1
30	140	15	0	0	6	0	Measurement 2
50	2	2	500	0	0	0	Measurement 2
38	0	0	0	5	5	0	Measurement 2
50	2	1	500	0	0	0	Measurement 2
30	140	15	0	0	6	0	Measurement 3
50	2	2	500	0	0	0	Measurement 3
38	0	0	0	5	5	0	Measurement 3
50	2	1	500	0	0	0	Measurement 3
30	140	15	0	0	6	0	Measurement 4
50	2	2	500	0	0	0	Measurement 4
38	0	0	0	5	5	0	Measurement 4
50	2	1	500	0	0	0	Measurement 4
30	140	15	0	0	6	0	Measurement 5
50	2	2	500	0	0	0	Measurement 5
38	0	0	0	5	5	0	Measurement 5
50	2	1	500	0	0	0	Measurement 5
50	0	0	500	0	0	0	Measurement done

Note: Beenden des Durchlaufs.

50	1	2	500	0	0	0	Assay end
30	-400	3	0	0	4	0	Assay end
50	1	3	500	0	0	0	Assay end
30	-470	1	0	0	2	0	Assay end
50	1	0	500	0	0	0	Assay end

Note:

25	0	1	25	0	0	0	Assay end
50	2	0	500	0	0	0	Assay end
90	500	0	0	0	0	0	Assay end

end

8.3.4 dsSandwichVar1-60µl

Note: Wert1 Wert2 Wert3 Wait Zeit Leer Beschriftung

90	7000	0	0	0	0	0	Assay Start
25	0	1	37	1	1	0	Assay Start
50	1	1	500	0	0	0	Assay Start
30	50	20	0	0	4	0	Assay Start

Note: Das Abfallreservoir wird mit Systemflüssigkeit gefüllt.

72	1	10000	0	0	0	0	Waste filling
50	1	2	500	0	0	0	Waste filling
30	850	1	0	0	4	0	Waste filling
50	1	3	500	0	0	0	Waste filling
30	-850	1	0	0	4	0	Waste filling
50	1	2	500	0	0	0	Waste filling
30	850	1	0	0	4	0	Waste filling
50	1	3	500	0	0	0	Waste filling
30	-450	1	0	0	3	0	Waste filling

50	1	2	500	0	0	0	Waste filling
72	3	45	0	0	0	0	Waste filling
30	300	4	0	0	5	0	Waste filling
72	3	10000	0	0	0	0	Waste filling

Note: Die Probe wird aufgezogen und auf dem Chip inkubiert.

72	4	40	0	0	0	0	Sample aspiration
30	-350	20	0	0	22	0	Sample aspiration
72	4	10000	0	0	0	0	Sample aspiration
72	3	65	0	0	0	0	Sample aspiration
30	-50	25	0	0	5	0	Sample aspiration
72	3	10000	0	0	0	0	Sample aspiration
82	100	100	0	0	0	0	Sample aspiration
30	-120	50	0	0	20	0	Sample aspiration

30	30	50	0	0	6	0	Hybridization (1/4)
40	0	0	0	15	15	0	Hybridization (1/4)
69	1	1	0	0	0	0	Hybridization (2/4)
30	30	50	0	0	6	0	Hybridization (2/4)
69	0	0	0	0	0	0	Hybridization (2/4)
40	0	0	0	295	295	0	Hybridization (2/4)
82	0	0	0	0	0	0	Hybridization (2/4)
69	1	1	0	0	0	0	Hybridization (3/4)
30	30	50	0	0	6	0	Hybridization (3/4)
69	0	0	0	0	0	0	Hybridization (3/4)
40	0	0	0	295	295	0	Hybridization (3/4)
69	1	1	0	0	0	0	Hybridization (4/4)

Anhang

30	30	50	0	0	6	0	Hybridization (4/4)
69	0	0	0	0	0	0	Hybridization (4/4)
40	0	0	0	295	295	0	Hybridization (4/4)
69	0	0	0	0	0	0	Hybridization (4/4)
50	1	0	500	0	0	0	Hybridization (4/4)

Note: Die Ligationslösung wird auf der Chipoberfläche inkubiert.

25	0	1	37	1	1	0	Ligation temperature
50	0	2	500	0	0	0	Ligase pumping
30	100	20	0	0	7	0	Ligase pumping
69	1	1	0	0	0	0	Ligase pumping
30	100	20	0	0	7	0	Ligase pumping
50	0	0	500	0	0	0	Ligase pumping
69	0	0	0	0	0	0	Ligase pumping
50	1	3	500	0	0	0	Ligation (1/2)
30	-550	1	0	0	3	0	Ligation (1/2)
50	1	0	500	0	0	0	Ligation (1/2)
82	100	100	0	15	15	0	Ligation (1/2)
101	0	0	0	0	0	0	Ligation (1/2)
40	0	0	0	285	285	0	Ligation (2/2)
82	0	0	0	0	0	0	Ligation (2/2)
50	0	2	500	0	0	0	Ligase flush
30	300	10	0	0	10	0	Ligase flush

Note: Waschen mit Systemflüssigkeit.

