

Rolling Circle Amplification auf Biochips

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von

Daniela Maria Köster

Geboren am 29. Mai 1981 in Witten

2011

Dissertation wurde vom März 2007 bis September 2010 unter der Leitung von Herrn Dr. Harald Seitz am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Abteilung: *Vertebrate Genomics*, Arbeitsgruppe: *Functional Protein Analysis* in Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Hans Lehrach

Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Vertebrate Genomics,
Innestraße 63-73, D-14195 Berlin

2. Gutachter: Frau Prof. Dr. Constance Scharff

Freie Universität Berlin, Verhaltensbiologie,
Takustr. 6, D-14195 Berlin

Disputation am 19. November 2010

„Nur wenige wissen, wie viel man wissen muß, um zu wissen, wie wenig man weiß.“

Werner Heisenberg

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei meinen Studien und bei der Bearbeitung meiner Doktorarbeit unterstützt haben. Mein Dank geht an Herrn Dr. Harald Seitz für dieses interessante Thema und die anregenden Diskussionen, die zu vielen neuen Ideen für diese Arbeit geführt haben.

Herrn Prof. Dr. Hans Lehrach möchte ich für die Übernahme meines Gutachtens und für die Möglichkeit an seinem Institut meiner Doktorarbeit anfertigen zu können danken. Für ihre Hilfsbereitschaft, die schöne Zeit und das gute Arbeitsklima möchte ich allen Kollegen am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik danken und besonders allen alten und neuen Mitgliedern der Arbeitsgruppe *Functional Protein Analysis*. Herrn David Haselbach danke ich für seine Hilfe bei den DNAzymen. Dr. Andreas Dahl und Thomas Bergmann möchte ich für die Bereitstellung der Nano-Well-Chips und dem μ PCR-Chip Auslesegerät danken.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Dr. Franz W. Köster und Frau Edda M. C. Köster für ihre Geduld und ihre großzügige Unterstützung während der gesamten Doktorarbeit, sowie meinen Brüdern Philipp und Patrick. Mein herzlicher Dank gilt auch Herrn Kai S. Pöppen für seine alles umfassende Hilfe.

Versicherung

Ich versichere hiermit, dass ich, DanielaM. Köster die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten und nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form von mir noch nicht als Prüfungsarbeit eingereicht worden.

Berlin, den 10. September 2010

Abkürzungen

b	Basen
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
cDNS	<i>complementary</i> Desoxyribonukleinsäure
M	Marker (DNA-Größenstandard)
MPI	Max-Planck-Institut
N.	Nukleotide
NK	Negativkontrolle
PK	Positivkontrolle
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RCA	<i>Rolling Circle Amplification</i>
RCP	<i>Rolling Circle Product</i>
RNA	Ribonukleinsäure
mRNS	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
RTqPCR	<i>Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
z. B.	zum Beispiel
λ_{abs}	Absorption des Lichtes einer bestimmten Wellenlänge
λ_{em}	Emission des Lichtes einer bestimmten Wellenlänge

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	4
1. Einleitung	5
1.1 Stand der Forschung	5
1.2 <i>Rolling Circle Amplification</i>	6
1.3 Klassischer Nachweis des <i>Rolling Circle Products</i>	8
1.4 DNAzyme	9
1.5 Nachweis des RCPs über katalytische Zentren	10
1.6 Zielsetzung	12
2. Material und Methoden	13
2.1 Material	13
2.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel	13
2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Geräte	14
2.1.3 Software	16
2.1.4 Oligonukleotide	16
2.1.5 DNS-Größenstandard	19
2.1.6 Zusammensetzung der Puffer und Lösungen	19
2.2 Methoden	23
2.2.1 Standard Hybridisierung	23
2.2.2 Zirkularisieren	24
2.2.3 Gele	25
2.2.4 SYBR Farbstoffe	26
2.2.5 <i>Rolling Circle Amplification</i>	26
2.2.6 <i>Dot Blot</i>	27
2.2.7 <i>Beads</i>	27
2.2.8 DNAzyme	29

2.2.9 Miniaturisierung	30
2.2.9.1 Aldehydarrays	30
2.2.9.2 Nano-Well-Chips	33
2.2.1.0 Berechnungen	35
2.3 Firmen	36
3. Ergebnisse	38
3.1 Zirkularisieren	38
3.2 <i>Rolling Circle Amplification</i> in Lösung	40
3.3 <i>Dot Blot</i>	42
3.4 Magnetische <i>Beads</i>	49
3.5 Aldehydarrays	51
3.5.1 Kontrolle für die Bindung an die Oberfläche	54
3.5.2 Länge der Linker	58
3.5.3 Sonden des <i>Rolling Circle Products</i>	64
3.6 DNAzyme	68
3.6.1 Charakterisierung der DNAzyme	69
3.6.2 Multiple verbundene DNAzyme	73
3.6.3 Zweite Generation an DNAzymen	75
3.6.4 Nano-Well-Chips	76
3.6.5 Startmoleküle mit komplementärer DNAzymsequenz	77
3.6.6 DNAzyme innerhalb des RCPs	78
3.6.7 Einfluss der Proteine	80
3.7 Hotpot-Ansatz	82
3.7.1 Einfluss von Hemin und DMSO auf die RCA	83
3.7.2 Hotpot-Ansatz in einer 96er Mikrotiterplatte	84
3.7.3 Miniaturisierung des Hotpot-Ansatzes	87
3.7.4 Sensitivität des Hotpot-Ansatzes	95
4. Diskussion	97
4.1 Startmolekül	97

4.2 RCA-Ansatz in Lösung	98
4.3 Konzentration der Phi29-Polymerase	101
4.4 Aldehydarrays	102
4.4.1 Linkerlänge der Oligonukleotide und der Markierungen	102
4.4.2 Spotmorphologie	104
4.4.3 Beladungskapazität	106
4.5 DNAzyme	108
4.5.1 Multiple DNAzyme	108
4.5.2 Substrate der DNAzyme	109
4.6 Hotpot-Assay	109
4.7 Anwendungen	112
5. Zusammenfassung	114
6. Zusammenfassung (englisch)	115
7. Literaturverzeichnis	116

1. Einleitung

1.1 Stand der Forschung

Bereits seit den 60er Jahren arbeiten Wissenschaftler im Bereich der Biowissenschaften an Miniaturisierungen¹, welche die Analyse von Proben zu diagnostischen Zwecken möglich machte.

Die Hypothese wurde aufgestellt, dass die Miniaturisierung der Ansätze und der Plattformen zur parallelen Analyse von multiplen Proben zu einer Verbesserung der Sensitivität und einem hohen Probendurchsatz führen sollte²⁻⁴.

Der Nachweis von Molekülen, die in geringen Konzentrationen vorliegen, spielt eine wichtige Rolle im Bereich der Forschung, der genetischen Analyse und der molekularen Diagnostik^{5, 6}. Dabei steht wie im Fall von Biopsien oder Kulturen mit embryonalen Stammzellen oft nur eine geringe Menge an Material zur Verfügung. Zum Beispiel liegt die mRNA des Zytokins Interleukin-4 in einer Kopiezahl von 0,006 pro mononukleärer Zelle des peripheren Blutes vor⁷. Interleukin-4 ist auf Grund seiner Wirkung als anti-inflammatorischer Botenstoff des Immunsystems beim Menschen von Bedeutung. Um diese niedrig konzentrierten mRNA in einer geringen Anzahl von Zellen untersuchen zu können, sind sehr sensitive Methoden und Vervielfältigungen der Moleküle nötig, wie bei der Verwendung von Real-Time-quantitative-PCR (RTqPCR)^{8, 9}. Bei dieser Methode werden mittels PCR in Echtzeit die Fluoreszenzsignale des entstehenden PCR-Produktes gemessen und über diese Signale die eingesetzte mRNA quantifiziert. Jedoch wird die mRNA vor der Messung in der RTqPCR durch die reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Damit wird das Probenmaterial verändert und durch einen Synthesefehler der reversen Transkriptase kann die Sequenz eine andere Nukleotidabfolge aufweisen als das Original.

Die Miniaturisierungshypothese konnte am Ende des 20. Jahrhunderts mit der Entwicklung der *Microarrays* bestätigt werden^{10, 11}. *Microarrays* sind eine Entwicklung, auf denen viele der heutigen Nachweismethoden für die verschiedensten biologisch relevanten Analyten wie DNA, RNA oder Proteinen beruhen. Dazu gehören zum Beispiel die ChIP-chip¹² Methode zur Analyse der Protein-DNA-Interaktion und die Genexpressionsanalyse auf *Microarrays*^{13, 14}. Jedoch ist die Sensitivität der Methoden noch unzureichend, da für die meisten Anwendungen eine Vervielfältigung oder Anreicherung des Analyten vor der Messung notwendig ist. Die Analyse von mRNA basiert darauf, dass die Proben in cDNA umgeschrieben werden und dann mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden, um ihre Bindung an komplementären

Sequenzen auf einem *Microarray* messen zu können. Methoden wie die RTqPCR und die *Microarrays* haben den Nachteil, dass sie die Probe verändern und markieren. Die Sensitivität der Ansätze lässt sich auf ein Molekül pro Probe zurückrechnen, jedoch unterläuft dieses die genannten Veränderungen bis es zur Messung eines Signals kommt. Die Markierungen können die chemischen, physikalischen oder biologischen Eigenschaften der Analyten verändern¹⁵ und sind obendrein mit hohen Kosten verbunden.

Während der letzten Jahre gab es zahlreiche Bemühungen, die Sensitivität der Nachweissysteme zu erhöhen¹⁶, ohne den Grad an Komplexität der Methode maßgeblich zu erhöhen. Neue Ansätze zum Nachweis von verschiedensten Analyten haben den Anspruch, Veränderungen wie Markierung und Vervielfältigung der Proben zu vermeiden und dadurch die Qualität der Analyse maßgeblich zu steigern¹⁷.

1.2 Rolling Circle Amplification

Die *Rolling Circle Amplification* (RCA) ist ein natürlich vorkommendes Replikationssystem und wird auch als Sigma-Replikation von Bakteriophagen bezeichnet. Beispiele sind der *Phi29* Phage von *Bacillus subtilis* oder der λ Phage von *Escherichia coli*^{18, 19}.

Alle DNS-Polymerasen benötigen einen Primer zum Starten der Replikation. Die *Phi29*-Polymerase verwendet unter natürlichen Bedingungen ein Protein als Primer für die Replikation des Phagengenoms²⁰. Das erste Nukleotid der RCA wird dabei an die Hydroxygruppe eines Serins des an das zirkuläre Genom gebundenen Proteins gebunden und die Synthese verläuft vom 5'-Ende zum 3'-Ende weiter. Die *Phi29*-Polymerase hat die Eigenschaft von einem Protein aus oder von einem DNS-Primer aus die RCA zu starten, wenn eine freie Hydroxygruppe vorliegt²¹. Daher wurde das Prinzip der RCA als molekularbiologische Methode übernommen. Die *Phi29*-Polymerase synthetisiert pro Primer innerhalb von 30 Minuten eine bis zu 30.000 Nukleotide²² lange einzelsträngige DNS. Die RCA-Reaktion erfolgt linear und isotherm. Die Voraussetzung für die Reaktion ist ein zirkuläres Oligonukleotid, welches als Startmolekül bezeichnet wird. Die Größe des Startmoleküls ist variabel und kann im Bereich von 26 Basen²³ bis zu mehreren Kilobasen, wie im Fall des Phagen-Genoms¹⁸ liegen. Dieser natürliche Mechanismus wird in der Forschung zur Entwicklung neuer Nachweissysteme verwendet^{24, 25}. Das generelle Prinzip der RCA, ist in Abbildung 1.2.1 dargestellt. Auf Grund der Watson-Crick-Basenpaarung der Nukleinsäuresequenz des Primers mit dem Startmolekül entsteht eine doppelsträngige DNS-Region, welche als Startpunkt für die *Phi29*-Polymerase (Abb. 1.2.1 a) dient. Die

DNS wird auf Grund der Strangverdrängungsaktivität der Phi29-Polymerase kontinuierlich synthetisiert²⁶. Das *Rolling Circle Product* (RCP) besteht aus vielen komplementären Kopien des Startmoleküls (Abb. 1.2.1 b-d).

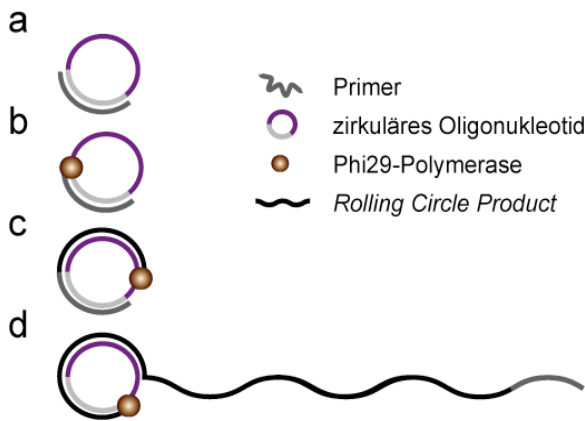


Abbildung 1.2.1 | *Rolling Circle Amplification*. (a) Ein Primer wird an das zirkuläre Startmolekül hybridisiert. (b) Dieser doppelsträngige DNS-Bereich dient als Startpunkt für die Phi29-Polymerase. (c) Nach der ersten Syntheserunde um das Startmolekül wird die Primersequenz von der Phi29-Polymerase verdrängt und die Synthese des *Rolling Circle Product* wird fortgesetzt. (d) Es entsteht ein Produkt aus mehreren verbundenen komplementären Kopien des Startmoleküls.

Der Vorteil der RCA ist die isotherme, lineare Vervielfältigung einer zirkulären DNS-Vorlage. Die Geräte und Schritte, welche für das Heizen und Kühlen der Probe bei gewöhnlichen Amplifikationen (z. B. PCR) notwendig sind, werden bei diesem Ansatz nicht gebraucht. Dies erleichtert die Übertragung auf verschiedene Versuchsplattformen^{24, 27, 28}.

Weitere Vorteile der RCA sind ihre einfache Anwendung, ihre Robustheit und eine hohe Signalverstärkung, welche über Bindungspartner wie Antikörper, Aptamere und Nukleinsäuresonden direkt an einen Analyten gekoppelt vorliegen kann. Die Nutzung von Nukleinsäuren als biologischer Sensor findet immer größere Anwendung, zum Beispiel für den Nachweis von DNS²⁹ und Proteinen³⁰.

Die RCA wurde 1998^{22, 31} erstmals als Werkzeug für den Nachweis von DNS-Sequenzen verwendet. Basierend auf diesen Arbeiten haben sich eine Reihe von Vorgehensweisen entwickelt, um über die Vervielfältigung durch die RCA einen sensitiven Nachweis zu etablieren¹⁷.

Eines der bekanntesten Beispiele für die Verwendung von RCA zum Nachweis von Proteinen sind die *padlock*-Sonden. Diese Sonden ermöglichen einen sensitiven *in situ* Nachweis von Proteinen im Bereich von zeptomol. Zwei Oligonukleotide sind an zwei verschiedene Antikörper konjugiert, welche der Bindung an die Epitope zweier benachbarter Analyten dienen. Durch die Bindung der Antikörper an die benachbarten Analyten befinden sich die Oligonukleotide in räumlicher Nähe zueinander. Dies führt zu einer Ligation und eine *padlock*-Sonde entsteht, die als Startmolekül für die RCA

dient. Der Nachweis der benachbarten Analyten erfolgt indirekt über die Hybridisierung von Sonden an das RCP³². Die Sonden sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert.

1.3 Klassischer Nachweis des *Rolling Circle Products*

Das Produkt der RCA zeichnet sich durch eine lange, repetitive, einzelsträngige DNS-Sequenz aus, wobei nach 30 Minuten Inkubation von einem 30 Kilobasen²² großen Strang pro Startmolekül ausgegangen wird. Mit der Visualisierung des Produktes der RCA beschäftigen sich viele Ansätze. In der Abbildung 1.3.1 ist ein *Rolling Circle Product* mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM)³³ dargestellt worden.

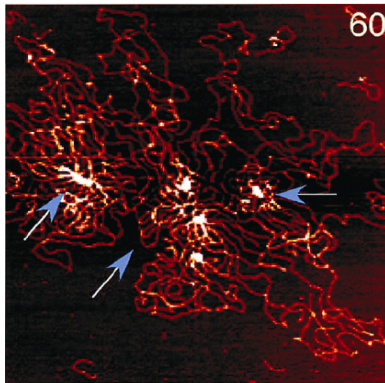


Abbildung 1.3.1 | Rasterkraftmikroskopie des RCP. Aufnahme der RCA-Lösung nach 60 Minuten Inkubation. Die RCA-Lösung wurde auf eine Oberfläche gegeben und mittels AFM analysiert. Die Pfeile markieren doppelsträngige Bereiche der DNS. Die Produkte der Reaktion, die einzelsträngigen RCPs, kann man deutlich als rote Fäden auf der Oberfläche erkennen. (von Mizuta R. et al. 2003 modifizierte Abbildung³³)

Neben den mikroskopischen Methoden kann das RCP direkt und indirekt nachgewiesen werden. Der klassische Nachweis erfolgt durch das Hybridisieren einer markierten Sonde (Fluoreszenzfarbstoff, Enzym, Biotin) an das RCP³² (Abb. 1.3.2 a) oder durch den Einbau von markierten (Fluoreszenzfarbstoff, Biotin) Nukleotiden in das Produkt der RCA (Abb. 1.3.2 b). Durch die kontinuierliche Synthese des komplementären Startmoleküls während der RCA entstehen mehrere aneinander gebundene Kopien der Sequenz. Diese vielen Bindungssequenzen verstärken die Markierung eines RCPs durch eine Sonde, da das RCP von einem Startmolekül ausgeht und tausende Sonden binden können. Dieser Ansatz ist indirekt, weil bei der Verwendung einer Sonde ein zusätzlicher Hybridisierungsschritt nach der erfolgten RCA zum Nachweis des RCPs notwendig ist. Unter Verwendung von markierten Nukleotiden wird das RCP während der Synthese markiert, deshalb findet hier ein direkter Nachweis des RCPs statt. Jedoch ist die Synthese des RCPs einer zusätzlichen Belastung ausgesetzt, durch die markierten Nukleotide. Dadurch könnte die Leistung der Phi29-Polymerase beeinträchtigt werden.

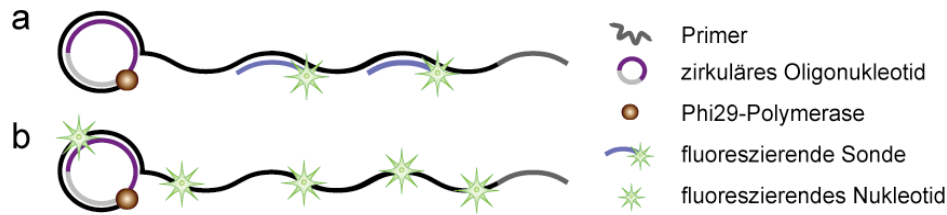


Abbildung 1.3.2 | Klassischer Nachweis des *Rolling Circle Products*. (a) Nach der erfolgten RCA kann das Produkt durch komplementäre Sonden detektiert werden, welche z. B. mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. (b) Des weiteren können auch während der Synthese von der Phi29-Polymerase mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Nucleotide eingebaut werden. Die Fluoreszenzfarbstoffe können über eine entsprechende Messung detektiert werden.

1.4 DNAzyme

DNAzyme werden auch als Deoxyribozyme bezeichnet und sind funktionelle, einzelsträngige DNS-Moleküle mit einer katalytischen Aktivität, welche 1994 entdeckt wurden³⁴. Beispiele für DNAzyme sind Sequenzen, welche die Fähigkeit besitzen, RNS und DNS zu schneiden, RNS zu ligieren und DNS zu phosphorylieren³⁴⁻³⁸. Verglichen mit Proteinen und RNS sind DNAzyme, wie alle Desoxyribonucleinsäuren, stabiler und können leichter durch gebräuchliche molekularbiologische Methoden manipuliert und modifiziert werden³⁹⁻⁴¹. Besonders die im Vergleich zu Proteinen hohe Thermostabilität der DNS kann hervorgehoben werden. Proteine neigen dazu, nach einem Temperaturschritt irreversibel und Nucleinsäuren reversibel zu denaturieren. Die hohe Temperatur löst die komplexe Sekundär-, Tertiär- oder Quartärstruktur des Proteins auf, da die Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren des Proteins irreversibel gespalten werden.

Durch eine zusätzliche Hydroxylgruppe unterscheidet sich die RNS von der DNS, aufgrund dieses Strukturunterschieds neigt die RNS zur Autohydrolyse. Ein weiterer Vorteil von DNAzymen sind geringe Kosten für die Synthese, da 25 nmol Oligonucleotid mit einer Länge von 20 Nucleotiden kommerziell bereits für 5 Euro zu erwerben sind.

In dieser Arbeit wird ein spezielles DNAzym verwendet, es hat eine heminbindende DNS-Sequenz mit einer Peroxidase-Aktivität, welche von Travascio und Kollegen 1998 beschrieben wurde⁴². Es ist bekannt, dass guaninreiche DNS-Sequenzen bei Anwesenheit von Kalium eine viersträngige Struktur formen, den G-Quadruplex (Abb. 1.4.1).

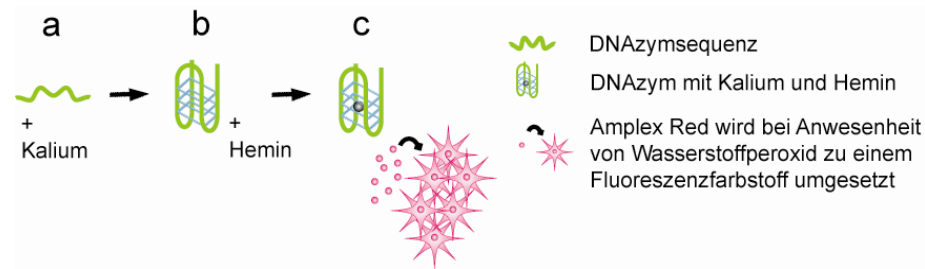


Abbildung 1.4.1 | Konformation von einem DNAzym. (a) Bei Anwesenheit von Kalium formt eine einzelsträngige, guaninreiche DNS-Sequenz einen viersträngigen G-Quadruplex. (b) In diesem Komplex interkaliert Hemin (c) und ein katalytisch aktives DNAzym wird geformt. Peroxidase-Substrate wie Amplex Red werden bei Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und katalytisch aktiven DNAzymen zu einem Fluoreszenzfarbstoff umgesetzt.

Dies ist die Voraussetzung für das Interkalieren von Hemin in den Komplex, damit ein katalytisches Zentrum entstehen kann. Die Sequenz wird deshalb auch als heminbindendes Aptamer bezeichnet⁴³. Nachdem der Komplex geformt wurde, hat die DNS eine Peroxidase-Aktivität. Die Bildung eines katalytisch aktiven DNAzyms wird als Konformation bezeichnet. Das konformierte DNAzym kann nun Peroxidase-Substrate umsetzen. Diese Edukte können nach ihrem entstehenden Produkt in präzipitierende Produkte (z.B. ABTS), chemolumineszente Produkte (z.B. Luminol) und fluoreszierende Produkte (z.B. Amplex Red) unterteilt werden. Das oxidierende Reagenz Wasserstoffperoxid ist für alle Substrate notwendig.

Die katalytische Aktivität von DNAzymen als Sensor kann an alle Arten von Nachweissystemen gekoppelt werden durch die Konjugation mit Bindungspartnern wie Antikörpern, Aptameren oder Nucleinsäuresonden⁴⁴⁻⁴⁷.

1.5 Nachweis des RCPs über katalytische Zentren

Ein spezieller Ansatz zum Nachweis des RCPs kombiniert die RCA mit katalytischen Zentren. Dabei wird neben der RCA die Peroxidase-Aktivität von bestimmten DNS-Sequenzen, den DNAzymen⁴², genutzt.

Der Vorteil der Kombination von RCA mit DNAzymen ist, dass es neben der Amplifikation durch die RCA zu einer Verstärkung des Signals kommt, da ein kontinuierlicher Substratumsatz der DNAzyme stattfindet. Das Startmolekül enthält eine Sequenz, welche komplementär zum Analyten ist und zusätzlich eine komplementäre DNAzymsequenz. Während des ersten Amplifikationsschrittes, der RCA, entstehen viele Kopien des DNAzyms innerhalb des RCPs (Abb. 1.5.1 a). Die DNAzymsequenzen können dann in der Anwesenheit von Kalium und Hemin

katalytisch aktive DNAzyme ausbilden (Abb. 1.5.1 b). In dem zweiten Schritt katalysieren die konformierten DNAzyme einen kontinuierlichen Substratumsatz (Abb. 1.5.1 c).