25	0	1	55	5	5	0	Wash temperature
30	560	200	0	0	336	0	Washing
50	0	0	500	0	0	0	Washing
25	0	1	35	10	10	0	Measurement temperature
50	1	2	0	0	0	0	Buffer flush
30	-40	20	0	0	3	0	Buffer flush
50	1	3	500	0	0	0	Buffer flush
30	-820	1	0	0	3	0	Buffer flush
50	1	0	500	0	0	0	Buffer flush

Note: Substratlösung wird auf den Chip gepumpt.

79	1	0	0	0	0	0	Substrate pumping
82	150	150	0	0	0	0	Substrate pumping
50	0	1	500	0	0	0	Substrate pumping
30	250	10	0	0	8	0	Substrate pumping
50	0	0	500	0	0	0	Substrate pumping
50	1	2	0	0	0	0	Substrate pumping
30	-40	20	0	0	3	0	Substrate pumping
50	1	0	0	0	0	0	Substrate pumping

Anhang

Note: Messvorgang: 1x FlowStop, 4x LockSpot.

50	0	1	500	0	0	0	Measurement 1
30	100	20	0	0	6	0	Measurement 1
38	0	0	0	8	8	0	Measurement 1
30	140	15	0	0	6	0	Measurement 2
50	2	2	500	0	0	0	Measurement 2
38	0	0	0	5	5	0	Measurement 2
50	2	1	500	0	0	0	Measurement 2
30	140	15	0	0	6	0	Measurement 3
50	2	2	500	0	0	0	Measurement 3
38	0	0	0	5	5	0	Measurement 3
50	2	1	500	0	0	0	Measurement 3
30	140	15	0	0	6	0	Measurement 4
50	2	2	500	0	0	0	Measurement 4
38	0	0	0	5	5	0	Measurement 4
50	2	1	500	0	0	0	Measurement 4
30	140	15	0	0	6	0	Measurement 5
50	2	2	500	0	0	0	Measurement 5
38	0	0	0	5	5	0	Measurement 5
50	2	1	500	0	0	0	Measurement 5
50	0	0	500	0	0	0	Measurement done

Note: Beenden des Durchlaufs.

50	1	2	500	0	0	0	Assay end
30	-400	3	0	0	4	0	Assay end
50	1	3	500	0	0	0	Assay end
30	-470	1	0	0	2	0	Assay end
50	1	0	500	0	0	0	Assay end

Note:

25	0	1	25	0	0	0	Assay end
50	2	0	500	0	0	0	Assay end
90	500	0	0	0	0	0	Assay end

end

8.3.5 dsSandwichVar2

Note: Wert1 Wert2 Wert3 Wait Zeit Leer Beschriftung

90	7000	0	0	0	0	0	Assay Start
25	0	1	37	1	1	0	Assay Start
50	1	1	500	0	0	0	Assay Start
30	50	20	0	0	4	0	Assay Start
82	100	100	0	1	1	0	Assay Start
101	0	0	0	0	0	0	Assay Start

Note: Das Abfallreservoir wird mit Systemflüssigkeit gefüllt.

72	1	10000	0	0	0	0	Waste filling
50	1	2	500	0	0	0	Waste filling
30	850	1	0	0	4	0	Waste filling
50	1	3	500	0	0	0	Waste filling
30	-850	1	0	0	4	0	Waste filling
50	1	2	500	0	0	0	Waste filling
30	850	1	0	0	4	0	Waste filling
50	1	3	500	0	0	0	Waste filling
30	-450	1	0	0	3	0	Waste filling

50	1	2	500	0	0	0	Waste filling
72	3	20	0	0	0	0	Waste filling
30	300	4	0	0	4	0	Waste filling
72	3	10000	0	0	0	0	Waste filling

Note: Die Probe wird aufgezogen und auf dem Chip inkubiert.