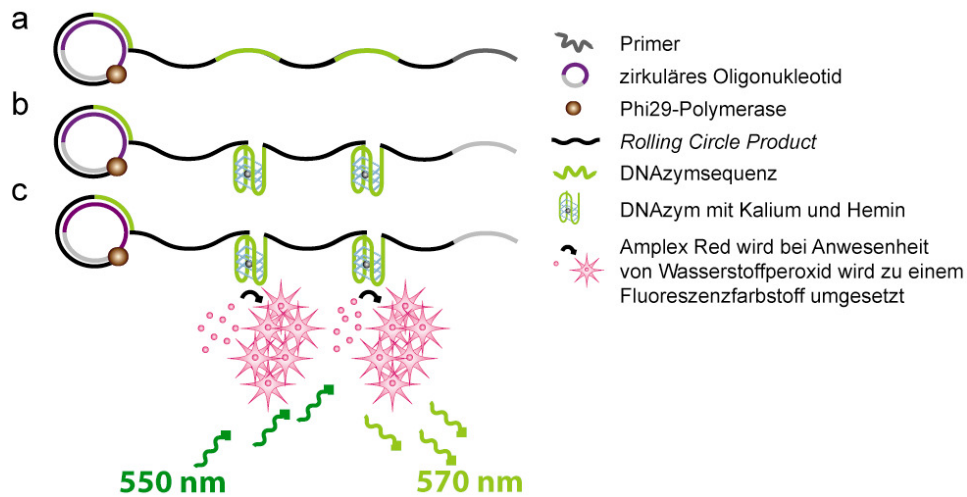


Abbildung 1.5.1 | Nachweis des *Rolling Circle Products* über DNAzyme. (a) Durch die RCA eines Startmoleküls mit einer komplementären DNAzymsequenz entstehen Kopien des DNAzyms innerhalb des RCPs. (b) Die Zugabe von Kalium zum RCP führt zur Ausbildung des G-Quadruplex der DNAzyme. In diesen viersträngigen Komplex kann Hemin interkalieren und eine katalytisch aktive DNS-Sequenz liegt vor. (c) Nach der Konformation der DNAzyme kann das Substrat Amplex Red in der Anwesenheit von Wasserstoffperoxid oxidiert werden. Das entstandene Produkt ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der bei $\lambda_{\text{abs}} 550 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} 570 \text{ nm}$ ausgelesen werden kann.

Für den Nachweis des RCPs über DNAzyme können durch entsprechende Wahl des Substrates verschiedene optische Auslesegeräte angewendet werden. Zum Beispiel entsteht unter Verwendung des Substrates Amplex Red nach der Oxidation ein Fluoreszenzfarbstoff, dessen Signal bei $\lambda_{\text{abs}} 550 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} 570 \text{ nm}$ ausgelesen werden kann.

Die Kombination dieser beiden Systeme, der RCA und den DNAzymen eignet sich besonders gut, da beide mit Bindungspartnern zum Nachweis von Biomolekülen verbunden werden können.

1.6 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, verschiedene Ansätze für ein RCA-basiertes Nachweissystem zum Nachweis von geringen Stoffmengen zu etablieren. Dafür wurde die *Rolling Circle Amplification*, welche auf der natürlich vorkommenden Sigma-Replikation der Phagen beruht, genutzt. In allen in dieser Arbeit entwickelten Ansätzen war die RCA der wichtigste Verstärkungsfaktor, der zum Nachweis des Analyten führen sollte. Dabei sollten durch einen sensitiven Versuchsaufbau, zeitaufwändige und teure Markierungen und Amplifikationen (z.B. PCR) von Proben vermieden und der Analyt mittels RCA markierungsfrei nachgewiesen werden.

Die Voraussetzung für eine kontinuierliche DNS-Synthese durch die RCA ist ein geeignetes Startmolekül. Dafür sollte im Rahmen dieser Arbeit zunächst ein Protokoll zur enzymatischen Synthese eines zirkulären Oligonukleotids erarbeitet werden. Mit diesen Startmolekülen sollte ein optimiertes RCA-Protokoll erstellt und verschiedene Ansätze für den Nachweis des Amplikons der RCA verfolgt werden. Die vorgestellten Ansätze zum Nachweis des *Rolling Circle Products* sollten etabliert und auf verschiedene *Microarray*-Plattformen adaptiert werden. Dafür sollten Protokolle für einen Dispensierroboter erstellt werden. Durch die Miniaturisierung der Ansätze sollte das Volumen verringert und gleichzeitig die Sensitivität erhöht werden. Dies sollte einhergehen mit einem reduzierten Materialverbrauch und einer verringerten Analysezeit.

Neben den klassischen Nachweissystemen sollte ein spezieller Ansatz basierend auf dem Nachweis des RCPs über DNAzyme erfolgen. Durch die Kombination von katalytisch aktiven DNAzymen mit der RCA sollte ein leistungsfähiges Werkzeug zum Nachweis von Analyten, welches auf der Amplifikation von katalytisch aktiven DNS-Sequenzen beruht, entwickelt werden. Dazu sollten zunächst die verwendeten DNAzyme charakterisiert und ein Versuch zum Nachweis in 96er Mikrotiterplatten etabliert werden. Die Aktivität der katalytischen DNAzyme innerhalb des RCPs sollte analysiert werden. Durch die Kombination der RCA mit den DNAzymen sollte ein Ansatz entwickelt werden, der eine Detektion in kleinen Volumina erlaubt.

Die zu entwickelnde Ansatz sollten einhergehen mit einem minimalen Verbrauch an Probe und daher von großer Bedeutung für die Diagnostik, die Lebensmittelindustrie und die Forschung sein. Besonderes Augenmerk sollte auf einen offenen Versuchsaufbau gelegt werden, der sich durch eine große Flexibilität auszeichnen sollte, um leicht an die jeweiligen Konditionen der unterschiedlichsten Analyten (chemische Komponenten, Proteine, Nukleinsäuren) und vorhandenen Ausleseeinheiten adaptiert werden zu können.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Bezeichnung	Hersteller
2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure (ABTS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Agarose	Invitrogen GmbH
40 %iges Acrylamid/Bisacrylamid 19:1	BioRad
Aldehydarrays	CEL Association Inc.
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	BioRad
Borsäure	Merck KGaA
1,4-Dithiothreitol (DTT)	CARL ROTH GmbH & Co KG
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA
Ethanol	Merck KGaA
Harnstoff	Merck KGaA
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Merck KGaA
2-Hydroxypropan-1,2,3-tricarbonsäure (Zitronensäure)	Merck KGaA
Glycerin (wasserfrei)	Merck KGaA
Natriumborhydrid >97%	CARL ROTH GmbH & Co KG
Dinatrium-Ethylendiamintetraacetat	CARL ROTH GmbH & Co KG
Tetramethylethyldiamin (Ultra Pure TEMED)	Invitrogen
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad
Chlorwasserstoffsäure (HCl)	Merck KGaA
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck KGaA
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA

Magnesiumchlorid	Merck KGaA
2-Mercaptoethanol	Merck KGaA
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck KGaA
Natriumhydroxid	Merck KGaA
di-Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat (Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O)	Merck KGaA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck KGaA
Tris-HCl	Merck KGaA
Tween 20	CARL ROTH GmbH & Co KG
30 %iges Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck KGaA

Tabelle 2.1.1 | Liste der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Bezeichnung	Hersteller
0,45 µm Spritzenvorsatz	Nalgene
Quick-Load 100 bp DNA Ladder	New England BioLabs
MassRuler™ DNA Ladder Mix	Fermentas GmbH
96 Well Plate	Nunc
384-Well-Platte v-bottom	Genetix
Adhesive PCR Film	Thermo Scientific
428™ Array Scanner	Affymetric
Amplex Red	Molecular Probes, Inc.
Biotin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Biotin-dUTP (5 mM)	Jena Bioscience
Biotin-11-dUTP (5 mM)	Jena Bioscience
Biotin-16-dUTP (1 mM)	Boehringer Mannheim Biochemical
Biotin-16-dUTP (1 mM)	Roche

Biotin-18-dUTP (5 mM)	Jena Bioscience
Cy3-dUTP (1 mM)	Amersham Biosciences
Cy3-Streptavidin	Amersham Biosciences
dATP, dCTP, dGTP, dTTP peqGOLD	peqlab Biotechnologie GmbH
Restriktionsenzym Ddel (+Puffer)	New England BioLabs
1,5 ml Tubes	Eppendorf AG
ExonukleaseVII	EPICENTRE biotechnologies
FLA-5100	FUJIFILM
Gasket Slides (4er oder 8er)	Agilent Technologies
Hemin bovine (Hemin)	Molekula Ltd.
<i>Horseradish</i> Peroxidase (HRP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Hybond N+	GE Healthcare
Inkubator	Heraeus
Laboratory Centrifuge 4KIS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
M13mp18 single-stranded DNA	New England BioLabs
Mikroprozessor pH-Meter CG 832	Schott Geräte GmbH
miniSpin Zentrifuge	Eppendorf AG
Restriktionsenzym MnlI (+Puffer)	New England BioLabs
Nano-Well-Chips	Spende von Dr. A. Dahl, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin
Mineralöl	USB corp.
PCR-Film	Abgene
Phi29-Polymerase (+Puffer)	New England BioLabs
Proteinase K	Invitrogen
sciFLEXARRAYER S5	Scienion AG
SHAKER S3.01	ELMI
Spektralphotometer Spectra Max 250	Molecular Devices
Stratalinker UV Crosslinker	Stratagene (Agilent Technologies)
SYBR Green I	Invitrogen

T4 gp 32 (10 mg/ml)	New England BioLabs
T4-Ligase (+Puffer)	New England BioLabs
T4-Polynukleotid-Kinase (+ Puffer)	New England BioLabs
Thermomixer comfort	Eppendorf AG
Vortex-Genie	neoLab Migge
	Laborbedarf-Vertriebs GmbH

Tabelle 2.1.2 | Liste der in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien und Geräte.

2.1.3 Software

Programm	Hersteller
Adobe Illustrator CS4	Adobe Systems GmbH, München
AIDA Image Analyser Software 4.19	raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt
CorelDRAW X3	Corel Corp., Fremont, CA, USA
EndNote X3	Thomson Reuters, Carlsbad, CA, USA
GenePix Pro 6 Demo	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA
IDT Oligoanalyzer 3.0 und 3.1	Integrated DNA Technology, München
MS Office 2003	Microsoft Corp.
Origin 8	OriginLab Corp., Northampton, MA, USA
LabVIEW 8.5 (Laboratory Virtual Instrumentation Engineering Workbench)	National Instruments Corp., Austin, Texas, USA

Tabelle 2.1.3 | Liste der in dieser Arbeit verwendeten *Software*.

2.1.4 Oligonukleotide

Das für diese Arbeit verwendete Oligonukleotid L wurde von Tib MolBiol gekauft. Alle anderen verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen bezogen. Die verwendeten Oligonukleotide sind mit ihren Sequenzen in der Tabelle 2.1.4 aufgeführt. Manche Oligonukleotidsequenzen tragen einen Fluoreszenzfarbstoff (Cy3, Alexa546),

ein Biotin oder eine Aminogruppe an einem der Enden. Diese Markierungen stehen an der entsprechenden Stelle der Sequenz. Die Sequenz von DNAzymen wurde innerhalb der Oligonukleotide fett markiert, und komplementäre DNAzymsequenzen wurden durch einen Unterstrich gekennzeichnet. Für die verwendeten DNAzymsequenzen wurde die jeweilige Referenz der Sequenz an das Ende der Oligonukleotidsequenz angehängt.

Alle Oligonukleotide wurden mit bidestilliertem Wasser auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt. Nach Zugabe der Flüssigkeit wurde das Gefäß intensiv gevortext (Vortex-Genie) und dann 20 Minuten auf einem Thermoshaker bei 450 rpm inkubiert, um eine vollständige Lösung des Lyophilisat zu gewährleisten.

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
A	GGC GTA TTC TAG GAG TGG GGA AGT CTG GAA CAG TAC CAC GAG GGC ATG GTG ATG GTG ATG GTG CCA TTC GAT TTT CTG AG
B	GAA TAC GCC CTC AGA AAA TC
C	Biotin-CGC GAA GAA TTC GCG GCT CAG AAA ATC GAA TGG
D	CGC GAA TTC TTC GCG ACG CCA AGG GCC CTG GAA CAG TAC CTC GAG CCC ATG GTG ATG GTG ATG GTG CCA TTC GAT TTT CTG AGC
E	Biotin-CGA TGG GAA TAC GCC CTC AGA AAA TC
F	Alexa546-TAG GAG TGG GGA AGT CT
G	GAA CAG TAC CAC GAG GGC
H	Amino-TCG ACC CGT ACC GAT GGG AAT ACG CCC TCA GAA AAT C
I	Amino-CGA TGG GAA TAC GCC CTC AGA AAA TC
J	Amino-GAA TAC GCC CTC AGA AAA TC
K	Biotin-CCA TCG GTA CGG GTC GA

L	Amino-TGG TCG CCA ACC TGA TGT CTA CAA AGC TCA ACT CAG A-Cy3
M	Amino-CGC CAA CCT GAT GTC TAC AAA GCT CAA GTC ACA TCG ACC CGT ACC GAT GGG AAT ACG CCC TCA GAA AAT C
N	Amino-AGC TCA AGT CAC ATC GAC CCG TAC CGA TGG GAA TAC GCC CTC AGA AAA TC
O	Biotin-CTC AGA AAA TCG GGT AGG GCG GGT TGG GTT TTG GGT AGG GCG GGT TGG GTT TTG G GTA GGG CGG GTT GGG GAA TAC GCC ⁴⁸
P	Biotin-CTC AGA AAA TCT TTT GGG TAG GGC GGG TTG GGT TTT CCA TCG GTA TTT TGG GTA GGG CGG GTT GGG TTT TGA ATA CGC C ⁴⁸
Q	Biotin-CTC AGA AAA TCT TTT CCA TCG GTA CGG GTC TTT TGG GTA GGG CGG GTT GGG TTT TCC ATC GGT ACG GCT GGA ATA CGC C ⁴⁸
R	GGC GTA TTC CAG CCG TAC CGA TGG AAA <u>ACC CAA CCC</u> <u>GCC CTA CCC</u> AAA AGA CCC GTA CCG ATG GAA AAG ATT TTC TGA G ⁴⁸
S	GAT TTT CTG AGG GCG TAT T
T	CTC AGA AAA TCT TTT CCA TCG GTA CGG GTC TTT TGG GTA GGG CGG GTT GGG TTT TCC ATC GGT ACG GCT GGA ATA CGC C ⁴⁸
U	AGT CCG TGG GTA GGG CGG GTT GGG GGT GAC T ⁴⁹
V	GGC GTA TTC CAG CCT ACA TGA AAA <u>GTC ACC CCC AAC</u> <u>CCG CCC TAC CCA CGG ACT</u> AAA CCT CCA TGA AAA GAT TTT CTG AG ⁴⁹

Tabelle 2.1.4 | Liste der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

2.1.5 DNS-Größenstandard

Für die verwendeten Acrylamid/Bisacrylamid- und Agarose-Gele wurde der Quick-Load 100 bp-DNS-Größenstandard von NEB (New England BioLabs) und der MassRuler™ DNA Ladder Mix 80 bp-DNS-Größenstandard von Fermentas verwendet. Das Bandenmuster beider Marker ist in Abbildung 2.1.5 dargestellt. Dieser Marker (M) diente als Orientierung für die aufgetragene Probe. Je 3 µl wurden pro Gelspur aufgetragen.

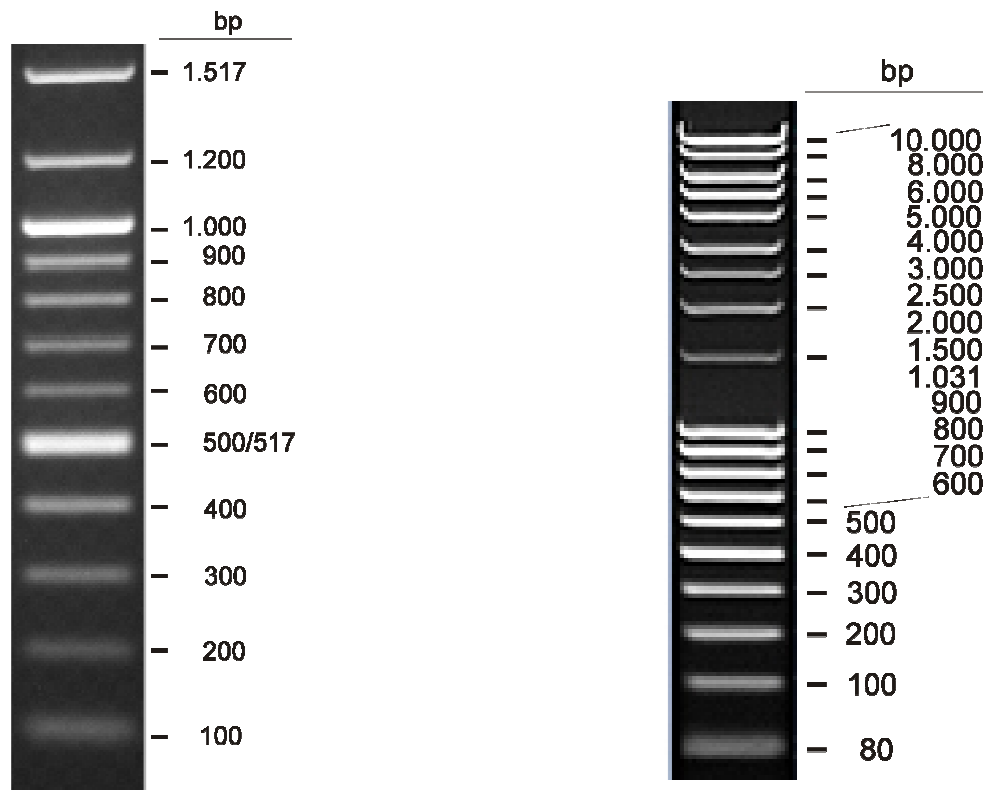


Abbildung 2.1.5 | Links 100 bp-DNS-Größenstandard von NEB. Rechts 80 bp-DNS-Größenstandard von Fermentas.

2.1.6 Zusammensetzung der Puffer und Lösungen

- **10x PBS-Puffer**

80 g NaCl (1,4 M), 2 g KCl und 16 g Na₂HPO₄ x H₂O (100 mM) wurden in 800 ml bidestilliertem Wasser gelöst und der pH-Wert mit HCl auf 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde auf einen Liter mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt und autoklaviert.

- **1x PBS-Puffer**

100 ml des 10x PBS-Puffers wurden mit bidestilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

- **20x SSC-Puffer**

175,3 g NaCl (3 M) und 88,2 g Natrium-Citrat – 2x H₂O (0,3 M) wurden in 800 ml bidestilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert auf 7,0 mit 5 M NaOH eingestellt und auf einen Liter mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt.

- **6x SSC-Puffer**

75 ml 20x SSC-Puffer wurden auf 250 ml mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt.

- **3,5x SSC-Puffer**

43,75 ml 20x SSC-Puffer wurden auf 250 ml mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt.

- **2x SSC-Puffer**

25 ml 20x SSC-Puffer wurden auf 250 ml mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt.

- **1x SSC-Puffer**

12,5 ml 20x SSC-Puffer wurden auf 250 ml mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt.

- **0,2x SSC-Puffer**

2,5 ml 20x SSC-Puffer wurden auf 250 ml mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt.

- **20 %ige SDS-Lösung**

50 g Natriumdodecylsulfat (70 mM) wurden in 200 ml bidestilliertem Wasser durch Temperieren der Lösung auf 68°C unter Rühren gelöst. Der pH-Wert wurde auf 7,4 mit HCl eingestellt und mit bidestilliertem Wasser auf 250 ml aufgefüllt.

- **5 M NaOH-Lösung**

20 g NaOH wurden in 80 ml bidestilliertem Wasser gelöst und mit diesem auf 100 ml aufgefüllt.

- **10x ExonukleaseVII-Puffer**

220 mg Tris-HCl (700 mM), 46,8 mg EDTA (80 mM), 172 mg 2-Mercaptoethanol (100 mM) wurden in 1,5 ml bidestilliertem Wasser gelöst und auf 2 ml mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt.

- **10x TBE-Puffer**

108 g Tris (0,9 M), 55 g Borsäure (0,9 M) und 80 ml einer 0,25 M Na₂EDTA-Lösung wurden in 800 ml bidestilliertem Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde auf 8,0 mit 5 M NaOH eingestellt und der Puffer auf 1 Liter mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt.

- **1x TBE-Puffer**

100 ml des 10x TBE-Puffers wurden mit bidestilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

- **1,6 % APS-Lösung**

0,8 g APS wurden in 50 ml bidestilliertem Wasser gelöst.

- **0,25 M Na₂EDTA-Lösung**

46,53 g Na₂EDTA wurden in 450 ml bidestilliertes Wasser gegeben. Der pH-Wert wurde auf 8,0 mit 5 M NaCl eingestellt, was zur Lösung der Pulverrückstände führte. Die Lösung wurde auf 500 ml mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt.

- **Dot Blot Waschlösung I**

25 ml 20x SSC-Puffer wurden mit 1,25 ml 20 %iger SDS-Lösung gemischt und mit bidestilliertem Wasser auf 250 ml aufgefüllt.

- **Dot Blot Waschlösung II**

12,5 ml 20x SSC-Puffer wurden mit 1,25 ml 20 %iger SDS-Lösung gemischt und mit bidestilliertem Wasser auf 250 ml aufgefüllt.

- **Dot Blot Waschlösung III**

1,25 ml 20x SSC-Puffer wurden mit 1,25 ml 20 %iger SDS-Lösung gemischt und mit bidestilliertem Wasser auf 250 ml aufgefüllt.

- **2x B&W-Puffer**

100 ml 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 ml 100 mM EDTA und 23,38 g NaCl wurden gelöst und mit bidestilliertem Wasser auf 200 ml aufgefüllt.

- **1x B&W-Puffer**

50 ml 2x B&W-Puffer wurden auf 100 ml mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt.

- **10 µM Biotin-Lösung**

Eine Stocklösung aus 3,27 mM Biotin wurde hergestellt indem 80 mg Biotin in 100 ml Ethanol gelöst und durch einen 0,45 µm Filtrieraufsatz steril filtriert wurden. Für die 10 µM Biotin-Lösung wurden 15,29 µl Stocklösung auf 5 ml mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt. Die Lösungen wurden bei 4 °C gelagert.

- **Stopplösung der Beads (10 mM Tris-HCl-Puffer)**

0,39 g Tris-HCl (10 mM) wurden in 200 ml bidestilliertem Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit 5 M NaOH auf 8,0 eingestellt und auf 250 ml mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt.

- **Oligo-Wasch-Puffer (3x SSC, 0,1% SDS)**

30 ml 20x SSC-Puffer wurden mit 1 ml 20 %iger SDS-Lösung gemischt und mit bidestilliertem Wasser auf 200 ml aufgefüllt und mit einem 0,45 µm Filtrieraufsatz steril filtriert.

- **Blockierlösung für die Aldehydoberflächen**

In 300 ml Ethanol, 10 ml 10x PBS-Puffer und 80 ml bidestilliertem Wasser wurde 1 g NaBH₄ (66 mM) gelöst. Die Lösung wurde immer frisch angesetzt, da sie nach der Zugabe von NaBH₄ innerhalb einer halben Stunde verbraucht werden musste.

(Quelle: PEQLAB Biotechnologie GMBH)

- **Stopplösung⁵⁰ der RCA**

20 ml 20x SSC-Puffer wurden mit 25 µl Tween 20 auf 200 ml mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt.

- **Hybridisierungslösung⁵¹ der Aldehydarrays**

In 300 ml bidestilliertem Wasser wurden 14,61 g NaCl (0,5 M), 50 ml eines 100 mM Tris-HCl-Puffers (pH 7,5), 5 ml 100 mM EDTA-Lösung, 250 µl 20 %iger SDS-Lösung und 50 ml einer 100 mM DTT-Lösung gemischt und auf 500 ml mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt.

- **100 mM Tris-HCl-Puffer**

3,94 g Tris-HCl wurden in 200 ml bidestilliertem Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit 5 M NaOH auf 7,5 eingestellt und auf 250 ml mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt.

- **100 mM EDTA-Lösung**

9,3 g EDTA wurden in 250 ml bidestilliertem Wasser gelöst.

- **100 mM DTT-Lösung**

3,86 g DTT wurden in 250 ml bidestilliertem Wasser gelöst.

- **Reaktionspuffer für Amplex Red Ansätze**

0,35 g NaH₂PO₄ + 1x H₂O (50 mM) wurden in 40 ml bidestilliertem Wasser gelöst und mit 5 M NaOH auf den pH-Wert 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde auf 50 ml mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt und mit einem 0,45 µm Filtrieraufsatz steril filtriert.

- **2x Konformationspuffer der DNAzyme**

0,6 g HEPES (50 mM), 0,15 g KCl (40 mM) und 1,17 g NaCl (400 mM) wurden in 40 ml bidestilliertem Wasser gelöst und mit 5 M NaOH auf den pH-Wert 7,4 eingestellt.

Die Lösung wurde auf 50 ml mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt und durch einen 0,45 µm Filtrieraufsatz steril filtriert.

- **8,6 mM Hemin (Stocklösung)**

5,6 mg Hemin wurden in 1 ml DMSO gelöst.

- **50 mM Phosphat-Citrat-Puffer**

2 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (25 mM) und 1,2 g Zitronensäure (12,5 mM) wurden in 400 ml gelöst. Der pH-Wert wurde mit HCl auf 5,0 eingestellt und mit bidestilliertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt.

- **1 mM Amplex Red**

Die Stocklösung des gelieferten Amplex Red hatte eine 10 mM Konzentration. 10 µl der Stocklösung wurden in 90 µl Reaktionspuffer verdünnt.

- **Arbeitslösung (Amplex Red)**

1 µl der gelieferten Amplex Red Stocklösung (10 mM) wurde in 95 µl Reaktionspuffer verdünnt.

- **200 µM H_2O_2 -Lösung**

1 µl der 30 %igen H_2O_2 -Lösung wurde 99 µl Reaktionspuffer verdünnt (3 mM H_2O_2). Von dieser 3 mM H_2O_2 -Lösung wurden 2 µl in 28 µl Reaktionspuffer verdünnt, um eine 200 µM H_2O_2 -Lösung zu erhalten.

- **8 µM H_2O_2 -Lösung**

Von der 200 µM H_2O_2 -Lösung wurden 4,5 µl in 295,5 µl Reaktionspuffer verdünnt, um eine 8 µM H_2O_2 -Lösung zu erhalten.

2.2 Methoden

2.2.1 Standard Hybridisierung

Die Konzentration des Ansatzes wurde mit bidestilliertem Wasser auf maximal 12,5 µM Oligonukleotid eingestellt. Der Ansatz mit den Oligonukleotiden in gleichen Stoffmengenverhältnissen wurde auf 95°C für 15 Minuten inkubiert und im Folgenden für 6 Stunden oder über Nacht für die Hybridisierung bei 21°C inkubiert. Wurde eine abweichende Durchführung vorgenommen, wurde dies bei den Ergebnissen vermerkt.

2.2.2 Zirkularisieren

▪ **Phosphorylierung des 3'-Endes eines linearen Oligonukleotids**

100 pmol lineares Oligonukleotid wurden mit 10 Units T4-Polynukleotid-Kinase und 150 nmol dATP in 1x T4-Polynukleotid-Kinase-Puffer gemischt. Die Suspension wurde bei 37°C für 30 Minuten inkubiert, dann wurde die Phosphorylierungsreaktion durch Inkubation bei 75°C für 20 Minuten gestoppt.

▪ **Hybridisierung**

100 pmol Primer wurden zu dem Phosphorylierungs-Ansatz hinzugegeben und der gesamte Ansatz bei 95°C für 20 Minuten inkubiert. Nachdem der Ansatz auf 21°C abgekühlt war, wurde der Primer an die Enden des linearen Oligonukleotids hybridisiert. Dazu wurde der Ansatz über Nacht bei 21°C inkubiert. Die direkte Nähe der offenen Enden führt zur Ligation des linearen Oligonukleotides und damit zu einem zirkulären Strang.

▪ **Ligation**

3.000 Units T4-Ligase, 80 nmol dATP in 1x T4-Ligase-Puffer wurden zu dem Ansatz hinzugefügt und diese Ligationslösung für 2 Stunden bei 16°C inkubiert, gefolgt von einer Inkubation bei 95°C für 20 Minuten, um die Reaktion zu stoppen.

▪ **ExonukleaseVII-Verdau**

Die Primer und das lineare Oligonukleotide wurden aus dem Ansatz durch einen ExonukleaseVII-Verdau entfernt, um einen Ansatz nur mit zirkularem Oligonukleotid zu erhalten, dem Startmolekül der RCA. Die Lösung mit den linearen und zirkulären Oligonukleotiden wurde mit 20 Units den DNS-Exonuklease, ExonukleaseVII in 1x ExonukleaseVII-Puffer bei 37°C für 2 Stunden inkubiert, um die linearen Oligonukleotide zu entfernen. Der ExonukleaseVII-Verdau wurde durch einen Temperaturschritt bei 95°C für 15 Minuten gestoppt. Die Zirkularisierung wurde durch eine gelelektrophoretische Auftrennung der Proben kontrolliert.

▪ **Hybridisierung des Analyten**

100 pmol des DNS-Analyten wurden zu dem zirkularisierten Oligonukleotid hinzugegeben. Die Hybridisierung erfolgte nachdem Erwärmen auf 95°C für 20 Minuten bei 21°C in 6 Stunden.

2.2.3 Gele

Es wurden Gele verwendet, um die Oligonukleotide, die Startmoleküle und die *Rolling Circle Products* elektrophoretisch nach ihrer Größe aufzutrennen. Die DNS ist negativ geladen und läuft, wenn man einen Strom anlegt in die Richtung der positiv geladenen Elektroden. Je länger die DNS-Sequenz war, desto kürzer war die Laufstrecke im Gel. Die Proben wurden mit 2 % Volumenanteilen Glycerin versetzt, vor dem Auftragen auf 95°C für 10 Minuten inkubiert und danach sofort auf Eis gestellt. Dies sollte Sekundärstrukturen der DNS auflösen und das Auftrennen im Gel verbessern.

- **8 %iges Acrylamid/Bisacrylamid-Gel**

Für das Gel wurde eine im Hause hergestellte Apparatur verwendet, bei der die Glasplatten zwischen denen das Gel fixiert ist, aufrecht stehen und eine elektrophoretische Auftrennung vertikal verläuft. Die Glasplatten haben DIN A4-Maße, und die verwendeten Abstandshalter und der 17er Kamm haben eine Dicke von 0,75 mm. Für das Herstellen des Gels wurden 17,8 ml 40 %iges Acrylamid/Bisacrylamid und 10 ml 10x TBE-Puffer auf 100 ml mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt. Davon wurden 5 ml Starterlösung abgenommen und mit 500 µl 1,6 %igem APS und 50 µl TEMED versetzt. Die Starterlösung wurde zur Abdichtung der Glasplatten umgehend an die Ränder der Platten pipettiert. Nach dem Polymerisieren der Starterlösung am Rand wurde zu der Gellösung 50 µl TEMED und 3,3 ml 1,6 %iges APS gegeben und alles zwischen die DIN A4 Glasplatten gegossen. Nach dem Polymerisieren wurde das Gel in eine Laufkammer gestellt. Als Laufpuffer wurde 1x TBE-Puffer verwendet mit dem auch die Taschen des Gels vor dem auftragen der Probe gespült wurden. Nach dem Beladen der Geltaschen wurde die elektrophoretische Auftrennung durch das Anlegen einer Spannung von 280 V gestartet. Die Auftrennung wurde gestoppt, wenn die Lauffront 3 cm vor dem Ende der Glasplatten war.

- **2,5 %iges Agarose-Gel**

1,5 g Agarose wurden in 3 ml 10x TBE-Puffer auf 60 ml mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt. Die Lösung wurde zum Lösen der Agarose aufgeköcht und in eine im Hause entwickelte Apparatur gegossen, bei der die elektrophoretische Auftrennung vertikal verläuft. Als Laufpuffer wurde 1xTBE-Puffer verwendet. Nach dem Aushärten des Gels wurden die Proben aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung wurde durch das Anlegen einer Spannung von 100 V vorgenommen. Kurz vor dem Auslaufen der Laufmittelfront wurde der Vorgang gestoppt.

2.2.4 SYBR Farbstoffe

Die 8 %igen Acrylamid/Bisacrylamid-Gele und 2,5 %igen Agarose-Gele wurden nach der Elektrophorese in einem Schüttelbad (ELMI Shaker) bei 70 rpm lichtabgeschlossen maximal 20 Minuten gefärbt. Zum Färben wurden SYBR Green I oder SYBR Gold verwendet. Beide Farbstoffe interkalieren in die DNS und ließen sich mittels Fluoreszenz auslesen. Von beiden Farbstoffen wurde jeweils eine Färbungslösung in 1:10.000 Verdünnung angesetzt. Dafür wurden jeweils 50 µl des Farbstoffes in 50 ml 10x TBE-Puffer auf 500 ml mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt. Die untersuchten Gele wurden im FLA-5100 (FUJIFILM) mit Licht der Wellenlänge λ_{abs} 485 nm bestrahlt und das Fluoreszenzsignal bei λ_{ems} 514 nm aufgenommen. Mittels AIDA Image Analyser Software wurden die Gele analysiert.

2.2.5 Rolling Circle Amplification

Die RCA-Reaktionsansätze wurden bei 30°C inkubiert, wenn es nicht anders im Ergebnisteil vermerkt ist. Die verschiedenen RCA-Reaktionsansätze wurden entsprechend der Experimente verändert und über das Volumen an bidestilliertem Wasser ausgeglichen, so dass sich das Gesamtvolumen nicht veränderte. Die Standardansätze sind hier aufgeführt. Die RCA-Reaktion wurde durch ein Erwärmen der Probe auf mindestens 75°C für 20 Minuten beendet.

- **M13mp18 (20 µl) RCA-Reaktionsansatz**

20 pmol Startmolekül M13mp18 (250 µg/ml) und 100 pmol hybridisierter Primer (5' GCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTG) wurden zusammen mit je 1 µl 100 µM der dNTPs, 4,4 µg BSA, 50 Units Phi29-Polymerase und 2,0 µl 10x Phi29-Puffer mit bidestilliertem Wasser auf einen 20 µl-Ansatz aufgefüllt.

- **36 µl-RCA-Reaktionsansatz**

Startmolekül und hybridisierter Primer wurden mit je 1 µl 100 µM dNTP, 8 µg BSA, 50 Units Phi29-Polymerase und 3,6 µl 10x Phi29-Puffer mit bidestilliertem Wasser auf einen 36 µl-Ansatz aufgefüllt.

- **35 µl-RCA-Reaktionsansatz**

Startmolekül und hybridisierter Primer wurden mit je 1 µl 100 µM dNTP, 7 µg BSA, 25 Units Phi29-Polymerase und 3,5 µl 10x Phi29-Puffer mit bidestilliertem Wasser auf einen 35 µl-Ansatz aufgefüllt.

▪ 70 µl-RCA-Reaktionsansatz

Startmolekül und hybridisierter Primer wurden mit je 2,0 µl 100 µM dNTP, 14 µg BSA, 50 Units Phi29-Polymerase und 7,0 µl 10x Phi29-Puffer mit bidestilliertem Wasser auf einen 70 µl-Ansatz aufgefüllt.

2.2.6 Dot Blot

Zur Analyse des synthetisierten RCPs mit eingebauten, markierten Nukleotiden wurden die inaktivierten Proben nach der RCA in Lösung auf eine Hybond N⁺ Membran (Amersham) in 1 µl Aliquoten aufgetragen. Durch eine Bleistiftmarkierung wurde jede Position der Probe sowie die Ausrichtung der Membran am Rand festgehalten. Auf Grund der Empfindlichkeit der Membran wurde diese nur mit einer Pinzette angefasst. Das Volumen wurde langsam und in Phasen auf die Position der Membran getropft, um möglichst kleine Probenpunkte zu erhalten. Nach dem vollständigen Trocknen der Probe wurde diese mittels ultraviolettem Licht auf der Membran fixiert. Dafür wurde der *Autocrosslink Mode* des Stratalinker UV Crosslinker verwendet, der 1200 Mikrojoule auf die Membran einwirken ließ. Für alle folgenden Inkubationsschritte wurde eine Schale auf dem Elmi Schüttler bei 70 rpm verwendet. Die Membran wurde zweimal für je 5 Minuten mit der *Dot Blot*-Waschlösung I, zweimal für je 5 Minuten mit der *Dot Blot*-Waschlösung II und zweimal für je 10 Minuten mit der *Dot Blot*-Waschlösung III gewaschen. Um die eingebauten, markierten Nukleotide des RCPs nachzuweisen, wurden die Membranen mit dem Cy3-Streptavidin-Konjugat inkubiert. Das Streptavidin konnte an die eingebauten Biotin-markierten Nukleotide binden, welche durch den Einbau in das RCP auf der Membran fixiert waren. Dafür wurden 5 µg Cy3-Streptavidin (16,7 µM) in 5 ml 1x PBS-Puffer gelöst und unter Lichtausschluss für eine Stunde unter Schütteln inkubiert. Danach erfolgten zwei Waschschrte in 1x PBS-Puffer, um die nicht gebundenen Cy3-Streptavidine von der Membran zu waschen. Das Fluoreszenzsignal der fixierten Proben wurde mit dem FLA-5100 (FUJIFILM) bei λ_{abs} 550 nm und λ_{em} 570 nm ausgelesen und mittels AIDA Image Analyser Software analysiert.

2.2.7 Beads

Um zu zeigen, dass die RCA auf der Oberfläche gekoppelt ablaufen kann, wurden Dynal *Beads* M280 verwendet. Die *Beads* hatten superparamagnetische Eigenschaften und waren aus Polystyrol mit einer hydrophoben Oberfläche, auf welcher eine Monolage an Streptavidin kovalent gebunden war. Zum Abnehmen der Lösung wurde

ein magnetischer Ständer für 1,5 ml Eppendorf Gefäße verwendet, welcher die *Beads* aus der Lösung an den Rand des Gefäßes zieht, wobei die Inkubationszeit in dem Ständer jeweils 2 Minuten betrug. Alle Resuspensierungen der *Beads* erfolgten mit einer 200 µl Pipette durch mehrfaches Hoch- und Runter- Pipettieren.

- **Bindung**

10 µl (100 µg) *Beads* wurden zweimal mit 20 µl 2x B&W-Puffer gewaschen und mit 20 µl Probe (Startmolekül mit dem hybridisierten Biotin-markiertem Primer oder die Negativkontrolle mit dem nicht zirkularisierten Oligonukleotid und dem Biotin-markiertem Primer) für 15 Minuten bei 350 rpm auf dem Thermomixer bei 21 °C inkubiert. Danach wurde die Lösung von den *Beads* abgenommen und dreimal mit 1x B&W-Puffer gewaschen.

- **Blockierung**

Um das freie Streptavidin auf der Oberfläche zu blockieren wurden *Beads* nach der Bindung in 20 µl 10 µM Biotin-Lösung resuspendiert und für 15 Minuten bei 350 rpm auf dem Thermomixer bei 21 °C inkubiert. Danach wurde die Lösung von den *Beads* abgenommen und dreimal mit 1x B&W-Puffer gewaschen.

- **RCA**

Die *Beads* mit den immobilisierten Oligonukleotiden, an welche die Startmoleküle gebunden waren, wurden in einem 36 µl-RCA-Reaktionsansatz (siehe 2.2.5) bei 30 °C und 350 rpm auf dem Thermomixer inkubiert. Je 12 µl Probenahme erfolgte zu verschiedenen Zeiten der RCA (siehe 3.3.2), und durch die Zugabe von 50 µl Stopplösung wurde die RCA gestoppt. Danach wurden die *Beads* zweimal in 3,5x SSC-Puffer gewaschen.

- **Nachweis des RCPs**

Die RCA hatte ein RCP synthetisiert, welches über den Primer an die Oberfläche der *Beads* gekoppelt war. Um dieses Abzulösen wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Dafür wurden die *Beads* in 20 µl 3,5x SSC-Puffer mit 100 pmol Oligonukleotid G für 15 Minuten bei 75 °C inkubiert und 2 Stunden bei Raumtemperatur zum Hybridisieren des Oligonukleotides an das RCP inkubiert. Dadurch wurde die doppelsträngige DNS-Erkennungssequenz 5'-CTCC-3' für das Restriktionsenzym *MnlI* generiert, was zu einem Schnitt nach 7 Nukleotiden in 3'-Richtung führte. Danach wurde die Lösung abgenommen und die *Beads* in 2x SSC-Puffer und in 0,2x SSC-Puffer gewaschen. Die *Beads* wurden mit 10 Units des Restriktionsenzym *MnlI*, 40 µg BSA, 2 µl 10x NEB2-Puffer auf einen 20 µl-Ansatz mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt und für eine Stunde bei 37 °C und 350 rpm auf

dem Thermomixer inkubiert. Danach wurde der Ansatz auf 75°C für 15 Minuten erwärmt um den Restriktionsverdau zu beenden. Der Überstand der *Beads* wurde abgenommen und auf einem Gel aufgetragen (siehe 2.2.3).

2.2.8 DNAzyme

DNAzyme sind katalytisch aktive Desoxyribonukleinsäuresequenzen. Diese guaninreichen Sequenzen formen bei Anwesenheit Kalium einen G-Quadruplex, in den Hemin interkalieren kann und erlangen damit eine Peroxidase-Aktivität. Die Peroxidase-Aktivität wurde mit den Substraten ABTS und Amplex Red gemessen.

▪ Konformation

Das Ausbilden des katalytisch aktiven DNS-Komplexes wird als Konformation bezeichnet. Dafür wurden die DNAzymsequenz bei 95°C für 9 Minuten inkubiert und im folgenden Schritt auf 21°C heruntergekühlt. Das gleiche Probenvolumen an 2x Konformationspuffer mit Hemin wurde in die Lösung gegeben. Für alle Experimente wurde ein DNAzym zu Hemin Verhältnis von 1:2 gewählt, wenn es nicht anders erwähnt wird. Die Lösung wurde für 3 Stunden bei 21°C inkubiert, um die Konformation der DNAzyme zu ermöglichen.

▪ HRP

Das Lyophilisat der HRP (44,2 mg) wurde in 4994,6 µl bidestilliertem Wasser durch Inkubation für 20 Minuten bei 200 rpm auf dem Schüttler bei Raumtemperatur gelöst. Damit lag eine Konzentration von 1 Unit / µl vor. Diese HRP-Stocklösung wurde für die ABTS-Ansätze in bidestilliertem Wasser verdünnt und für die Amplex Red-Ansätze in Reaktionspuffer.

▪ ABTS

Um eine 9 mM ABTS-Lösung herzustellen, wurden 10 mg ABTS in 50 mM Phosphat-Citrat-Puffer gelöst. Dieses Substrat wurde immer frisch am Tag der Messung angesetzt. Für das sofortige Auslesen wurden 1 µl Probe mit 49 µl 9 mM ABTS mit 0,06 % H₂O₂ in eine 96er Mikrotiterplatte gegeben. Die Messung erfolgte über 30 Minuten alle 20 Sekunden bei 405 nm am Spektralphotometer Spectra Max 250 (Molecular Devices).

▪ Amplex Red

Die Amplex Red-Reaktionslösung enthielt 24 µl Arbeitslösung und 25 µl 8 µM H₂O₂. Zu dieser 49 µl Amplex Red-Reaktionslösung wurde 1 µl der Probe in einer 96er Mikrotiterplatte gegeben und wurde mit PCR-Film luftdicht verschlossen. Nach

30 Minuten bei 21 °C im Dunkeln erfolgte das Auslesen des Fluoreszenzfarbstoffes mit dem FLA-5100 (FUJIFILM) bei λ_{abs} 550 nm und λ_{em} 570 nm.

▪ Hotpot-Ansatz

Das Startmaterial bestehend, aus dem Startmolekül und dem hybridisierten Oligonukleotid, wurde zu 35 μl 2x Konformationspuffer mit 25 μM Hemin gegeben, gefolgt von einem 70 μl RCA-Reaktionsansatz (siehe 2.2.5), 3,5 μl 1 mM Amplex Red und 1,4 μl 200 μM H_2O_2 . Der Ansatz wurde mit bidestilliertem Wasser auf 70 μl aufgefüllt. Die Ansätze wurden in einer 96er Mikrotiterplatte mit PCR-Film luftdicht verschlossen und die Fluoreszenzsignale unmittelbar mit dem FLA-5100 (FUJIFILM) bei einer Absorptionswellenlänge von 550 nm und einer Emission von 570 nm über die Zeit detektiert (siehe Ergebnisse). Je nach Größe der einzulesenden Fläche unterschied sich die Messhäufigkeit pro Experiment.

2.2.9 Miniaturisierung

Für die vorgestellten Plattformen zum Miniaturisieren der RCA-Ansätze wurde der Dispensierroboter sciFLEXARRAYER S5 (Scienion) verwendet. Die Probenabgabe basierte auf einem inversen Piezoeffekt. Dabei führt eine spezifische Spannung an einem Piezokristall in der Glasspritze dazu, dass die Probe in einem definierten Volumen von ~ 300 pl abgegeben wird. Alle Proben wurden von einer 384er Mikrotiterplatte aufgenommen und auf die jeweilige miniaturisierte Plattform gebracht. Das Dispensieren erfolgte immer bei 21 °C. Das Probenvolumen in der Spritze war mindestens 1 μl mehr als das maximal abgegebene Volumen, da die Probe im direkten Kontakt zur Systemflüssigkeit (bidestilliertem Wasser) stand. Zwischen den Aufnahmeschritten der Probe in die Spritze wurde ein spezielles Waschprotokoll entwickelt, welches eine Kontamination zwischen den Proben vermeiden sollte. Es wurden maximal 8 μl der Probe aufgenommen. Nach der Abgabe der Probe wurde die Spritze zunächst mit 50 μl Systemflüssigkeit durchgespült. Zusätzlich wurde die Spritze durch Aufnahme von 15 μl Oligo-Wasch-Puffer gespült und mit Ultraschall behandelt. Erst nach einem erneuten Waschen der Spritze mit Systemflüssigkeit wurde die nächste Probe aufgenommen. Alle weiteren Veränderungen am Protokoll sind im Ergebnisteil beschrieben.

2.2.9.1 Aldehydarrays

Zur Durchführung einer an eine Oberfläche gekoppelten RCA wurden Objektträger mit einer Beschichtung aus Aldehydgruppen verwendet, so genannte Arrays. Über eine

Aminogruppe konnte eine gerichtete Immobilisierung der Proben an die Oberfläche erfolgen. Durch Kombination mit dem Dispensierroboter war es möglich, auf dem ganzen Array 4.800 Proben parallel zu analysieren.

▪ **Immobilisierung**

Oligonukleotide mit einer Aminogruppe wurden zur Immobilisierung auf den Aldehydarrays gespottet, um die RCA auf der Oberfläche des Arrays durchführen zu können. Alle Proben wurden mit einem 3xSSC-Puffer angesetzt, und nach dem Befüllen der 384er Mikrotiterplatte wurde diese für 5 Minuten bei einer Drehzahl von 3.000 rpm in der Laborzentrifuge (SIGMA) zentrifugiert, um eine luftblasenfreie Lösung zum Dispensieren zu erhalten. Nach dem Einsetzen der 384er Platte in eine auf 18 °C gekühlte Halterung wurde der Spotvorgang gestartet. Dabei wurde eine unterschiedliche Anzahl an Tropfen pro Position abgegeben. Nach dem Aufbringen der Oligonukleotide auf das Aldehydarray wurden diese zur Immobilisierung der Oligonukleotide für 10 Minuten bei 75 °C inkubiert. Unter dem Abzug wurde die Oberfläche des Array in einer gläsernen Waschkammer für 5 Minuten mit Blockierlösung behandelt, um freie Aldehydgruppen abzureagieren. Das Array wurden danach viermal gründlich durch Tauchen in bidestilliertem Wasser gewaschen. In der Laborzentrifuge wurden das Array bei 500 rpm für 5 Minuten bei 21 °C von Flüssigkeitsresten befreit.

▪ **RCA**

Zur Ausführung der RCA wurden Gasket Slides (Agilent) verwendet. Diese Slides passen genau auf das Array und haben mehrere Gummilippen auf der Oberfläche. Durch das Zusammendrücken von Array und Slide entsteht ein Hohlraum, der als Reaktionsraum verwendet werden kann. Bei dem verwendeten 8er Gasket Slides wurde ein 36 µl RCA-Reaktionsansatz (siehe 2.2.5) ohne Startmolekül mit hybridisiertem Oligonukleotid in die Kammer des Slides pipettiert, das Array mit den immobilisierten Proben darauf gepresst und in einer Extravorrichtung mit Schraubklemme fixiert (Abb. 2.2.9.1). Das Array ist in Felder aufgeteilt, in denen die Oligonukleotide immobilisiert werden, um dann passgenau in den Kammern des Gaskets Slides inkubiert zu werden. Pro 8er Felder auf dem Array konnten 600 Proben getestet werden. Der verschlossene Reaktionsraum ermöglichte, das Array auf einem Rotor für 40 Minuten bei 30 °C im Inkubator mit 6 rpm zirkulieren zu lassen. Dadurch sollte eine Umgebung für die RCA geschaffen werden, bei der kein Mangel an Substrat auftreten sollte. Durch das Rotieren der Lösung wird diese durchmischt und damit die Brown'sche Molekularbewegung unterstützt, durch welche die Substrate zur Oberfläche gelangen können.

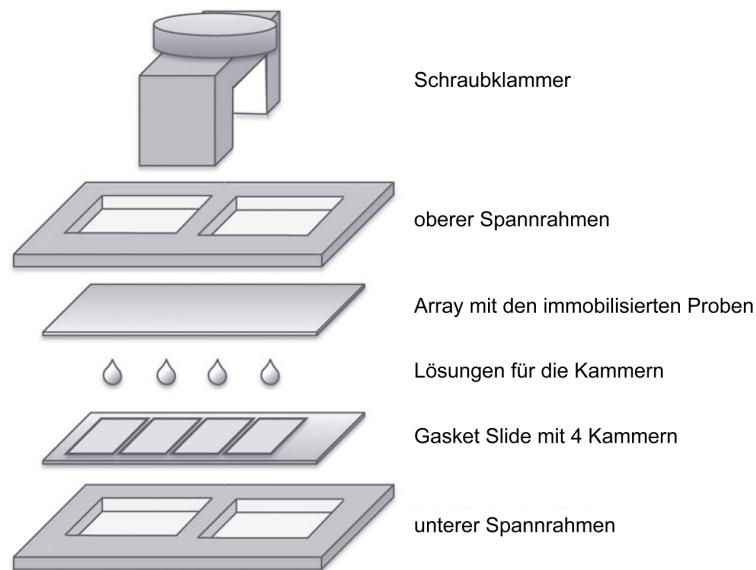


Abbildung 2.2.9.1 | Schema des Slide-basierten Kammernsystems. Die Gasket Slides haben auf der Oberfläche Gummilippen (4 oder 8) in welche Lösungen pipettiert werden können. Die Volumina der Hohlräume, die Kammern der 4er Gaskets betragen maximal je 100 μl und die der 8er Gaskets je 40 μl . Das Array mit den immobilisierten Proben wurde auf das Gasket Slide gelegt und durch die Schraubklammer des Spannrahmens wurde die Gummi-Lippe fest an das Array gedrückt. Dabei entstand über den Proben ein geschlossener Flüssigkeitsraum (von Berger & Bulyk et al. 2008 modifizierte Abbildung⁵²).