72	4	40	0	0	0	0	Sample aspiration
30	-350	20	0	0	20	0	Sample aspiration
72	4	10000	0	0	0	0	Sample aspiration
30	-80	50	0	0	12	0	Sample aspiration

40	0	0	0	15	15	0	Sample incubation (1/4)
30	-20	50	0	0	6	0	Sample incubation (2/4)
40	0	0	0	295	295	0	Sample incubation (2/4)

30	-35	50	0	0	6	0	Sample incubation (3/4)
40	0	0	0	295	295	0	Sample incubation (3/4)

30	-35	50	0	0	6	0	Sample incubation (4/4)
50	1	3	500	0	0	0	Sample incubation (4/4)
30	-500	1	0	0	3	0	Sample incubation (4/4)
40	0	0	0	295	295	0	Sample incubation (4/4)

Note: Die Chipkammer wird mit Systemflüssigkeit gespült.

50	1	1	500	0	0	0	Buffer flush
30	200	10	0	0	6	0	Buffer flush
50	1	2	0	0	0	0	Buffer flush

Anhang

30	-20	10	0	0	1	0	Buffer flush
50	1	0	0	0	0	0	Buffer flush

Note: Die Ligationslösung wird auf der Chipoberfläche inkubiert.

50	0	3	500	0	0	0	Ligase pumping
30	245	10	0	0	8	0	Ligase pumping
50	0	0	0	0	0	0	Ligase pumping
50	1	2	0	0	0	0	Ligase pumping
30	-20	10	0	0	1	0	Ligase pumping

50	1	3	500	0	0	0	Ligation
30	-405	1	0	0	2	0	Ligation
50	1	0	500	0	0	0	Ligation
40	0	0	0	285	285	0	Ligation

50	0	3	500	0	0	0	Ligase flush
30	300	10	0	0	9	0	Ligase flush

Note: Waschen mit Low Salt Buffer (LSB, entspricht Niedrigsalzpuffer).

50	0	2	500	0	0	0	LSB pumping
30	220	10	0	0	7	0	LSB pumping
50	0	0	500	0	0	0	LSB pumping
50	1	2	0	0	0	0	LSB pumping
30	-20	10	0	0	1	0	LSB pumping
50	1	0	0	0	0	0	LSB pumping
40	0	0	0	285	285	0	LSB incubation
50	0	2	500	0	0	0	LSB flush
30	300	10	0	0	9	0	LSB flush
50	0	0	500	0	0	0	LSB flush
25	0	1	37	0	0	0	LSB flush

Note: Spülen der Chipkammer mit Systemflüssigkeit.

50	1	2	0	0	0	0	LSB flush
30	-40	10	0	0	2	0	LSB flush

Note:

50	1	1	500	0	0	0	Buffer flush
30	140	10	0	0	5	0	Buffer flush
50	1	2	0	0	0	0	Buffer flush
30	-40	20	0	0	3	0	Buffer flush
50	1	3	500	0	0	0	Buffer flush
30	-860	1	0	0	3	0	Buffer flush
50	1	0	500	0	0	0	Buffer flush

Note: Substratlösung wird auf den Chip gepumpt.

79	1	0	0	0	0	0	Substrate pumping
82	150	150	0	0	0	0	Substrate pumping

Anhang

50	0	1	500	0	0	0	Substrate pumping
30	250	10	0	0	8	0	Substrate pumping
50	0	0	500	0	0	0	Substrate pumping
50	1	2	0	0	0	0	Substrate pumping
30	-40	20	0	0	3	0	Substrate pumping
50	1	0	0	0	0	0	Substrate pumping

Note: Messvorgang: 1x FlowStop, 4x LockSpot.

50	0	1	500	0	0	0	Measurement 1
30	100	20	0	0	6	0	Measurement 1
38	0	0	0	8	8	0	Measurement 1
30	140	15	0	0	6	0	Measurement 2
50	2	2	500	0	0	0	Measurement 2
38	0	0	0	5	5	0	Measurement 2
50	2	1	500	0	0	0	Measurement 2
30	140	15	0	0	6	0	Measurement 3
50	2	2	500	0	0	0	Measurement 3
38	0	0	0	5	5	0	Measurement 3
50	2	1	500	0	0	0	Measurement 3
30	140	15	0	0	6	0	Measurement 4
50	2	2	500	0	0	0	Measurement 4
38	0	0	0	5	5	0	Measurement 4
50	2	1	500	0	0	0	Measurement 4
30	140	15	0	0	6	0	Measurement 5
50	2	2	500	0	0	0	Measurement 5
38	0	0	0	5	5	0	Measurement 5
50	2	1	500	0	0	0	Measurement 5
50	0	0	500	0	0	0	Measurement end

Note: Beenden des Durchlaufs.