Danach wurde das Aldehydarray in einer Waschkammer zweimal mit RCA-Stopplösung⁵⁰ und einmal in 1x SSC-Puffer gewaschen. Das Array wurde bei 500 rpm für 5 Minuten bei 21 °C in der Laborzentrifuge von Flüssigkeitsresten befreit.

▪ Nachweis des RCPs

In die Reaktionskammern des Slides wurden 100 pmol Oligonukleotid F, welches als Sonde des RCPs eingesetzt wurde, in 36 μl Hybridisierungslösung gegeben, wobei das Oligonukleotid unmittelbar vor der Verwendung für 15 Minuten auf 75 °C aufgewärmt worden war. Alternativ wurden 5 μg Cy3-Streptavidin in 36 μl 1x PBS-Puffer verwendet, um den Einbau Biotin-markierter Nukleotide ins RCP nachzuweisen. Das Aldehydarray wurde auf den Slides fixiert und bei 37 °C für eine Stunde im Inkubator mit 6 rpm zirkuliert. Das Array wurde in der Waschkammer zweimal mit 6x SSC-Puffer, zweimal mit 2x SSC-Puffer und einmal mit 1x SSC-Puffer gewaschen. Die Arrays wurden bei 500 rpm für 5 Minuten bei 21 °C in der Laborzentrifuge von Flüssigkeitsresten befreit.

▪ Detektion

Die Aldehydarrays wurden am 428TM Array Scanner (Affymetrix) ausgelesen. Dabei wurden je nach Fluoreszenzfarbstoff verschiedene Wellenlängen verwendet. Für den

Farbstoff Cy3 erfolgte die Absorption des Lichtes bei 550 nm und die Emission bei 570 nm und für den Farbstoff Cy5 erfolgte die Absorption bei 650 nm und die Emission bei 670 nm.

2.2.9.2 Nano-Well-Chips

Zur Miniaturisierung der Versuchsansätze in Lösung, welche keine Immobilisierung erforderlich machen sollten, wurde ein Nano-Well-Chip⁵³ verwendet. Der verwendete Chip aus Polypropylen hatte auf einer Fläche von 40 mm x 40 mm 1.024 Kavitäten, welche abgeschlossene Reaktionsräume darstellten (Abb. 2.2.8.2). Für diese Arbeit wurden Chips mit einem konisch zulaufenden Boden verwendet, die eine maximale Beladung von 150 nl hatten (persönliche Mitteilung von Herr Dr. A. Dahl, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin).

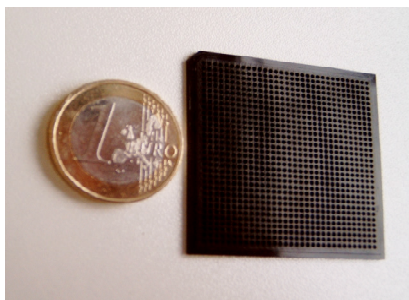


Abbildung 2.2.9.2 | Nano-Well-Chip. In dieser Abbildung wird der schwarze Chip aus Polypropylen neben einer Ein-Euromünze dargestellt. Der Chip war nur unwesentlich größer als eine Ein-Euromünze und hatte 1.024 Kavitäten zum parallelen Ausmessen der Proben. (Abbildung verändert aus der Diplomarbeit von Thomas Bergmann, MPI für molekulare Genetik, Berlin)

Es wurde die Fluoreszenzintensität der Amplex Red-Proben gemessen. Für die Aufzeichnung der Fluoreszenzsignale im Nano-Well-Chip wurde ein im Hause entwickeltes μ PCR-Chip-Auslesegerät verwendet (λ_{abs} 520 nm, λ_{em} 570 nm). Bei diesem Gerät werden die Kavitäten des Chips von einem Laserstrahl abgetastet, wobei die Intensität der emittierten Fluoreszenzstrahlung detektiert wird. Über eine am MPI für molekulare Genetik in Berlin entwickelte Auslesesoftware, basierend auf LabVIEW, wurde die Signalintensität jeder Kavität ermittelt. Das Auslesegerät und die dazugehörige Software wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Herrn Thomas Bergmann (Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin) erarbeitet. Veränderungen des Protokolls sind unter Ergebnisse aufgeführt.

▪ Beladen des Chips

Aus einer 384er Mikrotiterplatte wurden die Proben in die Kavitäten des Nano-Well-Chip mit dem Dispensierroboter abgegeben. Direkt nach der Abgabe der Proben in die Nano-Wells wurden diese mit PCR-Film verschlossen. Bei manchen Experimenten

wurde während des Dispensierens die Halterung des Nano-Well-Chips auf 17°C gekühlt (siehe Ergebnisse).

- **DNAzyme**

20 µl Amplex Red-Reaktionslösung wurden in eine 384er Mikrotiterplatte transferiert. Die Reaktionslösung enthielt 0,4 µl konformierte DNAzymprobe, 9,6 µl Arbeitslösung und 10 µl 8 µM H₂O₂. Die Proben wurden wie beschrieben dispensiert.

- **RCP in Nano-Well-Chips**

Der 70 µl RCA-Reaktionsansatz mit Startmolekül und hybridisierter Analyt-DNS wurde bei 30°C inkubiert, nach 0 und 30 Minuten wurden jeweils 22 µl Proben entnommen. Die Proben wurden sofort bei 75°C für 15 Minuten inkubiert, um die Phi29-Polymerase-Reaktion zu stoppen. 11 µl der RCA-Probe wurden mit 100 pmol Oligonukleotid S versetzt, um eine doppelsträngige *Ddel*-Restriktionsschnittstelle zu kreieren. Das Restriktionsenzym *Ddel* hat die Erkennungssequenz der Nukleotide 5'-CTGAG-3' im RCP und schneidet hinter dem Cytosin. Die Hybridisierung erfolgte nach dem Erwärmen der Probe auf 95°C für 20 Minuten, gefolgt von einer Inkubation von 3 Stunden bei 21°C. Die hybridisierte Probe wurde mit 10 Units des Restriktionsenzym *Ddel* in 1x NEB3-Puffer in einem 15 µl-Ansatz für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde bei einem Temperaturschritt von 15 Minuten bei 75°C inaktiviert. Die Konformation erfolgte mit 25 µM Hemin, da die Menge an DNAzymen im RCP unbekannt war. 0,8 µl der Probe wurden in einer 384er Mikrotiterplatte mit 19,2 µl Arbeitslösung und 20 µl 8 µM H₂O₂ gemischt und in die Nano-Well-Chips dispensiert und ausgelesen.

- **Hotpot-Ansatz**

Von dem Startmaterial der unterschiedlich konzentrierten Startmoleküle mit den hybridisierten Oligonukleotiden wurden 2,8 µl zu 35 µl 2x Konformationspuffer mit 25 µM Hemin gegeben. Gefolgt von der Zugabe von dem 70 µl RCA-Reaktionsansatz (siehe 2.2.5), 3,5 µl 1 mM Amplex Red und 1,4 µl 200 µM H₂O₂ wurde der Ansatz dann mit bidestilliertem Wasser auf 70 µl aufgefüllt. Nach dem Mischen wurde dieser in eine 384er Mikrotiterplatte transferiert und mittels Dispensierroboter in die Nano-Wells abgegeben und der Chip ausgelesen. Zur weiteren Miniaturisierung wurde der 384er Probenansatz von 70 µl auf 35 µl reduziert. Hierfür wurden 1,4 µl des Startmoleküls mit den hybridisierten Oligonukleotiden zu 17,5 µl 2x Konformationspuffer mit 25 µM Hemin gegeben. Gefolgt von der Zugabe von dem 36 µl RCA-Reaktionsansatz (siehe 2.2.5), 1,75 µl 1 mM Amplex Red und 0,7 µl 200 µM H₂O₂ und dem Auffüllen des Ansatzes auf 36 µl mit bidestilliertem Wasser, wurde die

Lösung in eine 384er Mikrotiterplatte transferiert, mittels Dispensierroboter in die Nano-Wells abgegeben und der Chip ausgelesen.

2.2.10 Berechnungen

▪ Auswertung der Daten

Die analysierten Proben wurden in technischen Triplikaten gemessen, Abweichungen davon werden im Text extra erwähnt. Der Mittelwert und die einfache Standardabweichung der Datensätze wurde berechnet.

Durch die Subtraktion der Nachweisgrenze (NG) von den Mittelwerten wurden die Probendaten normalisiert. Die Nachweisgrenze setzt sich aus den Signalen des jeweiligen Hintergrundes, der Negativkontrolle (NK) über die folgende Berechnung zusammen: $NG = (3 \times \text{Standardabweichung der NK}) + \text{Mittelwert der NK}$

Über eine Positivkontrolle in dem Versuch wurden die Daten normiert, um sie mit einem anderen Versuch vergleichen zu können. Dafür wurde der Mittelwert X der Positivkontrolle auf den Wert 1 gesetzt und die Werte der Proben Y entsprechend umgerechnet zu Z, dem normierten Wert der Prob: $Z = Y / X$

▪ HRP

Die HRP hat eine Molekularmasse von 44 Kilodalton, das sind $7,3 \times 10^{-14} \mu\text{g}$ für ein Molekül. Ein Unit des Proteins entspricht $8,85 \mu\text{g}$, damit liegen in der Stocklösung $1,2 \times 10^{14}$ Moleküle pro μl vor.

▪ Oberflächenbeladungsdichte der immobilisierten Oligonukleotide des Arrays

Ein Nukleotid hat durchschnittlich einen Durchmesser von $0,34 \text{ nm}^2$, da bei einer Windung der B-Form der Doppelhelix der DNS 10 Nukleotide pro Strang einen Anstieg um $3,4 \text{ nm}$ ausmachen. Daher wurde dieser theoretische Wert von $0,34 \text{ nm}$ pro Nukleotid verwendet zur Berechnung der Beladungskapazität. Nimmt man eine Kreisform an, ergibt sich über die Kreisformel ($\pi \cdot r^2$) eine Fläche von $0,09 \text{ nm}^2$ bzw. $9 \times 10^{-14} \text{ mm}^2$. Über die jeweilige Größe der Positionen der Probe ließ sich die maximale Beladung über die idealisierte Größe von $9 \times 10^{-14} \text{ mm}^2$ pro Nukleotid mit einer Aminogruppe berechnen.

▪ Phi29-Polymerase

Die Phi29-Polymerase hat eine Molekularmasse von 67 Kilodalton (Herstellerangabe), was einer Masse von $1,1 \times 10^{-10} \text{ ng}$ für ein Molekül entspricht. Die verwendete Phi29-Polymerase lag in einer Konzentration von 10 ng pro Unit vor. Damit liegen pro Unit $9,1 \times 10^{11}$ Moleküle Phi29-Polymerase vor.

2.3 Firmen

Name	Adresse
Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG Life Sciences & Chemical Analysis	Hewlett-Packard-Str. 8, D-76337 Waldbronn
Affymetrix	3420 Central Expressway, Santa Clara, CA 95051, USA
ABgene	Blenheim Road Epsom, KT19 9AP, UK
Bio-Rad Laboratories GmbH	Heidemannstrasse 164, 80939 München
CARL ROTH GmbH & Co KG	Schoemperlenstraße 1-5, 76185 Karlsruhe
CEL Associates Inc.	www.cel-1.com , USA
Eppendorf AG	Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg
ELMI Ltd.	21-136 Aizkraukles Str., Riga, LV-1006, Latvia
GE Healthcare Europe GmbH	Oskar-Schlemmer-Str.11, 80807 München
Fermentas GmbH	Opelstrasse 9, 68789 St. Leon-Rot
Invitrogen GmbH	Frankfurter Straße 129B, 64293 Darmstadt
Merck KGaA	Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt
Millipore GmbH	Am Kronberger Hang 5, 65824 Schwalbach
Molecular Devices USA	1311 Orleans Drive, Sunnyvale, CA 94089-1136, USA
Molekula Ltd.	Große Drakenburgerstraße. 93, 31582 Nienburg
NEB GmbH	Brüningstrasse 50, Geb. B852, 65926 Frankfurt
neoLab Migge	Rischerstr. 7-9, 69123 Heidelberg
Laborbedarf-Vertriebs GmbH	
Scienion AG	Volmerstraße 7b, 12489 Berlin
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Eschenstrasse 5, 82024 Taufkirchen
PEQLAB Biotechnologie GmbH	Carl-Thiersch-Str. 2b, 91052 Erlangen
Thermo Scientific	Duisburger Str. 81, 46049 Oberhausen
Tip MolBIol Syntheselabor GmbH	Eresburgstr. 22-23, 12103 Berlin

USB corp. 26111 Miles Road, Cleveland, Ohio 44128, USA

VWR International GmbH Hilpertstraße 20a64295 Darmstadt

Whatman GmbH Hahnstraße 3, 37586 Dassel

3. Ergebnisse

3.1 Zirkularisieren

Die Voraussetzung für die *Rolling Circle Amplification* (RCA) war ein zirkuläres Oligonukleotid, das Startmolekül. Zum Zirkularisieren eines definierten Oligonukleotides wurde ein enzymatischer Ansatz gewählt, bei dem ein 80 Basen langes Oligonukleotid A (Tabelle 2.1.4) zunächst am 3'-Ende phosphoryliert und dann ligiert worden war (siehe 2.2.2). Um die Enden in ausreichende Nähe zueinander zu bringen, wurde nach der Phosphorylierung ein Primer, das Oligonukleotid B, an das phosphorylierte Oligonukleotid A hybridisiert (siehe 2.2.1). Der Primer vereint die beiden Enden des Oligonukleotids A auf einem Strang (Abb. 3.1.1).

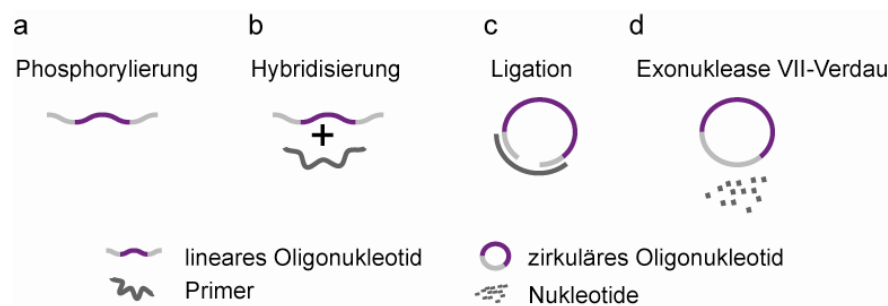


Abbildung 3.1.1 | Prinzip der Startmolekülsynthese. (a) Im ersten Schritt wurde ein lineares Oligonukleotid am 3'-Ende phosphoryliert. (b) Nach der erfolgten Phosphorylierung wurde ein Primer an die Enden des linearen Oligonukleotids hybridisiert. (c) Die direkte Nähe der offenen Enden ermöglichte eine Ligation des linearen Oligonukleotids zu einem zirkulären Oligonukleotid, des Startmoleküls. (d) Die Primer und das lineare Oligonukleotide wurden aus dem Ansatz durch einen ExonukleaseVII-Verdau entfernt.

Die hybridisierten Stränge ermöglichten eine stranginterne Ligation des linearen Oligonukleotids. Dieses generierte zirkuläre Oligonukleotid wurde als Startmolekül bezeichnet. Alle linearen Rückstände in diesem Ansatz wurden vor dem Einsatz in der RCA mittels ExonukleaseVII-Verdau entfernt. Die ExonukleaseVII baut Nucleinsäuren sowohl vom 3'-Ende als auch vom 5'-Ende ab. Nach dem Verdau blieben nur zirkuläre DNS-Moleküle übrig. Ein Ansatz aus zirkulären Oligonukleotiden A wurde hergestellt.

Die Sequenz des zu zirkularisierenden Oligonukleotids wurde zuvor mit Hilfe des IDT Oligoanalyzer Software auf mögliche theoretische sekundäre Strukturen untersucht. Durch diese Software wurden theoretische Werte für die Gibbssche freie Enthalpie (ΔG) verschiedener Konfigurationen des Oligonukleotides errechnet. Anhand der Ergebnisse wurde die Sequenz durch den Austausch von Nucleotiden modifiziert,

so dass ein möglichst kleiner Wert für ΔG resultierte. Die bevorzugte Sekundärstruktur des optimierten Oligonukleotides A, welche auftreten sollte (Abb. 3.1.2) wies keine Haarnadelstrukturen innerhalb der Primerbindestelle des Oligonukleotides A auf.

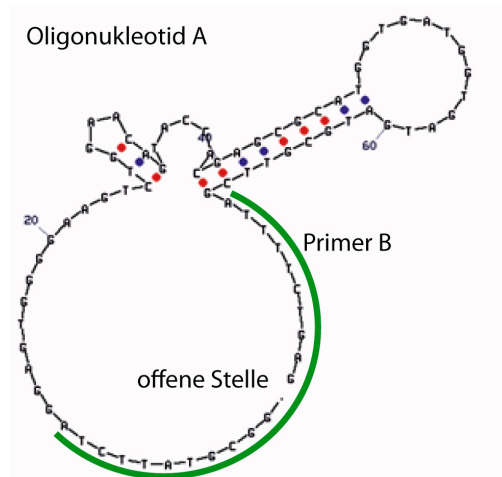


Abbildung 3.1.2 | Strukturvorhersage des Oligonukleotides A. Auf dem Oligonukleotid A lag innerhalb der Bindestelle des Primers B (grün) zur Ligation keine Haarnadelstruktur mit einer günstigen freien Enthalpie. Die gezeigte Sekundärstruktur wurde mit der IDT Oligoanalyzer Software errechnet.

Zur Überprüfung der Zirkularisierung des Oligonukleotides A wurden die Ansätze elektrophoretisch in 8 %igen Acrylamid/Bisacrylamid-Gelen oder 2,5 %igen Agarose-Gelen (siehe 2.2.3) aufgetrennt. Dabei wurden die Ligationsansätze vor und nach dem Verdau zusammen aufgetragen, um sie miteinander zu vergleichen. Jeder Zirkularisierung zum Erlangen der Startmoleküle wurde dieser Überprüfung unterzogen. An dem folgenden Beispiel (Abb. 3.1.3) eines Geles wurde das Ergebnis der Synthese des Startmoleküls stellvertretend für alle verwendeten Experimente beschrieben. Die im Gel aufgetragene Probe der Ligation wies mehreren Banden auf, wobei die unterste Bande zu dem linearen Oligonukleotid A gehörte. Durch die Schließung des offenen Stranges veränderte sich das Laufverhalten der zirkulären Oligonukleotide und das Wandern durch die Poren des Gels wurde erschwert. Nach dem ExonukleaseVII-Verdau blieben nur die geschlossenen Oligonukleotide übrig, und die Bande des linearen Oligonukleotides A war nicht mehr zu sehen. Das Bandenmuster nach dem ExonukleaseVII-Verdau ließ sich auf drei Banden der Ligationsprobe übertragen. Bei den drei über dem linearen Oligonukleotid laufenden Banden handelte es sich um zirkuläre Monomere, Dimere und Trimere des Oligonukleotides A. Es hatten sich Konstrukte aus jeweils zwei und drei Oligonukleotiden verbunden, welche zu einer Ligation zwischen zwei oder drei Oligonukleotiden A geführt hatten, so dass die Dimere und Trimere entstanden. Mit diesem Gemisch aus Startmolekülen wurden die folgenden RCA-Reaktionen durchgeführt.

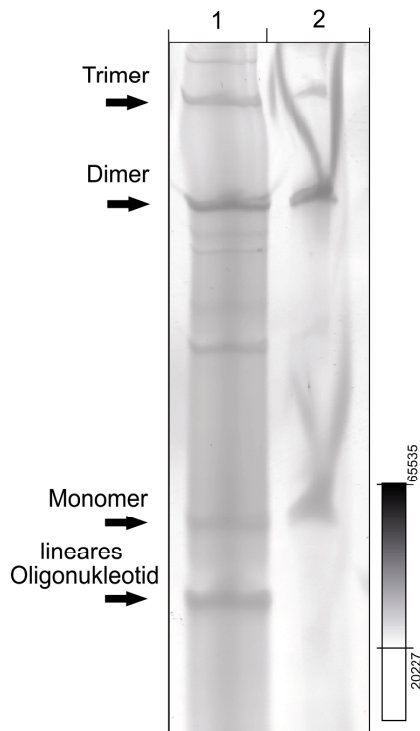


Abbildung 3.1.3 | Kontrolle des Startmoleküls. Ein 8%iges Acrylamid/Bisacrylamid-Gel wurde nach der Elektrophorese mit SYBR Green I gefärbt. In der ersten Spalte wurde der Ansatz nach der Ligation mit 12,5 pmol eingesetztem Oligonukleotid A und in der zweiten Spalte wurde der gleiche Ansatz nach dem Verdau mit der ExonukleaseVII mit 25 pmol eingesetztem Oligonukleotid A aufgetragen. Durch den ExonukleaseVII-Verdau des Ligationsansatzes sollten nur zirkularisierte Oligonukleotide übrig bleiben, da die linearen Oligonukleotide in einzelne Nukleotide zerschnitten wurden. Die Auftrennung der Proben im Gel zeigte, dass nach dem ExonukleaseVII-Verdau drei Banden zurück blieben. Bei den Banden handelte es sich vermutlich um Trimere, Dimere und Monomere des zirkularisierten Oligonukleotides A.

Für die Synthese des komplementären Stranges während der RCA sollte es keinen Unterschied machen, ob ein Monomer, Dimer oder Trimer für den Ansatz verwendet wurde. Da durch die Strangverdrängungsaktivität der Phi29-Polymerase ein mögliches zweites oder drittes gebundenes Oligonukleotid B von dem Startmolekül verdrängt werden kann.

3.2 Rolling Circle Amplification in Lösung

Mit dem standardisierten Protokoll zur Synthese eines zirkulären Oligonukleotides (siehe 2.2.2), dem Startmolekül wurde ein Protokoll zur Durchführung der RCA in Lösung etabliert (siehe 2.2.5). Die RCA erfolgte isotherm und wurde, wenn nicht anders erwähnt, bei 30 °C durchgeführt. Während der RCA entstand ein Produkt aus mehreren verbundenen Kopien des komplementären Startmoleküls, das *Rolling Circle Product* (RCP). Das Prinzip der RCA wird in der Abbildung 3.2.1 dargestellt. Die Phi29-Polymerase benötigt zum Start der RCA einen doppelsträngigen Startpunkt auf dem Startmolekül (Abb. 3.2.1 a). Das Startmolekül war ein einzelsträngiger zirkulärer Strang an den ein Primer B hybridisiert worden war (Abb. 3.2.1 b). Die Polymerase ging an dem Startmolekül als Vorlage für die Synthese entlang (Abb. 3.2.1 c). Durch die Strangverdrängungsaktivität der Phi29-Polymerase wurde nach Erreichen des 5'-Endes des Primers der Strang verdrängt und die Synthese des RCPs entlang des Startmoleküls wurde fortgesetzt (Abb. 3.2.1 d).

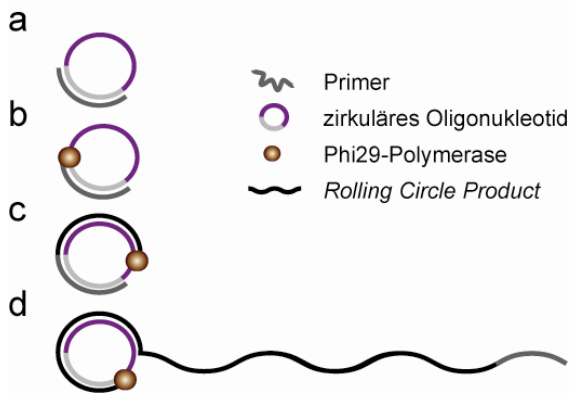


Abbildung 3.2.1 | Prinzip der RCA. (a) An das zirkuläre Startmolekül wurde der Primer B hybridisiert und (b) dieser doppelsträngige Bereich diente der Phi29-Polymerase als Startpunkt. (c) Die Phi29-Polymerase synthetisierte kontinuierlich einen Strang, (d) das *Rolling Circle Product* durch die Strangverdrängungsaktivität.

Dadurch entstand in einer halben Stunde ein bis zu 30.000 Nukleotide langes RCP²². Auf Grund der Länge des RCPs von mehreren Kilobasen, ließ es sich schwer im Acrylamid/Bisacrylamid-Gel auftrennen^{22, 23, 55, 56}. Das RCP nach der Synthese nicht in Form eines linearen Stranges vor, sondern es hatte sich eine komplexe Sekundärstruktur ausgebildet. Der Unterschied zwischen der RCA-Probe bei Start der Reaktion und nach 40 Minuten war deutlich durch eine elektrophoretische Auftrennung zu erkennen (Abb. 3.2.2).

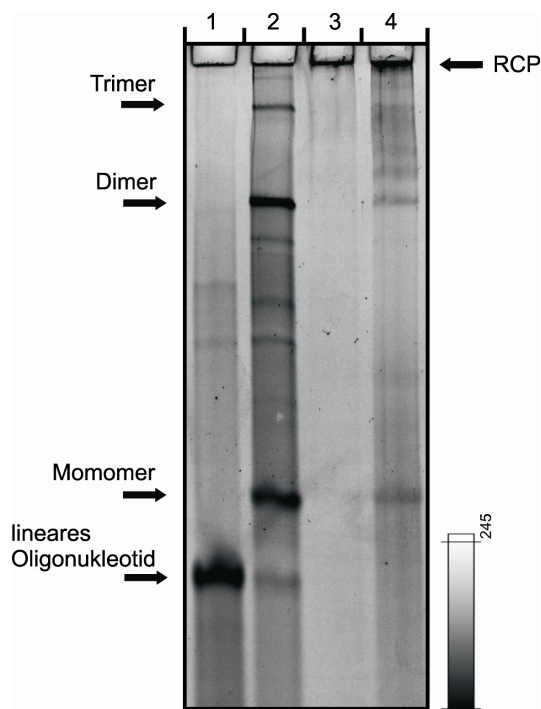


Abbildung 3.2.2 | SYBR Green I gefärbtes 8% Acrylamid/Bisacrylamid-Gel der RCA-Proben. In der ersten Spur wurden 10 pmol des linearen Oligonukleotides A und in der zweiten Spur wurden 10 pmol des zirkularisierten Oligonukleotides A, welches für die RCA eingesetzt wurde aufgetragen. In den folgenden Spur wurde die RCA-Probe nach 0 Minuten und nach 40 Minuten RCA Inkubationszeit aufgetrennt. Je 2 µl von dem 36 µl RCA-Ansatz mit 20 pmol zirkularisiertem Oligonukleotid A wurden aufgetragen. Nach 40 Minuten Inkubation der RCA wurde eine hochmolekulare Bande im Gel detektiert. Zusätzlich tritt eine Bande auf der Höhe des zirkularisierten Oligonukleotides in Erscheinung.

Nach 40 Minuten RCA konnte ein RCP als deutliche breite Bande in dem gefärbten Gel identifiziert werden, da sich diese Bande bei der Probe nach 0 Minuten RCA nicht im Gel zeigte. Die weiteren Banden, welche in der Probe nach 40 Minuten RCA zu sehen waren, sind kürzere RCPs, welche auf Grund einer abgebrochenen Synthese durch die

Phi29-Polymerase entstanden. Die Phi29-Polymerase diffundiert durchschnittlich nach 30 Minuten vom Strang und bricht die RCA ab, jedoch kann dies auch zu einem früheren Zeitpunkt passieren. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass es mit dem etablierten Protokoll zur Herstellung eines Startmoleküls eine erfolgreiche RCA möglich war.

3.3 Dot Blot

Nach der erfolgreichen Etablierung der Protokolle zur Herstellung eines Startmoleküls und der Amplifikation mittels RCA wurde das Produkt näher analysiert.

Das Ziel dieser Arbeit war es, basierend auf der RCA verschiedene Assays zu entwickeln und ihre Vor- und Nachteile zu analysieren. Dafür reicht eine gelbasierte Detektion des RCPs nicht aus, da die Gele keinen Aufschluss über die Menge an RCP geben und keine Quantifizierung möglich ist, da das RCP nur leicht in das Gel hineinläuft und einen Schmier bildet. Daher wurde zunächst ein Ansatz verfolgt, bei dem in der Lösung markierte Nukleotide in das RCP während der Synthese eingebaut werden. Proben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der RCA entnommen und auf einem *Dot Blot* näher analysiert. Die DNS wurde durch UV-Crosslinking an die Oberfläche einer Nylonmembran gebunden und die nicht inkorporierten Nukleotide durch mehrere Waschschriffe in einem SSC-Puffer mit SDS-Lösung entfernt (siehe 2.2.6).

Die Bindungseigenschaften der verschiedenen Markierungen wurden analysiert. Dabei zeigte sich, dass sich Cy3-dUTP und Cy5-DUTP unspezifisch an die Membran binden und deshalb nicht für diesen Ansatz zum Nachweis des RCPs auf dem *Dot Blot* verwendet werden konnten (Ergebnisse nicht gezeigt).

Biotin-markierte Nukleotide eigneten sich viel besser und wurden zum Einbau in das RCP verwendet. Zu verschiedenen Zeitpunkten der RCA wurden Proben genommen und inaktiviert. Alle Proben wurden auf die Membran aufgetragen und nach der Fixierung mittels UV-Einstrahlung mit Cy3-Streptavidin inkubiert. Abbildung 3.3.1 zeigt einen *Dot Blot*.

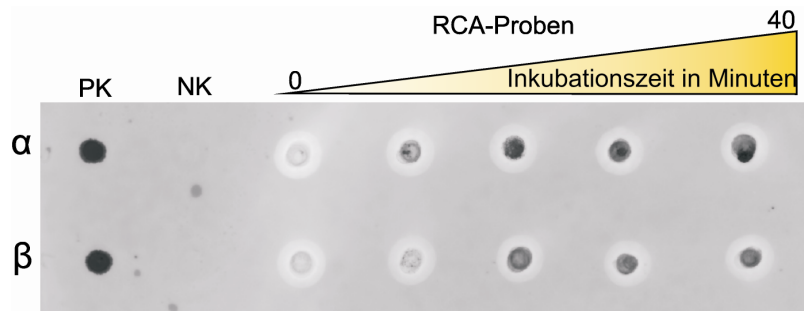


Abbildung 3.3.1 | *Dot Blot* des RCPs. Der Einbau von Biotin-16-dUTP in das amplifizierte RCP wurde über die Zeit von 40 Minuten mittels *Dot Blot* analysiert. 1 μ l Aliquot des 36 μ l RCA-Ansatzes in Lösung nach 0, 10, 20, 30 und 40 Minuten wurden auf eine positiv geladene Nylon-Membran gegeben und mittels UV-Crosslinking an die Oberfläche gebunden. Alle Proben wurden in zwei technischen Replikaten aufgetragen (α , β). Der Blot wurde dann mit Cy3 markiertem Streptavidin inkubiert. Nach dem Waschen des Blots wurde die Intensität der Probensignale bestimmt. Als Positivkontrolle (PK) für die Bindung an die Oberfläche wurde das Oligonukleotid C (siehe Tabelle 2.1.4) verwendet, da es eine Biotinmarkierung am 5'-Ende trägt. Oligonukleotid D (siehe Tabelle 2.1.4) hat keinerlei Markierungen und wurde als Negativkontrolle (NK) aufgetragen. Mit steigender Inkubationszeit nahmen die Fluoreszenz-Signale der RCPs zu. Dies ist ein Indikator für die Menge an eingebautem Biotin-16-dUTP und bestätigt somit den Einbau ins RCP.

Das Biotin-markierte Oligonukleotid C wurde als Positivkontrolle für die Bindung an die Oberfläche und für die Bindung des Cy3-Streptavidin verwendet. Oligonukleotid D wurde als Negativkontrolle für die unspezifische Bindung des Cy3-Streptavidin eingesetzt. Die RCA-Proben wurden nach 0, 10, 20, 30, 40 Minuten Inkubationszeit aufgetragen. Die Proben wurden in technischen Replikaten aufgetragen (A, B). Die Positivkontrolle (PK) zeigte ein starkes Signal während die Negativkontrolle (NK) kein Signal aufwies. Die Signalintensität RCA-Proben nahm mit dem Verlauf der Inkubation entsprechend zu. Das bedeutet, es wurde kontinuierlich markiertes dUTP in das RCP eingebaut. Zur Quantifizierung des Einbaus von markierten Nukleotiden in das RCP wurden die *Dot Blots* mittels AIDA Image Analyser Software ausgewertet. Verdünnungsreihen des einfach Biotin-markierten Oligonukleotides C wurden auf der Oberfläche der Nylon-Membran fixiert, die Fluoreszenzintensität auf jeden Blot bestimmt und eine Kalibrierung vorgenommen, über welche die Menge an detektiertem, markiertem Nukleotid in den RCA-Proben bestimmt werden konnte. Abbildung 3.3.2 zeigt die ermittelte Biotin-16-dUTP Konzentrationen bei 110 pmol (α) und 20 pmol (β) Startmolekül A in einem 36 μ l RCA-Reaktionsansatz mit je 1 nmol Biotin-16-dUTP.

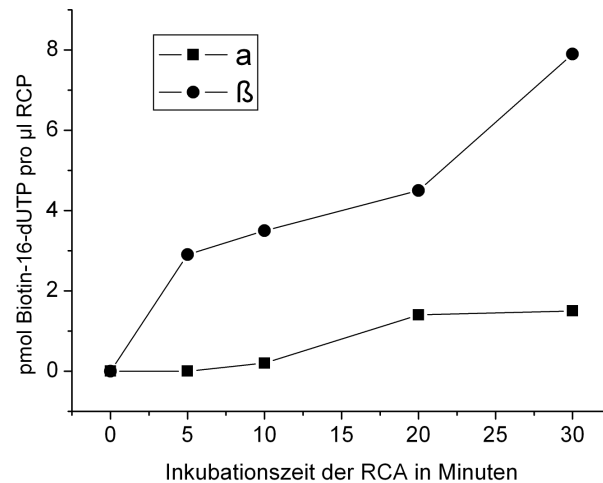


Abbildung 3.3.2 | Einbau von Biotin-16-dUTP. Ansatz α enthielt 110 pmol Startmolekül und Ansatz β 20 pmol Startmolekül und zusätzlich 240 ng T4 gp32 in einem 36 μ l RCA-Reaktionsansatz mit 1 nmol Biotin-16-dUTP. Je 6 μ l RCA-Probe wurden in Lösung nach 0, 5, 10, 20, 30 und 40 Minuten entnommen. 1 μ l der Proben wurde auf den *Dot Blot* gegeben und mittels UV-Crosslinking auf der positiv geladenen Nylon-Membran fixiert. Nach dem Waschen und Inkubieren der Membran mit Cy3-Streptavidin, welche innerhalb des RCPs an die eingebauten Biotin-16-dUTPs gebunden hatten, wurden die Fluoreszenzsignale detektiert. Über die Kalibrationskurve des Oligonukleotid C, der Positivkontrolle, konnte der Einbau an markierten Nucleotiden bestimmt werden.

In dem Ansatz β befanden sich zusätzlich 240 ng T4 gp32. Das T4 gp32 Protein ist ein einzelstrang-DNS-bindendes Protein, welches die Aktivität der Polymerase und damit die Amplifikationseffizienz erhöhen soll⁵⁷. Eine Zunahme des Einbaus von markierten Nucleotiden wurde bei beiden RCA-Ansätzen über die Inkubationszeit ermittelt. Der Ansatz β wies eine höhere Einbaurrate von Biotin-16-UTP auf. Es wurde bereits nach 5 Minuten Inkubationszeit der RCA 3 pmol markiertes dNTP in 1 μ l RCA-Probe ermittelt. Das Mischungsverhältnis von Startmolekül zu Reaktionsansatz ergab bei 0,6 pmol pro μ l (20 pmol im Ansatz) eine höhere Einbaurrate als bei 3 pmol pro μ l (110 pmol im Ansatz). Der Effekt von T4 gp32 auf die Einbaurrate der RCA scheint erheblich zu sein, da 8x mehr Biotin-16-dUTP in den Ansatz β eingebaut worden war als bei dem Ansatz α . Zusätzlich zu den *Dot Blot* Analysen wurden von den selben Proben Aliquote in 8%igen Acrylamid/Bisacrylamid-Gelen aufgetrennt und analysiert. So konnte die RCA mit einer zweiten, Biotin-Streptavidin unabhängigen Methode bestätigt werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

Der Einbau von Biotin-16-dUTP fand dabei in der Anwesenheit von dTTP statt, welches mit dem Nucleotid um den Einbau in das RCP konkurriert. Das Verhältnis des Biotin-16-dUTP zu dem dTTP war 1:200. In dem folgenden Experiment (Abb. 3.3.3)

wurde nur das Biotin-16-dUTP in einem 36 μ l RCA-Reaktionsansatz mit 20 pmol Startmolekül A eingesetzt.

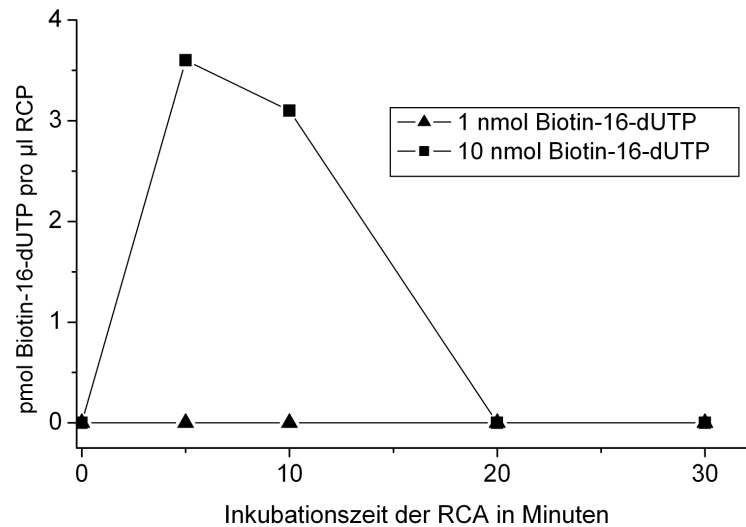


Abbildung 3.3.3 | Biotin-16-dUTP. Dem 36 μ l RCA-Reaktionsansatz wurden 1 oder 10 nmol Biotin-16-dUTP hinzugegeben. dTTP fehlt in den Ansätzen. Je ein 1 μ l der RCA-Proben nach 0, 5, 10, 20 und 30 Minuten wurde auf Nylon-Membran fixiert und die Biotin-Markierung innerhalb des RCPs mittels Cy3-Streptavidin sichtbar gemacht. Die Fluoreszenzintensität der Proben korreliert mit der Anzahl an eingebautem Biotin-16-dUTP und wurde über die Kalibrationsreihe der Positivkontrolle errechnet.

Ein RCA-Ansatz enthielt 1 nmol und ein Ansatz 10 nmol Biotin-16-dUTP. 10 nmol Biotin-16-dUTP reichten für diesen RCA-Ansatz nicht, um im *Dot Blot* einen kontinuierlichen Einbau des markierten Nukleotides zu ermitteln, bereits nach 5 Minuten nahm das Signal wieder ab. Bei 1 nmol war kein Einbau zu sehen. Die Sensitivitätsgrenze war erreicht, da keine Alternative zu dTTP in dem Ansatz vorhanden war. Ein Gemisch aus dUTP und dTTP war essentiell für einen funktionierenden Einbau von Biotin-16-dUTP, der mit einer kontinuierlichen Amplifikation durch die Phi29-Polymerase einhergeht.

Der Effekt von T4 gp32 wurde genauer analysiert, basierend auf den zuvor erzielten Ergebnissen (Abb. 3.3.2). Dabei wurden 4 verschiedene RCA-Ansätze neben einer Positiv- und Negativkontrolle miteinander verglichen. Die Positivkontrolle (PK) war ein kommerziell erworbenes Startmolekül (M13mp18). Dabei handelte es sich um ein das Genom des Phagen M13mp18, welches als zirkulärer Strang vorlag und sich daher als Zirkularisierung unabhängige Kontrolle der RCA-Reaktion eignete. Mit dem M13mp18 Startmolekül wurde ein 20 μ l RCA-Reaktionsansatz durchgeführt (siehe 2.2.5). Die

Negativkontrolle (NK) entsprach einem 20 μ l RCA-Reaktionsansatz ohne zirkularisiertes Startmolekül, nur mit 20 pmol linearem Oligonukleotid A. Die anderen Ansätze enthielten neben dem 36 μ l Reaktionsansatz mit 20 pmol Startmolekül A mit α (keine Zusätze), β (1nmol Biotin-16-dUTP), γ (10 nmol Biotin-16-dUTP), δ (10 nmol Biotin-16-dUTP, 240 ng T4 gp32). Die α , β , γ und δ RCA-Proben wurden nach 0, 5, 10, 20, 30 und 40 Minuten Inkubationszeit genommen. Die RCA-Proben der Positiv- und Negativkontrollen wurden nach 0, 10, 20 und 40 Minuten entnommen. Je 2 μ l der Proben nach 0 und 40 Minuten wurden in einem SYBR Green I gefärbten 8 %iges Acrylamid/Bisacrylamid-Gele aufgetrennt (Abb. 3.3.4). Die Negativkontrolle (NK) wies keine RCP-spezifischen Banden im Gel auf, wogegen für die Positivkontrolle eine schmale Bande des RCPs am oberen Rand des Gels zusehen war. Die Proben nach 0 Minuten RCA zeigten keine RCP-Fragmente, nur das Startmolekül war zusehen. Alle Proben nach 40 Minuten wiesen das gleiche charakteristische RCP Muster auf. Das bedeutete, dass die Präsenz von Biotin-markierten Nukleotiden, im speziellen das Biotin-16-dUTP und die Zugabe des Proteins T4 gp32 im RCA-Ansatz zu keinen Einbußen der Syntheseleistung der Phi29-Polymerase führten.

Dieselben RCA-Proben wurden auch im *Dot Blot* analysiert (Abb. 3.3.5), um den Einbau des Biotin-16-dUTPs und den Effekt des Proteins T4 gp32 auf den Einbau zu analysieren (RCA-Probe δ). Zusätzlich wurde hierbei das Verhältnis von Biotin-16-dUTP und dTTP weiter untersucht. RCA-Proben β hatten ein Verhältnis von 1:200 und die RCA-Proben γ 1:20 von Biotin-16-dUTP zu dTTP.

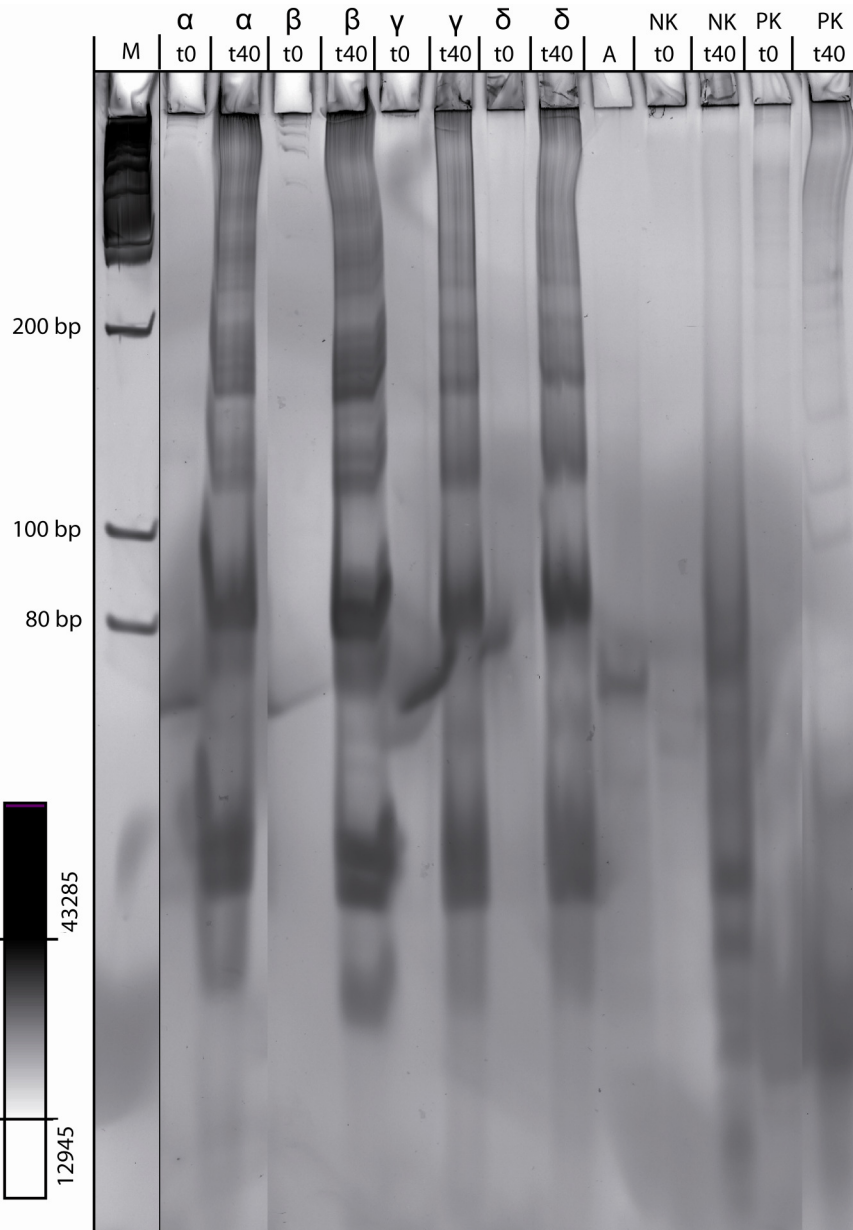


Abbildung 3.3.4 | SYBR Green I gefärbtes 8% Acrylamid/Bisacrylamid-Gel. Je 2 μ l der RCA-Proben nach 0 und 40 Minuten Inkubationszeit wurden im Gel aufgetrennt und mit SYBR Green I gefärbt. Die Proben α (keine Zusätze), β (1 nmol Biotin-16-dUTP), γ (10 nmol Biotin-16-dUTP), δ (10 nmol Biotin-16-dUTP, 240 ng T4 gp32) sind 36 μ l RCA-Reaktionsansätze mit 20 pmol Startmolekül A. Die Negativkontrolle (NK) enthielt 20 pmol Oligonukleotid A und B in einem 20 μ l RCA-Reaktionsansatz. Die Positivkontrolle (PK) enthielt in dem 20 μ l RCA-Reaktionsansatz als Startmolekül ein M13mp18 (siehe 2.2.5). In der 1. Spur wurde der 80 bp DNS-Größenstandard (M) aufgetragen. Die Proben nach 0 Minuten wiesen nur das Startmolekül im Gel auf. Alle Proben zeigten nach 40 Minuten ein RCP-Muster im Gel. Der Negativkontrolle fehlten die RCA-spezifischen hochmolekularen Banden.

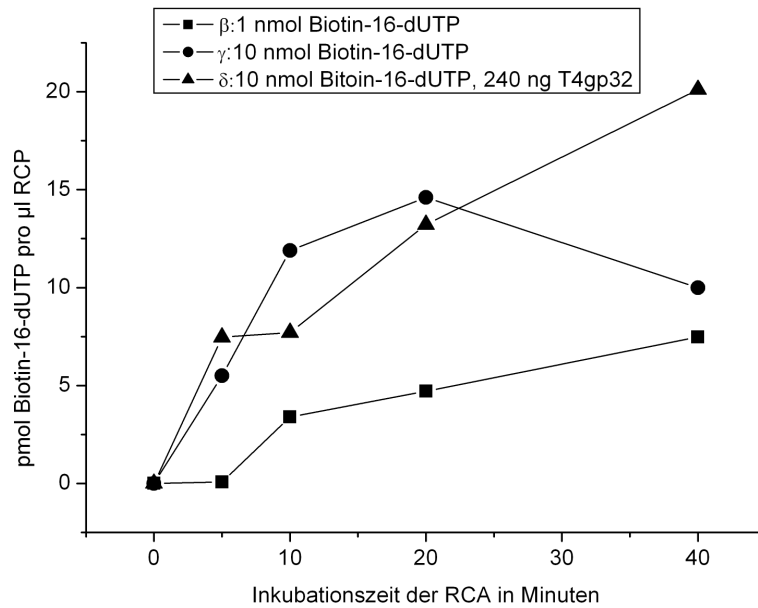


Abbildung 3.3.5 | *Dot Blot*. Je 1 µl RCA-Proben β, γ und δ wurden nebeneinander im *Dot Blot* aufgetragen. Über die Negativkontrolle der RCA ohne Biotin-16-dUTP (α) wurde die Nachweisgrenze bestimmt und die Signalintensitätswerte normalisiert (siehe 2.2.10). Über die Positivkontrolle des *Dot Blots*, eine Konzentrationsreihe des Oligonukleotides C, wurde eine Kalibrationsreihe erstellt. Über diese konnte der Wert der eingebauten Biotin-16-dUTPs im RCP bestimmt werden. Die Menge der markierten Nukleotide pro Probe wurden im Graphen über die RCA Inkubationszeit aufgetragen. Alle Proben zeigten eine Zunahme des Einbaus an Biotin-16-dUTP mit der RCA Zeit. T4 gp32 in den RCA-Proben δ führt zu einer leicht gesteigerten Signalintensität verglichen mit den RCA-Proben γ. Das Verhältnis 1:20 für Biotin-16-dUTP zu dTTP in den RCA-Proben γ führte zu einem verstärkten Einbau von Biotin-dUTP im Vergleich zu den RCA-Proben β mit einem 1:200 Verhältnis.

Die Proben β, γ, δ zeigten eine Zunahme des Einbaus an Biotin-16-dUTP mit der Inkubationszeit der RCA. Die RCA-Proben γ zeigten mit der erhöhten Menge an Biotin-16-dUTP im RCA-Ansatz auch einen verstärkten Einbau von Biotin-16-dUTP im Vergleich zu den RCA-Proben β. Der Zusatz von T4 gp32 rief im *Dot Blot* (Abb. 3.3.5) einen leichten Signalintensitätseffekt der RCA-Probe δ hervor, der jedoch nicht mit der Menge an RCP korrelierte (Abb. 3.3.4), sondern nur den Einbau von Biotin-16-dUTP oder die Bindung von Cy3-Streptavidin an das RCP steigerte. Daher wurde für die folgenden Experimente von der Verwendung von dem Protein T4 gp32 abgesehen. Die *Dot Blot*-Analysen haben zu einer Verringerung des Ansatzes von ursprünglichen 110 pmol Startmolekül auf 20 pmol geführt und ein Online Monitoring der Einbauraten von Biotin-16-dUTP in das RCP ermöglicht.