50	1	2	500	0	0	0	Assay end
30	-400	3	0	0	4	0	Assay end
50	1	3	500	0	0	0	Assay end
30	-470	1	0	0	2	0	Assay end
50	1	0	500	0	0	0	Assay end

Note:

25	0	1	25	0	0	0	Assay end
50	2	0	500	0	0	0	Assay end
90	500	0	0	0	0	0	Assay end

end

8.4 Eigene Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden auch in folgenden Veröffentlichungen publiziert:

a) Offenlegungsschriften von Patentanmeldungen

Gumbrecht, W., **Hofmann, S.** and Huang, Y., Siemens Aktiengesellschaft, Munich (DE)
(2015) *Verfahren zur Detektion und Quantifizierung von einer einzelsträngigen Ziel-Nukleinsäure*, DE 102013221402 A1.

Hofmann, S., Gumbrecht, W. and Huang, Y., Siemens Aktiengesellschaft, Munich (DE)
(2015) *Vorrichtung und Verfahren zur Detektion und Quantifizierung von einzelsträngigen Ziel-Nukleinsäuren*, DE 102014210092 A1.

b) Wissenschaftliche Publikation

Hofmann, S., Huang, Y., Paulicka, P., Kappel, A., Katus, H. A., Keller, A., Meder, B.,
Stahler, C. F. and Gumbrecht, W. (2015) 'Double-Stranded Ligation Assay for the
Rapid Multiplex Quantification of MicroRNAs', *Anal Chem*, 87(24), 12104-11.

Weitere Veröffentlichung (Offenlegungsschrift):

Battersby, T., Gumbrecht, W., **Hofmann, S.** and Huang, Y., Siemens Aktiengesellschaft,
Munich (DE) (2015) *Method and kit for identifying and quantifying at least one single-stranded target nucleic acid*, EP 2865763 A1.

8.5 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Dandekar bedanken, der ohne Zögern die Begleitung dieser externen Promotion übernommen hat. Vielen Dank für die stets motivierenden und anregenden Worte und die immer freundliche und unkomplizierte Unterstützung (auch in allen organisatorischen Belangen).

Ein besonders großes Dankeschön geht an meinen Betreuer bei Siemens, Dr. Walter Gumbrecht, der mir die Durchführung dieser Arbeit überhaupt erst ermöglicht hat, genauso wie an Dr. Yiwei Huang. Vielen Dank für eure fachlichen Ratschläge, eure durchgehende Unterstützung und die tolle Zusammenarbeit!

Ich danke Prof. Dr. Harald Schulze, der sich zur Erstellung des Zweitgutachtens für diese Arbeit bereit erklärt hat.

Ein ganz großer Dank geht an Dr. Manfred Stanzel, der u.a. die Arbeit mit sehr großem Einsatz und fachlicher Kompetenz detailliert Korrektur gelesen hat.

Vielen Dank an meine gesamte Arbeitsgruppe bei Siemens! Besonderer Dank für die technische Unterstützung geht an Dr. Joachim Bangert, Tobias Endner und Peter Paulicka. Für die Hilfe und Mitarbeit sowie die kurzweilige Zeit im Labor bedanke ich mich insbesondere bei Daniela Kühn und Katja Friedrich. Ich danke Dr. Andreas Kappel und Prof. Dr. Andreas Keller für die Unterstützung bei der Publikation des Papers.

Ich danke allen Verantwortlichen bei Siemens, besonders Dr. Thomas Scheiter, Dr. Oliver Lade und Dr. Mark Matzas.

Ein Dankeschön geht an Prof. Dr. Mathias Sprinzl vom Lehrstuhl für Biochemie der Universität Bayreuth für die Bereitstellung der Esterase-Mutante und des Labors für die Konjugatsynthese.

Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. Meder und Dr. Haas vom Zentrums für innere Medizin III am Universitätsklinikum Heidelberg für den fachlichen Austausch sowie die Bereitstellung der RNA-Extrakte.

Zu guter Letzt geht der größte Dank an meine Eltern Gottfried und Monika, die mich nicht nur bei meiner Ausbildung immer tatkräftig und hilfsbereit unterstützt haben.

Genauso danke ich meiner Lebensgefährtin Rieke, die immer an mich glaubt. Ich danke meinen Freunden für den Ausgleich zur Arbeit, besonders Max Lehnfeld zusätzlich für das Korrekturlesen des ersten Entwurfs.

8.6 Erklärung an Eides statt

Erklärungen nach §4 Abs. 3 Satz 3, 5, 8 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie

Affidavit

I hereby declare that my thesis entitled: „Hybridisierungsbasierte Multiplex-Detektion von microRNA mit CMOS-Technologie für die Anwendung in der Point-of-Care-Diagnostik“ is the result of my own work.

I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore I verify that the thesis has not been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „Hybridisierungsbasierte Multiplex-Detektion von microRNA mit CMOS-Technologie für die Anwendung in der Point-of-Care-Diagnostik“, eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

_____, den _____

Unterschrift