3.4 Magnetische *Beads*

Nach dem erfolgreichen Etablieren eines Ansatzes in Lösung wurde nun das Ziel verfolgt, die RCA als Zwischenschritt zu den *Microarrays* an eine Oberfläche gekoppelt durchzuführen. Dafür wurden Dynal *Beads* verwendet, die magnetisch waren und auf ihrer Oberfläche eine Streptavidinbeschichtung hatten. Über das Streptavidin können Biotin-markierte Biomoleküle an die magnetischen *Beads* gekoppelt werden. In dieser Arbeit wurden Primer an die Oberfläche gebunden, welche am 3'-Ende der einzelsträngigen DNS ein Biotin trugen. Der Primer, das Oligonukleotid E, hatte neben der Bindestelle für das Startmolekül A auch eine unspezifische Linkersequenz von 6 Nukleotiden, welche zwischen der Oberfläche und der Hybridisierungsstelle des Startmoleküls als Abstandshalter diente. Über die Bindung des Oligonukleotides an die Oberfläche konnte auf dieser eine RCA durchgeführt werden. Das entstehende RCP war dann an die Oberfläche der magnetischen *Beads* gekoppelt. Das Prinzip des Versuchsansatzes wurde in Abbildung 3.4.1 dargestellt.

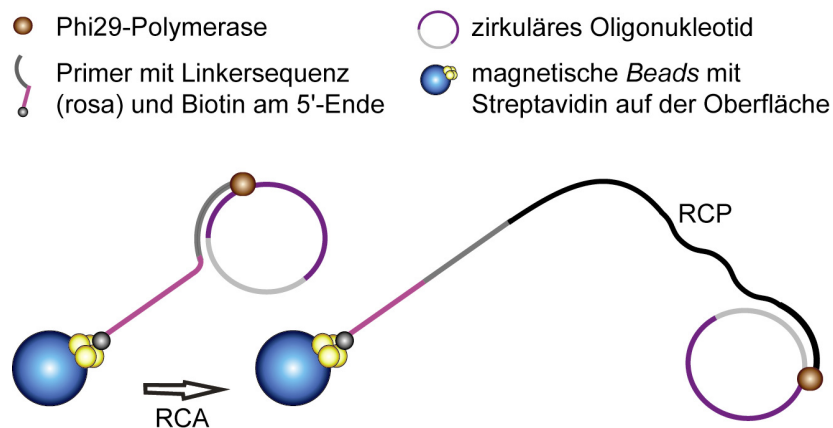


Abbildung 3.4.1 | RCA auf der Oberfläche magnetischer *Beads*. Die magnetischen Kugeln waren mit Streptavidin beschichtet. Ein Biotin am 5'-Ende des Primers ermöglichte eine Immobilisierung der einzelsträngigen DNS an die Oberfläche der *Beads*. Der Primer hatte eine Bindungssequenz für ein Startmolekül der RCA und eine zusätzliche unspezifische Sequenz zwischen dem Biotin und der Bindungssequenz. Diese diente als Abstandhalter zur Oberfläche und sollte ein Binden der Startmoleküle und der Phi29-Polymerase erleichtern. Nach dem die RCA erfolgte, hing über die Streptavidin-Biotin-Bindung das RCP an den magnetischen *Beads*, da das Oligonukleotid am 3'-Ende des Primers verlängert wurde.

Es wurden verschiedene Ansätze verfolgt, um die Bindung an die Oberfläche der *Beads* zu bestätigen. Die Verwendung eines markierten Primers (Oligonukleotid F), der innerhalb des RCPs eine Bindestelle hatte, erwies sich als unbrauchbar, da die magnetischen *Beads* während des Auslesens eine starke Eigenfluoreszenz aufwiesen.

Der Überstand des Bindungsschrittes (siehe 2.2.7) mit dem Biotin-markierten Oligonukleotid E wies nach dem Bindungsschritt keine Abnahme der Oligonukleotidkonzentration auf. Dies wurde durch photometrische Messung bestimmt (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Kapazität der *Beads* wurde laut Herstellerangaben nicht ausgeschöpft.

Mit dem vermeintlich an die Oberfläche der magnetischen *Beads* gekoppelten Oligonukleotid E wurden RCA-Reaktionen (siehe 2.2.7) durchgeführt. Das vermeintliche RCP sollte durch die Zugabe von 0,2x SSC, 0,1% SDS und die 20 minütige Inkubation bei 100 °C für von der Oberfläche gelöst werden. Es wurde kein abgelöstes RCP nachgewiesen. Wenn die RCA nicht erfolgt wäre, hätte der an die *Beads* gebundene Primer ohne das RCP im Gel zu sehen gewesen sein müssen. Dies wurde jedoch nicht beobachtet. Da die Streptavidin-Biotin-Bindung ein Problem, sowohl bei der Bindung an die *Beads* als auch bei der Ablösung darstellte, wurde ein anderer Ansatz verfolgt. Bei dem das RCP durch einen Restriktionsschnitt von den *Beads* gelöst wurde. Die Voraussetzung war, dass das Oligonukleotid bedingt an der Oberfläche gebunden war und nach der RCA ein RCP an den *Beads* vorlag. Um das nachzuweisen, wurde ein zusätzlicher Hybridsierungsschritt vorgenommen, in welchem ein Primer (Oligonukleotid G) innerhalb des RCPs binden konnte und eine Restriktionsschnittstelle für das Enzym *MnlI* generierte wurde. Das Eluat wurde im 8 %igen Acrylamid/Bisacrylamid-Gel aufgetragen (Abb. 3.4.2).

Das RCP nach 40 Minuten Inkubation erzeugte ein Restriktionspattern im Gel, wogegen nach 0 Minuten nicht zu sehen war. Die Negativkontrollen blieben ebenfalls blank. Durch die Restriktionsschnitte konnte das RCP von den *Beads* eluiert werden. Damit wurde der Beweis erbracht, dass das Oligonukleotid E sich auf der Oberfläche befindet und die RCA an der Oberfläche der *Beads* funktionierte.

Da neben der beschriebenen Problematik, die mit der Verwendung von *Beads* einhergeht, auch die Verwendung von Streptavidin-Biotin als Kopplungsbindung an der Oberfläche ist für die Zelllysate-Analyse suboptimal ist (Biotin kommt natürlich vor), wurde der Ansatz nicht weiter verfolgt oder optimiert.

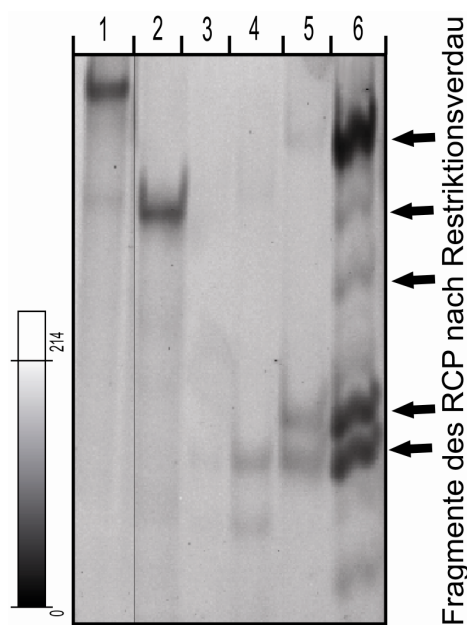


Abbildung 3.4.2 | RCA an magnetischen *Beads*. Ein biotinylierter Primer E wurde an magnetische Kugeln gebunden, ein an den Primer hybridisiertes Startmolekül A ermöglichte eine RCA. Durch die Hybridisierung des Oligonukleotids G an das RCP wurde dieses von den *Beads* durch eine spezifische *MnII*-Restriktionsstelle in der RCP Sequenz geschnitten. Das Restriktionsmuster der Proben wurde auf einem SYBR Green I gefärbten 8 %igen Acrylamid/Bisacrylamid-Gel verglichen. Die RCP-Probe nach 40 Minuten RCA (Spur 6) kann eindeutig durch ein spezielles Restriktionsmuster von den 0 Minuten Proben (Spur 5) unterschieden werden. In der ersten Spur ist das Startmolekül A aufgetragen und in der zweiten das lineare Oligonukleotid A. In den folgenden Spuren 3 und 4 wurde die Negativkontrolle nach 0 und nach 40 Minuten RCA Inkubation aufgetragen.

3.5 Aldehydarrays

Ein RCA-Protokoll um die RCA an der Oberfläche von magnetischen *Beads* gekoppelt durchzuführen wurde erfolgreich etabliert. Dieser RCA-Ansatz an der Oberfläche wurde auf eine andere Plattform übertragen.

Für einen Hochdurchsatz und Multiplexing Ansatz wurden *Microarrays* ausgesucht, die eine Aldehydgruppe auf der Oberfläche haben. Diese Glasträger hatten den Vorteil, dass die Aldehydgruppen eine gerichtete Immobilisierung der Biomoleküle mit einer funktionellen Aminogruppe ermöglichten (Abb. 3.5.1). Dabei reagierten die beiden funktionellen Gruppen zu einem Imin und bildeten eine kovalente Bindung auf der Oberfläche.

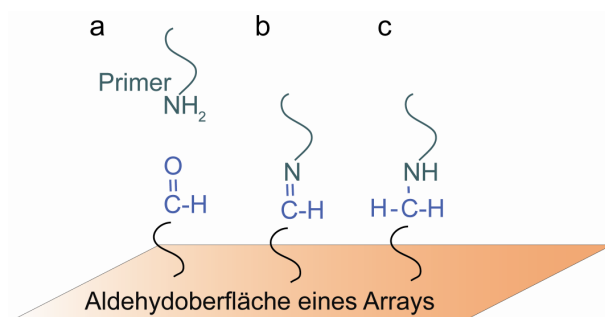


Abbildung 3.5.1 | Aldehydoberfläche. (a) Die Aminogruppen an den 5'-Enden der Oligonukleotide reagieren mit den Aldehydgruppen auf der Oberfläche zu einem Imin (b). (c) Eine Reduktion der Imine führt dann zu einer gerichteten kovalenten Immobilisierung der Oligonukleotide an die Oberfläche.

Der auf magnetischen *Beads* etablierte RCA-Ansatz wurde auf dieses Prinzip der Immobilisierung auf *Aldehydmicroarrays* übertragen (Abb. 3.5.2). Ein Oligonukleotid mit einer Aminogruppe am 5'-Ende wurde auf die Oberfläche des Arrays dispensiert und immobilisiert. Dieser Primer hatte eine Bindungssequenz des Startmoleküls der RCA und eine Linkersequenz, die als Abstandshalter zur Oberfläche diente. Nach erfolgter RCA auf der Oberfläche, wurde der an die Oberfläche gekoppelte Primer mit dem RCP verlängert, und dadurch das RCP an die Oberfläche gebunden.

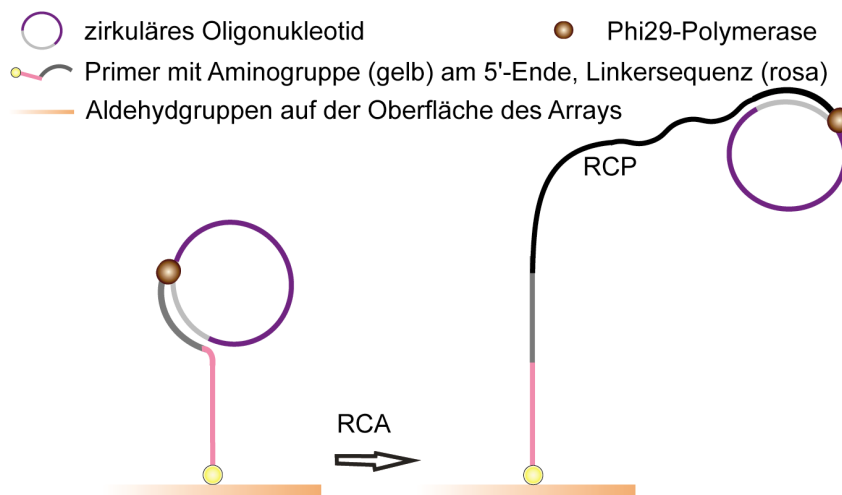


Abbildung 3.5.2 | RCA Prinzip auf einem *Microarray*. Ein Primer mit einer Aminogruppe am 5'-Ende wurde kovalent über die Aldehydgruppe auf der *Microarray*oberfläche gebunden. An das 3'-Ende des Primers bindet das Startmolekül der RCA. Dazwischen liegt die Linker Region zur Oberfläche, die als Abstandshalter zur RCA dient. Durch die Phi29-Polymerase wurde das 3'-Ende des Primers verlängert und das RCP lag an der Oberfläche gekoppelt vor.

Die Oligonukleotide wurden durch einen Piezo-Dispenser auf die Oberfläche gegeben, wobei das Volumen pro Tropfen ca. 300 pl betrug (siehe 2.2.9). Die Immobilisierung nach dem Spotten erfolgt nach einem Protokoll von der Firma PeqLab. Alle verwendeten Primer (Tabelle 3.5.1) zur Immobilisierung der RCA an die Oberfläche wurden zuvor als Oligonukleotide der RCA in Lösung getestet und das Restriktionsmuster des Produktes im Gel überprüft (Ergebnisse nicht gezeigt).

Oligonukleotid	Sequenz 5' → 3'	Linkerlänge
H	Amino- <u>TCG ACC CGT ACC GAT GGG</u> AAT ACG CCC TCA GAA AAT C	17
I	Amino- <u>CGA TGG</u> GAA TAC GCC CTC AGA AAA TC	6
J	Amino-GAA TAC GCC CTC AGA AAA TC	0
M	Amino- <u>CGC CAA CCT GAT GTC TAC AAA GCT CAA</u> <u>GTC ACA TCG ACC CGT ACC GAT GGG</u> AAT ACG CCC TCA	50
N	Amino-AGC <u>TCA AGT CAC ATC GAC CCG TAC CGA</u> <u>TGG</u> GAA TAC GCC CTC AGA AAA TC	30

Tabelle 3.5.1 | Oligonukleotide für die Aldehydarrays. Diese fünf Oligonukleotide trugen am 5'-Ende ein Aminogruppe, um die DNS an den Aldehydarrays kovalent zu immobilisieren. Am 3'-Ende befand sich eine 20 Nukleotide lange Hybridisierungsstelle für das Startmolekül A. Durch einen Unterstrich wurden die Linkersequenzen innerhalb der Oligonukleotide markiert. Die Linkersequenz diente als Abstandshalter zur Oberfläche. Die Länge der Linkersequenz war unterschiedlich und deren Einfluss auf die RCA-Reaktion wurde näher untersucht.

Dies diente der Kontrolle der RCA, welche unabhängig von der Oberfläche bestätigt werden konnte. Alle Oligonukleotide führten nach einer RCA mit dem Startmolekül A zu ähnlichen Restriktionsmustern auf dem Gel und konnten für die Experimente auf den Aldehydarrays eingesetzt werden. Es wurden Primer mit unterschiedlich langen Linkersequenzen für den *Microarray* entworfen.

Für die Durchführung der RCA auf der Oberfläche wurden abgeschlossene Reaktionsräume benötigt. Dafür wurden Agilent Gasket Slides verwendet (2.2.9.1).

Diese Slides hatten mehrere Gummilippen auf einer beschichteten Oberfläche. In jede Gummilippe, den Kammern konnten verschiedene Lösungen gegeben werden. Drückte man den Array, der in Feldern von immobilisierten Oligonukleotiden unterteilt war passgenau auf diese Lippe, entstanden mehrere (4 oder 8) Reaktionsräume, die unabhängig voneinander befüllt werden konnten. Die Anordnung der Kammern auf dem Slide gab die Felder auf dem Array vor, die mit Oligonukleotiden zu immobilisieren waren. Dieses Slidesandwich konnte dann in einer Schraubapparatur (Abb. 3.5.3) fixiert werden und je nach Versuchsaufbau den verschiedenen Behandlungen unterzogen werden.

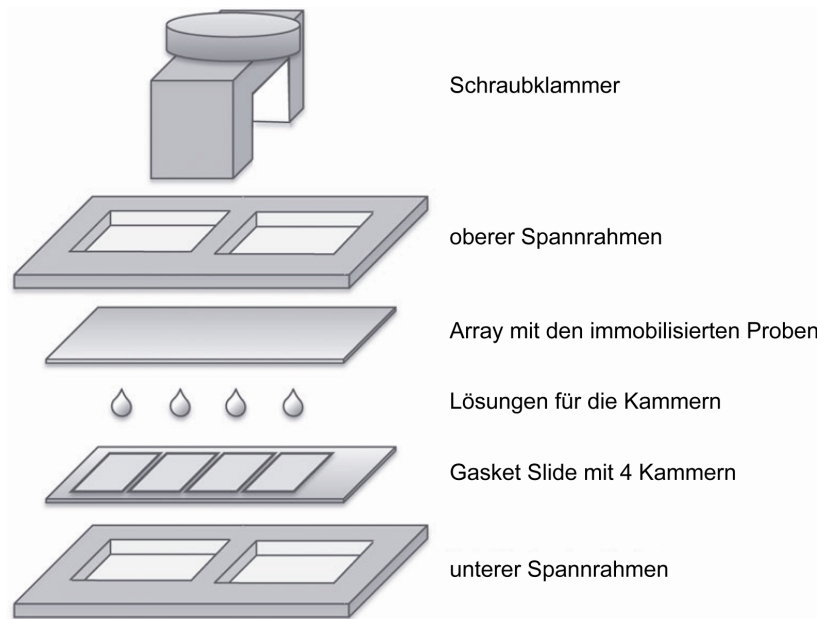


Abbildung 3.5.3 | Schemata des Slide-basierten Kammersystems. Die Gasket Slides haben eine beschichtete Oberfläche, welche das Anhaften von Proteinen oder Nukleinsäuren verhindern soll. Auf der Oberfläche befinden sich Gummilippen, die Kammern (4 oder 8) in welche Lösungen pipettiert werden können. Die Volumina der Hohlräume der 4er Gaskets betragen maximal je 100 μl und die der 8er Gaskets je 40 μl . Das Array mit den immobilisierten Proben wurde dann auf den Gasket Slide gelegt und durch die Schraubklammer des Spannrahmens wurde die Gummi-Lippe fest an den Array gedrückt. Dabei entstand über den Proben ein geschlossener Flüssigkeitsraum (von Berger & Bulyk et al. 2008 modifizierte Abbildung⁵²).

3.5.1 Kontrolle für die Bindung an die Oberfläche

Zunächst wurde die Beladungskapazität der Aldehydoberfläche überprüft mit dem Oligonukleotid H, welches eine Aminogruppe am 5'-Ende trug. Das Oligonukleotid H wurde in verschiedenen Konzentrationen auf die Oberfläche des Arrays mit je einem Volumen von ~ 1 nl gespottet. Nach der Immobilisierung (siehe 2.2.9.1) wurde ein Feld des Arrays durch ein 4er Gasket Slide mit 1000 pmol Oligonukleotid K bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Das Oligonukleotid K hatte eine 17 Nukleotide lange Sequenz, die komplementär zu dem Oligonukleotid H war, zusätzlich es trug es am 5'-Ende ein Biotin. Diesem Schritt folgte die Inkubation mit Cy3-Streptavidin. Über dessen Bindung an das Biotin konnte die Hybridisierung von Oligonukleotid K an das Oligonukleotid H nachgewiesen werden und indirekt die Immobilisierung an die Arrayoberfläche. Die Fluoreszenzintensität der Konzentrationen 0,1, 1, 10, 50 und 100 μM wurde dargestellt (Abb. 3.5.1.1).

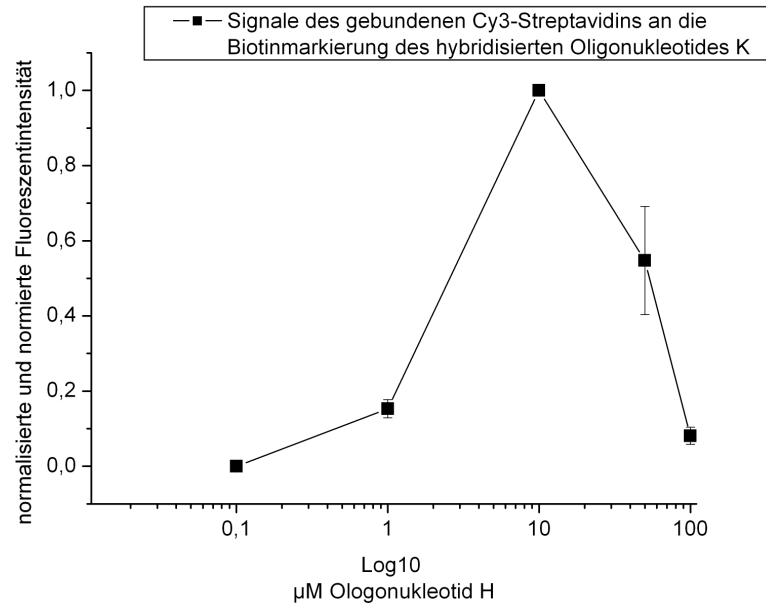


Abbildung 3.5.1.1 | Indirekte Bestimmung der Bindungskapazität von Oligonucleotid H an die Aldehydoberfläche. Das Oligonucleotid H wurde auf Aldehydarrays in verschiedenen Konzentrationen dispensiert und immobilisiert. Je ein nl der Verdünnungsreihe von 0,1 µM, 1 µM, 10 µM, 50 µM und 100 µM in 3x SSC-Puffern wurde in technischen Triplikaten gespottet. In einem 4er Gasket Slide wurde nach der Immobilisierung 1000 pmol Oligonucleotid K zur Hybridisierung an das Oligonucleotid H auf der Oberfläche gegeben. Die Hybridisierung konnte durch die Bindung eines Cy3-Streptavidins an das Biotin am 5'-Ende des Oligonucleotides K nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze wurde ermittelt durch 3x SSC-Puffer, welches als Negativkontrolle dispensiert wurde mit den Proben. 1 µM bis zu 100 µM des Oligonucleotides H konnten durch die Hybridisierung des Oligonucleotides K nachgewiesen werden.

Für die Konzentrationen von 1 µM bis 100 µM ließ sich das immobilisierte Oligonucleotid detektieren. Für 0,1 µM konnte kein Signal nachgewiesen werden. 100 µM des Oligonucleotides H hatten den geringsten Fluoreszenzwert. Eine Erklärung dafür wäre, dass die Beladung auf der Oberfläche so eng war, dass nur bedingt das Oligonucleotid K seine Bindungssequenz zugänglich war. Bei 50 µM war das Signal schon höher aber immer noch unter der Signalintensität der 10 µM Oligonucleotid H Konzentration. Bei 50 µM spiegelte sich ebenfalls die zuvor aufgestellte Hypothese der Zugänglichkeit wieder. Für die 10 µM konzentrierte Lösung schien das Verhältnis zur Oberfläche am besten zu sein, da der höchste Fluoreszenzwert der Verdünnungsreihe detektiert wurde. Die Signalintensität der 1 µM und 0,1 µM Proben nimmt mit der Konzentration ab. Für alle Probenpunkte wurde der gleiche Kreisdurchmesser zur Bestimmung der Intensität gewählt. Die Immobilisierung war erfolgreich.

Nach dieser indirekten Methode zur Kontrolle der Immobilisierung auf den Aldehydarrays wurde zusätzlich ein direkter Weg verfolgt. Dafür wurde ein Oligonucleotid L mit zwei Markierungen eingesetzt, um die Bindungseffizienz sowie die

Robustheit der Bindung während des Experimentes zu untersuchen. Das Oligonukleotid L trug eine Cy3-Markierung am 3'-Ende und eine Aminogruppe am 5'-Ende. Sie diente allen folgenden Experimenten des Aldehydarrays als Positivkontrolle. 1 nl des doppeltmarkierten Oligonukleotides wurde in verschiedenen Konzentrationen auf die Oberfläche des Arrays dispensiert. Direkt nach dem Erstellen des Arrays wurde die Fluoreszenzintensität erstmals gemessen (Messung I), dann noch einmal nach dem Immobilisieren (Messung II) und nach einem zusätzlichen Inkubationsschritt mit Hybridisierungslösung dem 8er Gaskets Slide (Messung III). In Abbildung 3.5.1.2 wurde die Konzentration des Oligonukleotides L gegen die Fluoreszenzintensität der drei Messungen aufgetragen.

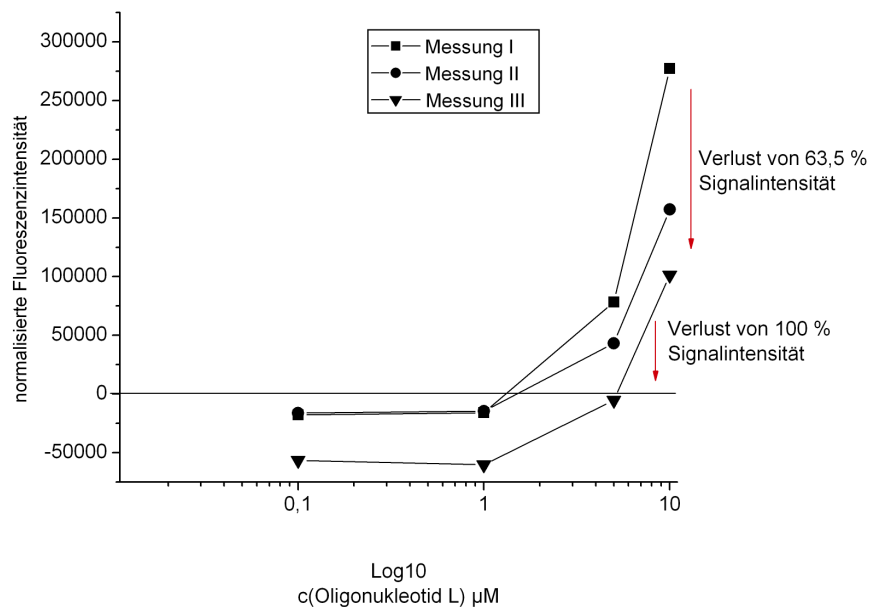


Abbildung 3.5.1.2 | Direkte Bestimmung der Aldehydoberflächenkapazität über das Oligonukleotid L. Je 1 nl des Oligonukleotids L mit 10, 5, 1 und 0,1 μM wurden in technischen Triplikaten auf die Oberfläche des Arrays gegeben. Das Oligonukleotid L trug eine Aminogruppe am 5'-Ende und ein Cy3-Farbstoff am 3'-Ende. Die Messung I erfolgte direkt nach dem Dispensieren, die Messung II nach dem Immobilisieren und Waschen des Arrays. Die Messung III erfolgte nach dem Inkubieren von Hybridisierungslösung in den 8er Gasket Slides. Jede Fluoreszenzintensität wurde für einen Probendurchmesser von 200 μm ermittelt. Die Nachweisgrenze auf dem Array wurde durch 3x SSC-Puffer als Negativkontrolle ermittelt. Die Signalintensitäten wurden gegen die Konzentration des Oligonukleotides aufgetragen. Die Signale der 10 μM enthaltenden Proben wurden in allen drei Messungen nachgewiesen, mit einem Signalverlust von 63,5 % von der I zur III Messung. Bei einer Konzentration von 5 μM wurde nur nach den Messungen I und II ein Signal detektiert. Die Signale der anderen Konzentrationen lagen unterhalb der Nachweisgrenze.

10 μM und 5 μM des Oligonukleotides L wurden nach dem ersten Auslesen gemessen. Die Proben des 10 μM konzentrierten Oligonukleotides L waren auch nach der 3. Messung zu detektieren. Auf einer Fläche von 0,3 mm^2 mit einem Durchmesser von

200 μm befanden sich 6×10^9 Moleküle bei einer Konzentration von 10 μM und 1 nl Lösung, die aufgebracht worden war (siehe 2.2.10). Die maximale Beladungskapazität liegt theoretisch bei 3×10^{12} Molekülen. Der Verlust des Signals durch die Waschschriffe könnte nicht nur an der geringen Robustheit der Immobilisierung des Ansatzes liegen, sondern auch bedingt sein durch den Verlust des Fluoreszenzsignals selbst durch die Anzahl der Messungen oder durch den Einfluss von Licht und Ozon⁵⁸.

Die Immobilisierung der Oligonukleotide an die Aldehydoberfläche ließ sich direkt oder indirekt nachweisen. Nach diesem erfolgreichen Immobilisieren wurde der Ansatz auf die RCA erweitert. Hierbei ließen sich ebenfalls zwei verschiedene Ansätze zum Nachweis des RCP verfolgen. An das immobilisierte Oligonukleotid wurde über eine komplementäre Sequenz das Startmolekül der RCA gebunden. Dadurch wurde das entstehende RCP direkt an die Oberfläche über das gebundene Oligonukleotid gekoppelt. Dies ermöglichte es den Array zu waschen, die RCA-Reaktion zu stoppen ohne dabei das RCP zu verlieren.

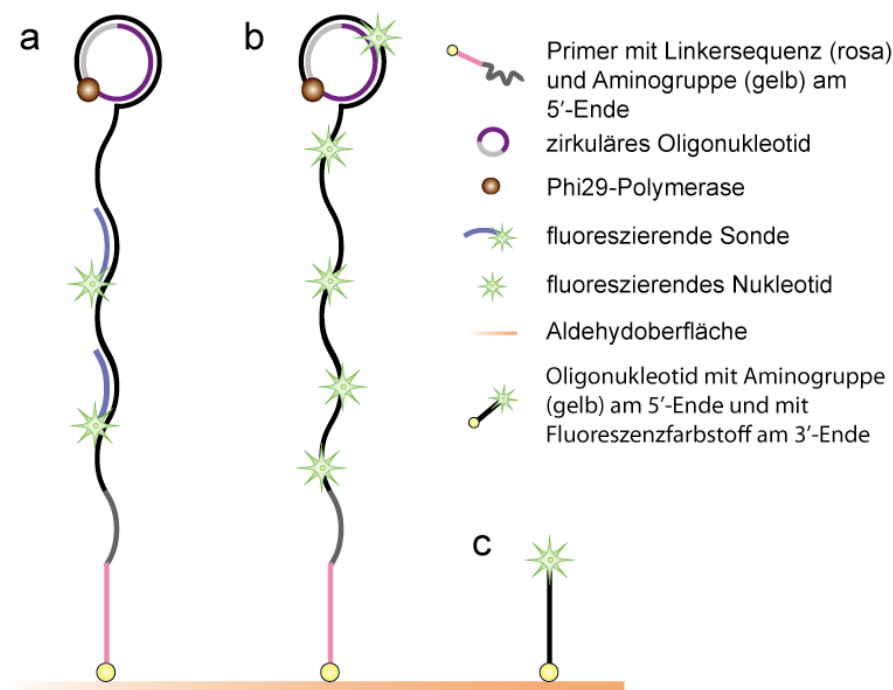


Abbildung 3.5.1.3 | Nachweis des RCPs auf der Arrayoberfläche. Das RCP auf der Oberfläche der Arrays konnte auf zwei verschiedenen Wegen detektiert werden. (a) Über eine mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Sonde, welche innerhalb des RCPs binden konnte. (b) Während der RCA wurden markierte Nucleotide in das RCP eingebaut. Beide Ansätze wurden mittels Fluoreszenzmessung analysiert. (c) Ein doppeltmarkiertes Oligonukleotid mit einer Aldehydgruppe am 5'-Ende und einem Fluoreszenzfarbstoff am 3'-Ende diente als Positivkontrolle.

Das Produkt der RCA konnte über eine innerhalb des RCPs bindenden Sonde detektiert werden. Die Sonde war mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert (Abb. 3.5.1.3 a). Ein weiterer Ansatz zum Nachweis des RCPs erfolgte über den Einbau von Fluoreszenz-markierten Nukleotiden (Abb. 3.5.1.3 b) während der RCA. Beide Ansätze zur Detektion des RCPs ließen sich mittels Fluoreszenz auslesen.

3.5.2 Länge der Linker

Die Oligonukleotide B, H, I, J, M, und N wurden jeweils mit dem Startmolekül A hybridisiert und auf die Oberfläche in 10 μM , 1 μM , 0,1 μM , 0,01 μM , 0,001 μM , 0,0001 μM und 0,00001 μM konzentrierten Lösungen abgegeben und immobilisiert. In einem 8er Gasket Slide wurde die RCA auf dem Aldehydarray durchgeführt. Dabei wurden 5 μl des 1 mM markierten Nukleotides (Cy3-dUTP) in einem 36 μl RCA-Ansatz eingesetzt. Das Verhältnis von markiertem dTTP zu markiertem dUTP war 4:1. Das RCP war nach der RCA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markiert und konnte mittels Auslesegerät direkt nach dem Beenden der RCA-Reaktion ausgelesen werden. Die Fluoreszenzintensitäten des RCPs, welche an die verschiedenen, aufgetragenen Oligonukleotide auf der Arrayoberfläche gekoppelt waren, wurden miteinander verglichen. Nur die Signalintensitäten der 1 μM konzentrierten Proben wiesen nach dem Bestimmen der Nachweisgrenze über die Fluoreszenzintensität des dispensierten 3x SSC-Puffers ein Signal auf (Abb. 3.5.2.1).

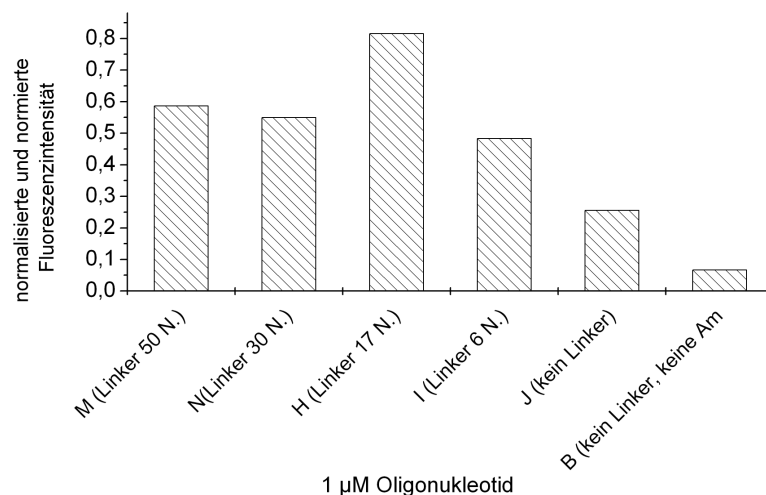


Abbildung 3.5.2.1 | Einbau von Cy3-dUTP. Die Oligonukleotide M, N, H, I, J und B wurden auf die Oberfläche eines Aldehydarrays dispensiert und immobilisiert. Mit dem 8er Gasket Slide erfolgte eine 36 μl RCA-Reaktion mit 5 nmol Cy3-dUTP. Danach wurde die Fluoreszenzintensität der Proben gemessen. Die Nachweisgrenze wurde aus den dispensierten 3x SSC-Puffer Proben ermittelt. Die 1 μM Proben in einem nl wiesen eine Fluoreszenzintensität auf. Die verschiedenen Linkerlängen führen zu verschiedenen Fluoreszenzintensitäten des RCPs.

Für alle Oligonukleotide konnte ein Fluoreszenzsignal gemessen werden. Das Oligonukleotid B ohne Aminogruppe am 5'-Ende wies das geringste Signal auf. An diesen Spots hätte keine Immobilisierung und damit keine RCA stattfinden sollen. Die unterschiedlichen Linker führten zu verschiedenen Signalen. Die Länge der Linker zur Oberfläche schien die RCA-Reaktion zu beeinflussen. Das Oligonukleotid H mit einem 17 Nukleotide langen Linker hatte das höchste Signal und die anderen längeren oder kürzeren Linkersequenzen hatten alle geringere Fluoreszenzintensitätssignale.

Auf dem gleichen Aldehydarray wurde mit den technischen Replikaten in einer anderen Kammer ein 36 μ l RCA-Ansatz mit einer anderen Markierung des Nukleotides durchgeführt. An der Stelle von Cy3 war das dUTP mit Biotin markiert. Um den Einbau der markierten Nukleotide weiter zu untersuchen, wurden verschiedene Ansätze mit variierenden Linkerlängen zwischen dem Biotin und dem dUTP durchgeführt. Neben dem bisher verwendeten Biotin-16-dUTP wurden Biotin-11-dUTP und Biotin-18-dUTP für den Einbau in das RCP analysiert. Die Zahl zwischen dem dUTP und dem Biotin gab Auskunft über die Länge des Linkers. Je größer die Zahl um so länger war der Linker. Damit wurde eine Kohlenstoffkette zwischen dem Biotin und dem dUTP beschrieben.

Zwei Theorien können aufgestellt werden bei der Fragestellung, welches markierte Nukleotid besser eingebaut wurde. Je größer die Kette, um so leichter kann die Polymerase das dUTP in ihren Tunnel aufnehmen und in den Strang einbauen, da das Biotin hieraus hängt und die Polymerase nicht behindert. Auf der anderen Seite könnte die kürzeste Kette zu einem verbesserten Einbau führen, da das Biotin mit dem dUTP in den Tunnel der Polymerase passt und besser eingebaut werden kann. Um dies zu prüfen wurden verschiedenen Linkerlängen untersucht.

Die Oligonukleotide mit den verschiedenen Linkerlängen und dem hybridisierten Startmolekül A wurden in den bereits aufgeführten verschiedenen Konzentrationen und in 2 verschiedenen Volumina, 1 nl und 1,65 nl auf das Aldehydarray abgegeben und immobilisiert. In den folgenden RCA-Ansätzen wurden an der Stelle von Cy3-dUTP Biotin-dUTP mit der gleichen Menge von 5 nmol in dem 36 μ l-Ansatz in den 8er Gasket Slides eingesetzt. Es wurden jeweils Biotin-18-dUTP, Biotin-16-dUTP und Biotin-11-dUTP eingesetzt. Nach der RCA wurde das eingebaute Biotin über Cy3-Streptavidin (1,8 μ l in 36 μ l 1x PBS-Puffer) in einem 8er Gasket Slide markiert und die Fluoreszenz ausgelesen. Die verschiedenen Ansätze wurden nach Oligonukleotiden in verschiedenen Graphen aufgetragen. Nur für die 1 μ M konzentrierten Oligonukleotide wurden Signale gemessen (Abb. 3.5.2.2).

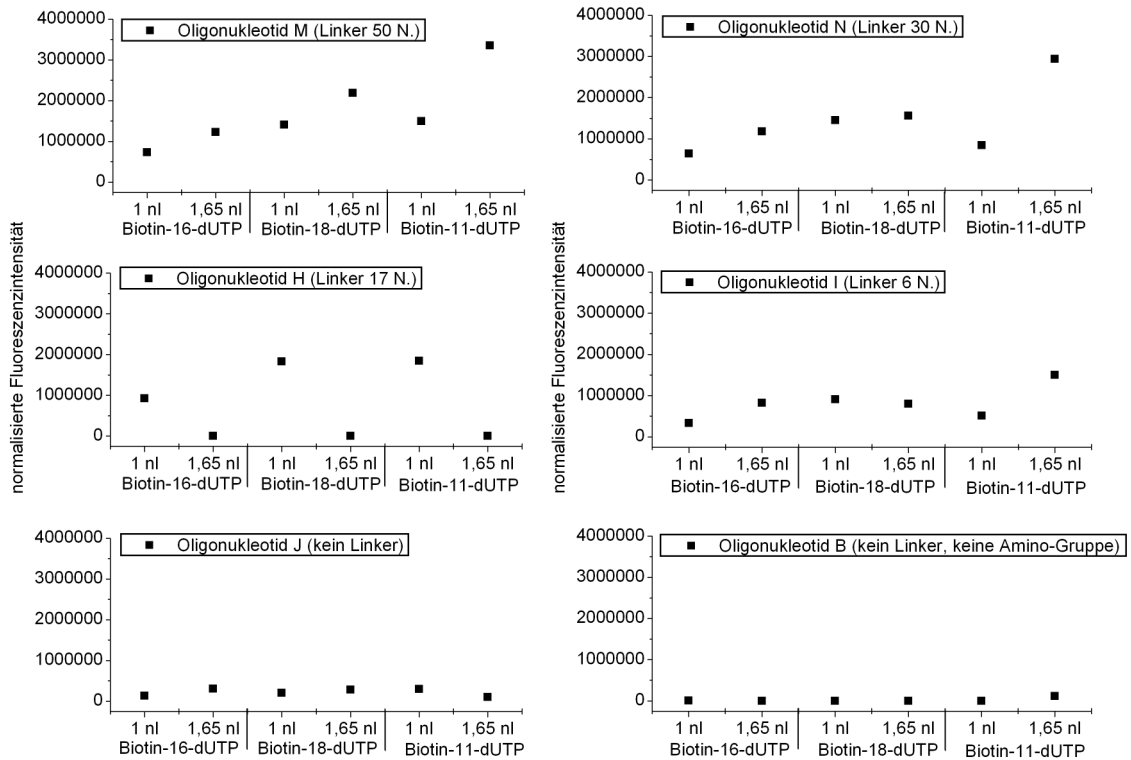


Abbildung 3.5.2.2 | Analyse der Länge des Linkers zwischen Biotin und dUTP. Untersuchung des Einflusses der Biotin-dUTP Linkerlänge auf die Einbaurrate in das RCA. Die Oligonukleotide B, H, I, J, M und N wurden mit Startmolekül A hybridisiert und auf die Aldehydoberfläche des Arrays in 1 nl und 1,65 nl dispensiert. In drei verschiedene Kammern 8er Gaskets wurde der 36 μ l RCA-Ansatz mit je 5 nmol von drei verschiedenen Biotin-dUTPs durchgeführt. Nach der RCA wurden die Proben mit Cy3-Streptavidin markiert und die Fluoreszenzintensität ausgelesen. Der dispensierte 3x SSC-Puffer in jedem Gasket wurde als Negativkontrolle verwendet, um die Nachweisgrenze zu bestimmen. Durch die Subtraktion der Nachweisgrenze wurden die Fluoreszenzintensität normalisiert. Die normalisierten Daten der 1 nl und 1,65 nl des 1 μ M dispensierten Oligonukleotides der Spots (200 μ m \varnothing) wurden gegen die drei verschiedenen dUTPs aufgetragen.

Die drei getesteten Linkerlängen zum Biotin wurden alle von der Phi29-Polymerase eingebaut. Die verschiedenen Oligonukleotide wiesen unterschiedliche Signalintensitäten des RCAs auf. Hier wurden die Ergebnisse des zuvor durchgeführten Experimentes (Abb. 3.5.2.1) bestätigt, dass die Linkerlänge zur Oberfläche die RCA-Effizienz zu beeinflussen schien. Die Probe Oligonukleotid B wies bei diesem Experiment, wie erwartet keine Signale auf. Die leichte Tendenz, dass der Einbau von Biotin mit einem kurzen Linker zum dUTP bevorzugt wurde, war bei allen Oligonukleotides zu erkennen. Es wurde kein Unterschied zwischen dem Einbau von Cy3-dUTP (Abb. 3.5.2.1) und Biotin-dUTP (Abb. 3.5.2.2) festgestellt. Die Verwendung von Biotin als Markierung war zu favorisieren, da bis zu dem Einsatz des Cy3-Streptavidin die Empfindlichkeit der Probe gegenüber Licht und Ozon außer Acht

gelassen werden konnte. Das Oligonukleotid H mit einem 17 Nukleotide langen Linker zeichnete sich durch das größte Fluoreszenzsignal bei dem Einbau von Biotin-11-dUTP bei 1 nl Probe aus. Abbildung 3.5.2.3 stellte die Daten für Biotin-11-dUTP und 1 nl Probe zusammenfassend noch einmal dar.

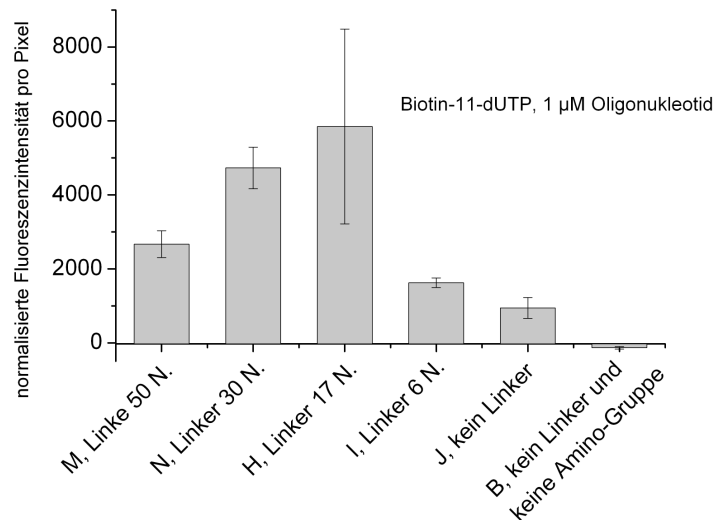


Abbildung 3.5.2.3 | Biotin-11-dUTP. Zusammenfassung der Daten des Experimentes dargestellt in Abbildung 3.5.2.2. Der Durchmesser von 200 μm der Probenspots wurden in 316 Pixel aufgelöst. Die Proben des RCA-Ansatzes mit Biotin-11-dUTP wurden in technischen Triplikaten gemessen und die Nachweisgrenze über 3x SSC-Puffer ermittelt. Die normalisierte Fluoreszenzintensität pro Pixel der 1 μM Oligonukleotide M, N, H, I, J und B wurden aufgetragen.

Das Oligonukleotid H wies die größte Fluoreszenzintensität auf. Die unterschiedlichen Proben hatten unterschiedliche Signale des RCPs. Die Linkerlänge der Oligonukleotide hatte einen Einfluss auf die RCA an der Oberfläche des Arrays. Der Einbau des Biotin-11-dUTPs führte zu den höchsten Signalen der RCA. Dies unterstützt die aufgestellte Hypothese, dass die Polymerase das markierte Nukleotid besser einbauen kann, wenn es eine geringere Größe aufweist. Daher wurde in einem weiteren Experiment ein Biotin-dUTP ohne zusätzlichen Kohlenstofflinker verwendet.

Auf dem Array wurde der Einbau von Biotin-dUTP und Biotin-11-UTP miteinander verglichen. Je ein RCA-Ansatz mit den jeweiligen markierten Nukleotiden, bei dem die Phi29-Polymerase fehlte, wurde auf dem Array zusätzlich untersucht. Dies diente als Negativkontrolle der Proben, um sicherzugehen, dass die Signale der Proben auf Grund der RCA, also dem Einbau ins RCP erfolgten. Jeweils 1 nl der Proben wurde auf die Aldehydarrays dispensiert. Neben den Oligonukleotiden B, H, I, J, M und N wurden separat diese Oligonukleotide hybridisiert mit dem Startmolekül A dispensiert, wobei jeweils die Oligonukleotide mit dem Ligationsansatz und einmal die mit dem

ExonukleaseVII behandelten Startmolekül hybridisiert wurden. Alle Proben wurden in 4 technischen Replikaten in den Konzentrationen 3 μM , 1 μM , 0,1 μM und 0,01 μM dispensiert und immobilisiert. Nach dem erfolgten 36 μl RCA-Ansatz mit je 5 nmol markierten Nukleotid wurden die Kammern des Arrays mit Cy3-Streptavidin inkubiert und die Fluoreszenzintensität des Arrays ausgelesen. Die Nachweisgrenze jedes Gaskets wurde über die Spots des 3x SSC-Puffers bestimmt. Als Positivkontrolle wurde das Oligonukleotid L, welches eine Aminogruppe und einen Cy3-Farbstoff trägt, auf den Arrays dispensiert und mitgeführt. Über die Intensität der Spots des 3 μM konzentrierten Oligonukleotides L wurden die Daten normiert. Alle Spots hatten einen Durchmesser von 150 μm .

Die Proben bei einer Konzentration von 1 μM zeigten ein Signal. Sie wurden in der Abbildung 3.5.2.4 für Biotin-dUTP und in Abbildung 3.5.2.5 für Biotin-11-dUTP zusammengestellt. Die Felder auf dem Aldehydarray, die mit und ohne Phi29-Polymerase inkubiert wurden, wurden miteinander verglichen. Die Proben des RCA-Ansatzes ohne Phi29-Polymerase mit Biotin-dUTP zeigten keine Signale. In dem RCA-Ansatz mit der Phi29-Polymerase wurden verschiedene Fluoreszenzintensitäten detektiert. Die ExonukleaseVII-Ligationsansatzproben wiesen für das Biotin-dUTP niedrigere Signale auf als die Ligationsansatzproben. Das Oligonukleotid H mit einem 17 Nukleotide langen Linker wies die höchste Signalintensität auf. Oligonukleotid I mit einem 6 Nukleotiden langen Linker zeigte ebenfalls ein hohes Signal. Die Spots mit den einzelnen Oligonukleotiden hatten keine Fluoreszenzintensitäten. Der Vergleich zwischen den Signalintensitäten des Biotin-dUTP mit dem Biotin-11-dUTP zeigt, dass die Signale des Biotin-dUTPs am stärksten waren.

Im Biotin-11-dUTP RCA-Ansatz ohne Phi29-Polymerase Signale wies nur das Oligonukleotid N Signale auf. Die Signalintensitäten der Proben, die in dem vollständigen RCA-Ansatz inkubiert wurden, waren unterschiedlich. Außer dem Oligonukleotid H zeigten die anderen Oligonukleotide alleine keine Signale. Für das Oligonukleotid J mit den zwei Startmolekül-Ansätzen wurde kein Signal detektiert. Die Negativkontrolle, das Oligonukleotid B ohne Aminogruppe hatte keine Signale für alle 3 Ansätze. Die Oligonukleotide H und I mit dem ExonukleaseVII verdauten Startmolekül wiesen Signale auf, die anderen ExonukleaseVII-Ligationsansätze der Proben zeigten kein Signal. Das RCP der Oligonukleotide J und N mit dem Startmolekül zeigte keine Fluoreszenzintensität. Die Signalintensitäten des Biotin-11-dUTP sind un stetig im Vergleich zu dem Ansatz mit dem Biotin-dUTP.

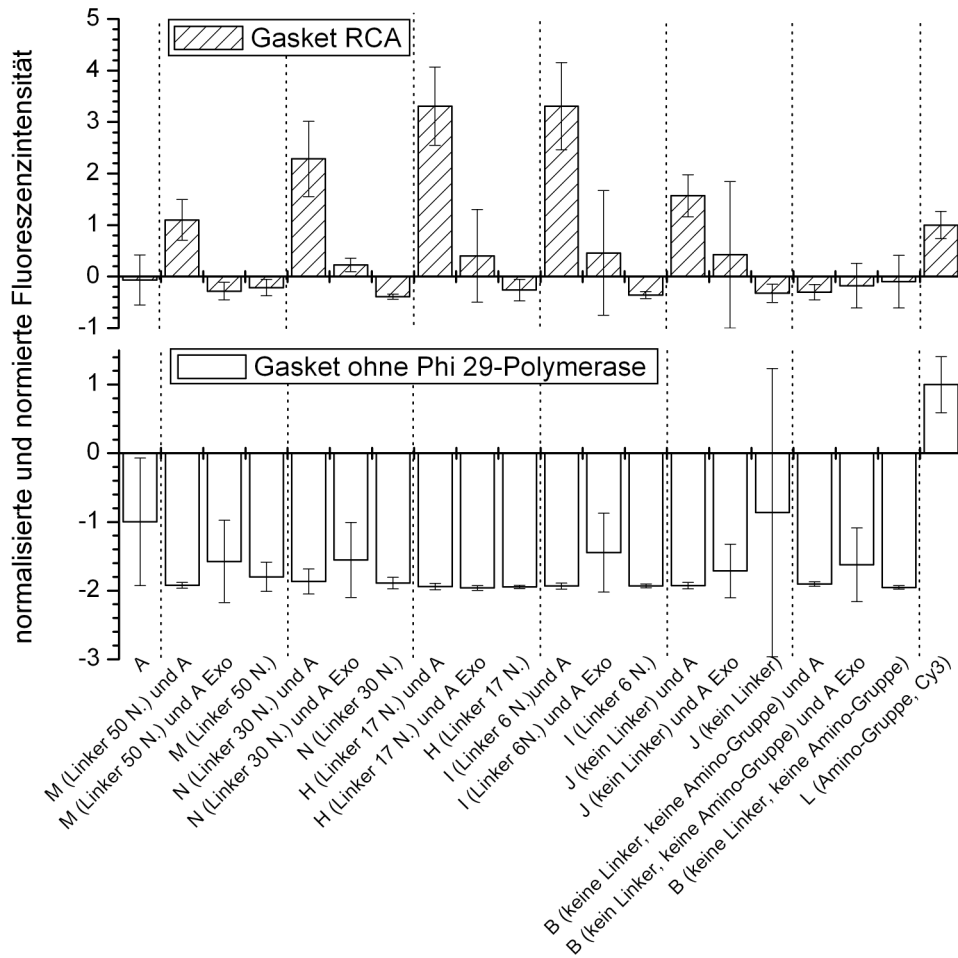


Abbildung 3.5.2.4 | Biotin-dUTP. Jeweils 1nl der Proben wurde auf einen Aldehydarray dispensiert und immobilisiert. Neben der Oligonukleotide B, H, I, J, M und N wurden die Oligonukleotide mit und ohne hybridisiertem Startmolekül B. Das Startmolekül wurde einmal mit dem ExonukleaseVII-Verdau und einmal ohne verwendet. Hier wurden die 4 technischen Replikate der Konzentration 1 μ M dargestellt. Nach dem 36 μ l RCA-Ansatz mit je 5 nmol Biotin-dUTP wurden die Felder mit Cy3-Streptavidin inkubiert und die Fluoreszenzintensität des Arrays ausgelesen. Eine Kammer enthielt keine Phi29-Polymerase zur Kontrolle der RCA. Über die Spots des 3x SSC-Puffers wurde die Nachweisgrenze jedes Feldes bestimmt. Oligonukleotid L (3 μ M), welches eine Aminogruppe und einen Cy3-Farbstoff trug wurde als Positivkontrolle mitgeführt und alle Daten dagegen normiert. Die Fluoreszenzintensitäten der Spots mit und ohne Phi29-Polymerase wurden hier beide aufgetragen. Der RCA-Ansatz ohne Phi29-Polymerase zeigte keine Signale. Für den RCA-Ansatz mit Phi29-Polymerase war die Signalintensität aller ExonukleaseVII behandelten Proben geringer als die für den Ligationsansatz. Die Oligonukleotide alleine zeigten keine Signale und die Negativkontrolle der Oligonukleotide A und B ohne Aminogruppe wiesen ebenfalls keine Signale auf.

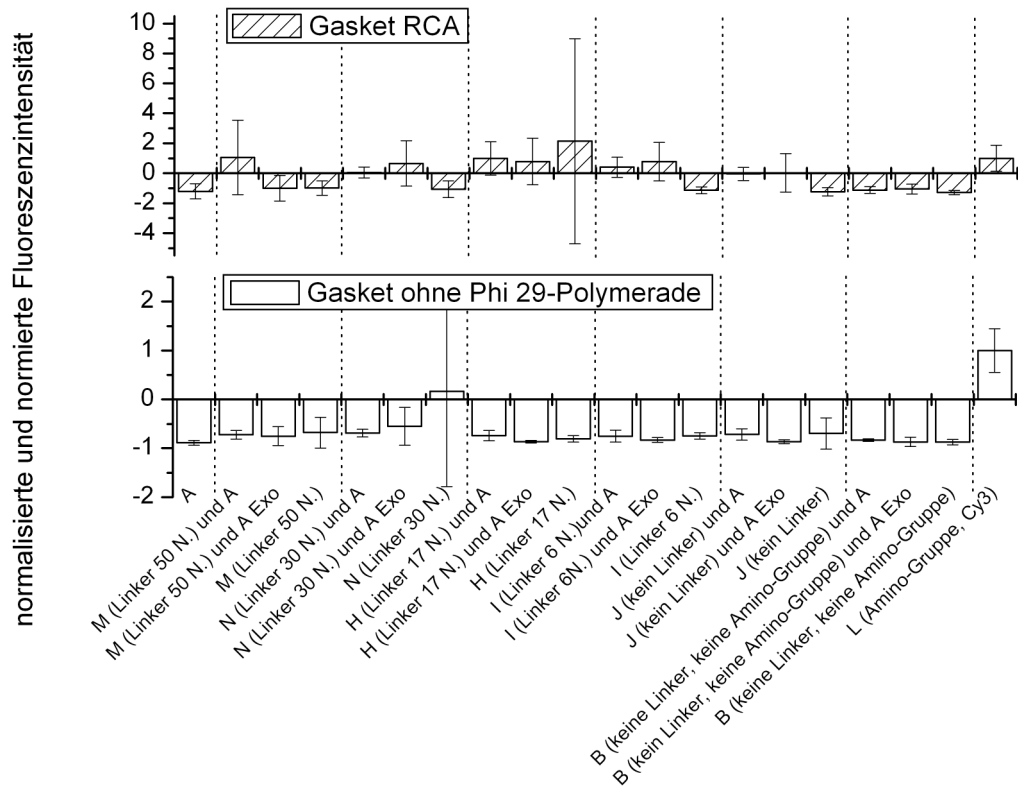


Abbildung 3.5.2.5 | Biotin-11-dUTP. Jeweils 1 nl der Proben wurde auf einen Aldehydarray abgegeben und immobilisiert. Neben der Oligonukleotide B, H, I, J, M und N wurden die Oligonukleotide auch mit dem Startmolekül B hybridisiert, einmal mit dem Ligationsansatz und einmal mit dem Ligationsansatz nach dem ExonukleaseVII-Verdau dispensiert. Hier wurden die 4 technischen Replikate der Konzentration 1 μM dargestellt. Nach dem 36 μl RCA-Ansatz mit je 5 nmol Biotin-11-dUTP wurden die Felder mit Cy3-Streptavidin inkubiert und die Fluoreszenzintensität des Arrays ausgelesen. Eine Kammer enthielt keine Phi29-Polymerase zur Kontrolle der RCA. Über die Spots des 3x SSC-Puffers wurde die Nachweisgrenze jedes Feldes bestimmt. Oligonukleotid L (3 μM), welches eine Aminogruppe und einen Cy3-Farbstoff trug, wurde als Positivkontrolle mitgeführt und zur Normierung der Daten verwendet. Die Fluoreszenzintensitäten der Spots mit und ohne Phi29-Polymerase wurden hier aufgetragen. Der RCA-Ansatz ohne Phi29-Polymerase zeigt keine Signale, außer für das Oligonukleotid N. Der vollständige RCA-Ansatz wies unterschiedliche Signalintensitäten für alle Proben auf. Außer dem Oligonukleotid H zeigten die Oligonukleotide allein keine Signale. Die 3 Ansätze mit dem Oligonukleotid J hatten keinerlei Signale. Die Negativkontrollen der Oligonukleotide A und die 3 Ansätze des Oligonukleotides B ohne Aminogruppe zeigten keine Signale.

3.5.3 Sonden des *Rolling Circle Products*

Neben dem Einbau von markierten Nukleotiden wurde auf den Aldehydarrays ein anderer Nachweis des RCPs verfolgt, bei dem eine sequenzspezifische Sonde innerhalb des RCPs nach der erfolgten RCA binden konnte (Abb. 3.5.1.3 a). Dafür wurde der gleiche Probenansatz der dispensierten Oligonukleotide gewählt, wie zuvor im Experiment mit Biotin-dUTP beschrieben. Die Oligonukleotide B, H, I, J, M und N wurden separat dispensiert und mit dem Startmolekül A in zwei Ansätzen hybridisiert,

wobei in einem Ansatz die Oligonukleotide mit dem Ligationsansatz und einmal mit dem ExonukleaseVII behandelten Startmolekül hybridisiert wurden. Alle Proben wurden in 4 technischen Replikaten in den Konzentrationen 3 μM , 1 μM , 0,1 μM und 0,01 μM dispensiert und immobilisiert. In einer Kammer des 8er Gasket Slides wurde eine 36 μl RCA durchgeführt und in einer zusätzlichen Kammer ein Ansatz ohne Phi29-Polymerase. Um das RCP zu analysieren wurde eine Sonde in einem Hybridisierungsschritt mit dem Array inkubiert.

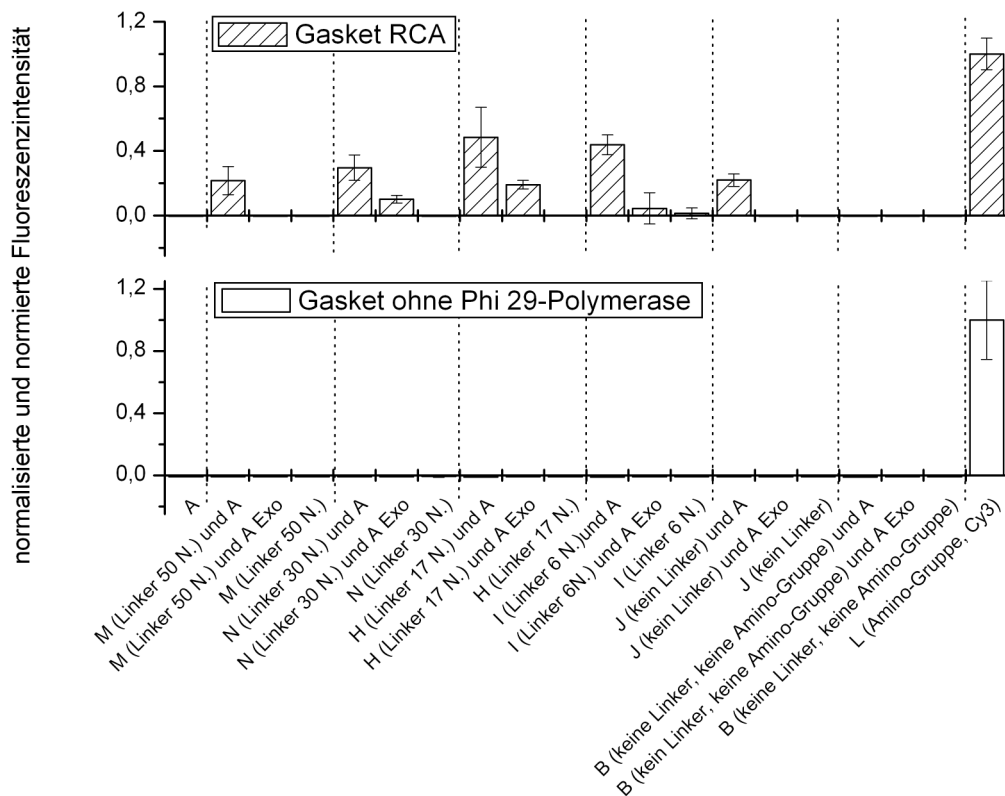


Abbildung 3.5.3.1 | RCP mittels Sonde analysiert. Jeweils 1 nl der Proben wurde auf einen Aldehydarray abgegeben und immobilisiert. Die Oligonukleotide B, H, I, J, M und N wurden mit und ohne das hybridisierte Startmolekül B dispensiert, wobei eine Probe mit dem Ligationsansatz hybridisiert wurde und ein Ligationsansatz nach dem ExonukleaseVII-Verdau verwendet wurde. 4 technische Replikate der 1 μM konzentrierten Proben wurden dargestellt. Nach dem 36 μl RCA-Ansatz wurden die Felder mit 100 pmol Oligonukleotid F inkubiert und die Fluoreszenzintensität des Arrays ausgelesen. Eine Kammer wurde ohne Phi29-Polymerase als Kontrolle mitgeführt. Über die Spots des 3x SSC-Puffers wurde die Nachweisgrenze jedes Gaskets bestimmt. Oligonukleotid L (3 μM), welches eine Aminogruppe und einen Cy3-Farbstoff getragen hatte, wurde als Positivkontrolle mitgeführt und zur Normierung der Daten verwendet. Die Fluoreszenzintensitäten der Spots mit und ohne Phi29-Polymerase wurden aufgetragen. Der RCA-Ansatz ohne Phi29-Polymerase zeigt keine Signale. Bei dem vollständigen RCA-Ansatz konnten für die einzelnen Oligonukleotide keine Fluoreszenzintensitäten detektiert werden. Die Fluoreszenzintensität der Oligonukleotide mit Startmolekül wiesen für alle Proben Signale auf, die höher als die für den ExonukleaseVII-Verdau waren. Das Oligonukleotid A und das Oligonukleotid B mit seinen 3 Ansätzen wiesen keine Signale auf.

Die Sonde, das Oligonukleotid F, hatte eine Sequenz, die innerhalb des RCPs binden konnte und war markiert mit einem Fluoreszenzfarbstoff am 5'-Ende. Über den Fluoreszenzfarbstoff konnten die gebundenen Sonden auf dem Array ausgelesen werden und damit indirekt das RCP nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze wurde über die Spots des 3x SSC-Puffers bestimmt. Oligonukleotid L, welches eine Aminogruppe und einen Cy3-Farbstoff trägt, wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Über die Intensität dieser Oligonukleotide L mit einer Konzentration von 3 μM wurden die Daten normiert (Abb. 3.5.3.1).

Der Ansatz ohne die Phi29-Polymerase wies im Gegensatz zu dem vollständigen RCA-Ansatz keine Signale auf. Für die einzelnen Oligonukleotide konnten keine Fluoreszenzintensitäten detektiert werden. Die Oligonukleotide mit Startmolekül wiesen für alle Proben Signale auf, die höher als die für den ExonukleaseVII-Verdau waren. Das Oligonukleotid H mit einem 17 Nukleotiden langen Linker wies die höchste Signalintensität auf. Oligonukleotid I mit einem 6 Nukleotiden langen Linker zeichnete sich durch das zweithöchste Signal aus. Die Ansätze des Oligonukleotides B ohne Aminogruppe als Negativkontrolle wiesen keine Signale auf. Das lineare Oligonukleotid A führte ebenfalls zu keinem Nachweis eines Signals.

Die Signalintensitäten der Felder mit Biotin-dUTP (Abb. 3.5.2.4) markierten RCPs und mit den Sonden markierten RCPs (3.5.3.1) wurden in Abbildung 3.5.3.2 miteinander verglichen, um zu ermitteln welcher Ansatz zu den höheren Signalintensitäten führte.

Der Einbau von Biotin-dUTP ins RCP führte übergreifend für alle Oligonukleotide mit verschiedenen Linkerlängen zu dem höchsten Signal. Unabhängig von dem Nachweis, ob über den Einbau von Biotin-dUTP in das RCP oder über eine innerhalb der RCPs bindenden fluoreszenzmarkierten Sonde, hatte das Oligonukleotide H die stärksten Signale für das RCP. Das Oligonukleotid H unterschied sich von den anderen verwendeten Oligonukleotiden durch eine 17 Nukleotide lange Linkersequenz über welche es mit der Aldehydoberfläche verbunden war.

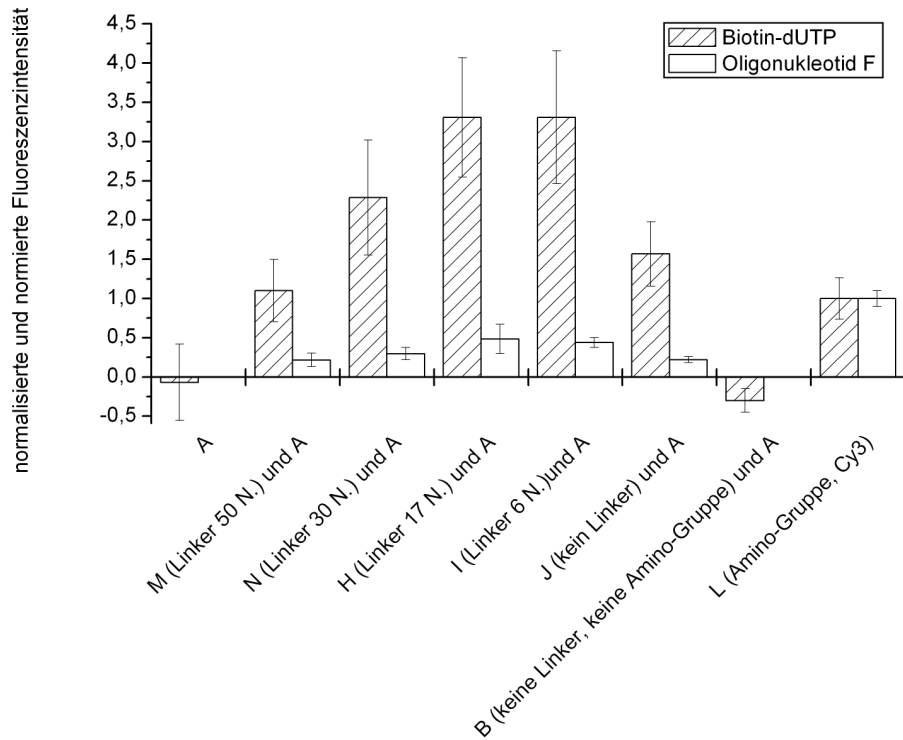


Abbildung 3.5.3.2 | Vergleich zwischen Biotin-dUTP und der Sonde Oligonucleotid F. Jeweils 1 nl der Proben wurde auf einen Aldehydarray abgegeben und immobilisiert. Die Oligonucleotide B, H, I, J, M und N wurden mit dem hybridisierten Startmolekül A dispensiert. 4 technische Replikate der 1 μ M konzentrierten Proben wurden dargestellt. In einer Kammer wurde ein 36 μ l RCA-Ansatz mit je 5 nmol Biotin-dUTP durchgeführt, das Feld mit Cy3-Streptavidin inkubiert und die Fluoreszenzintensität des Arrays ausgelesen. In einer zweiten Kammer wurde eine 36 μ l RCA-Ansatz durchgeführt, das Feld mit 100 pmol Oligonucleotid F inkubiert sowie die Fluoreszenzintensität des Arrays ausgelesen. Über die Spots des 3x-SSC-Puffers wurde die Nachweisgrenze jeder Kammer bestimmt. Oligonucleotid L (3 μ M), welches mit einer Aminogruppe und einem Cy3-Farbstoff markiert war, wurde als Positivkontrolle mitgeführt und zur Normierung der Daten verwendet. Die Fluoreszenzintensitäten der Spots des RCPs mit inkorporierten Biotin-dUTP und der an das RCP hybridisierten Sonde Oligonucleotid F wurden miteinander aufgetragen. Die Signale für den RCA-Ansatz mit Biotin-dUTP wiesen durchgängig die höchsten Signale auf. Die Oligonucleotide A und B ohne Aminogruppe als Negativkontrolle wiesen keine Signale bei beiden Feldern des Arrays auf.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein RCA-Ansatz auf Aldehydarrays etabliert wurde. Die Untersuchungen ergaben, dass unter Verwendung eines über eine Aminogruppe an die Oberfläche gekoppelten Oligonucleotids H, welches über eine Linkersequenz mit 17 Nucleotiden verfügt, ein Protokoll mit Biotin-dUTP zur Markierung des RCPs, zu den höchsten Signalen führte.

3.6 DNAzyme

Neben den Analysen der RCA wurde ein weiterer Ansatz unter der Verwendung von DNAzymen verfolgt. DNAzyme sind katalytisch aktive Desoxyribonukleinsäuren. Die in dieser Arbeit verwendeten DNAzyme hatten eine Peroxidaseaktivität⁴². Die DNS lag als Einzelstrang vor. Durch die Zugabe von Kalium (Abb. 3.6.1) konnte aus der guaninreichen DNS-Sequenz ein G-Quadruplex erzeugt werden.

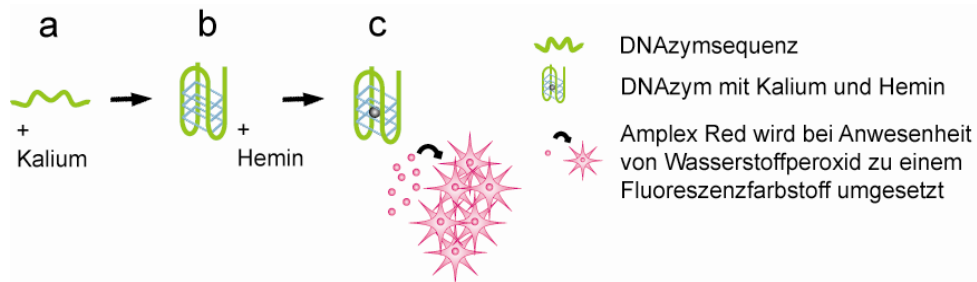


Abbildung 3.6.1 | Peroxidase-Aktivität eines DNAzym. (a) Eine einzelsträngige guaninreiche DNS-Sequenz formte in der Anwesenheit von Kalium einen viersträngigen G-Quadruplex. (b) In diesem Komplex interkaliert Hemin und die DNS wurde katalytisch aktiv. Dieser Vorgang, ein katalytisch aktives DNAzym zu formen, wurde als Konformation bezeichnet. (c) Das katalytisch aktive DNAzym war in der Lage, Peroxidase-Substrate wie Amplex Red in der Anwesenheit von Wasserstoffperoxid umzusetzen, so dass ein Fluoreszenzsignal generiert wurde.

In diesem Komplex kann Hemin interkalieren. Das DNAzym wurde geformt und war katalytisch aktiv. Die Formierung eines aktiven DNAzyms wurde als Konformation bezeichnet. Peroxidase Substrate wie ABTS, Luminol und Amplex Red konnten von diesem DNAzym in der Anwesenheit von Wasserstoffperoxid umgesetzt werden. Das jeweilige Produkt des Substrates wurde mit speziellen Auslesegeräten detektiert.

Diese katalytisch aktiven Nukleinsäuren stellten eine mögliche Alternative zu den bisher vorgestellten Markierungen des RCPs dar (Abb. 3.5.1.3). Dafür wurde ein Startmolekül entworfen, welches eine komplementäre DNAzymsequenz aufwies. Nach erfolgter RCA lag ein RCP mit verbundenen DNAzymsequenzen vor (Abb. 3.6.2). Das RCP wurde einer Konformation unterzogen. Die DNAzyme sollten katalytisch aktiv sein und ein Substrat umsetzen, dessen Produkt die Anwesenheit eines RCPs nachweist. Weder markierte Nukleotide noch markierte Sonden müssen verwendet werden, die Nukleinsäuresequenz selbst diente hier als Sensor. Damit wurden zwei Amplifikationen miteinander verbunden, die RCA und der kontinuierliche Substratumsatz der DNAzyme selber, was zu einer Signalverstärkung führen sollte.

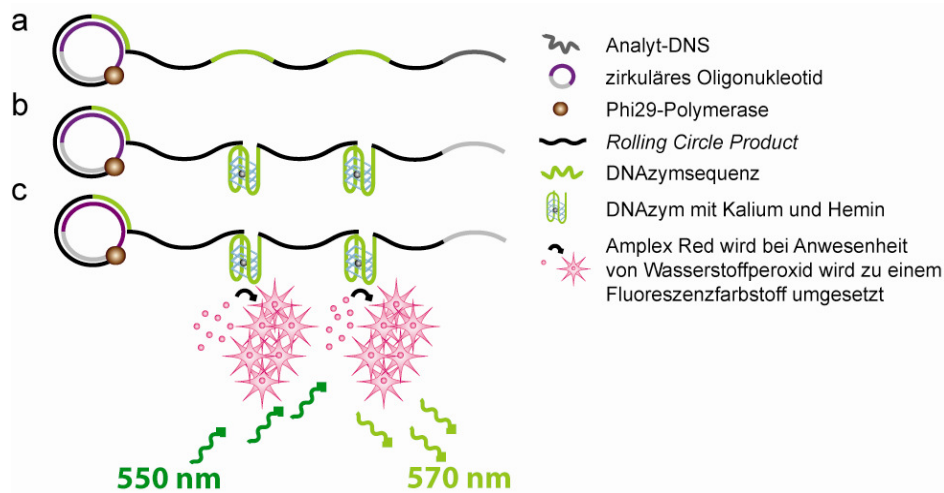


Abbildung 3.6.2 | Nachweis des *Rolling Circle Products* über katalytische Zentren. Durch die RCA eines Startmoleküls mit einer komplementären DNAzym-Sequenz entstanden vielfache Kopien des DNAzyms innerhalb des RCPs (a). Die Zugabe von Kalium zum RCP führte zur Ausbildung des G-Quadruplex des DNAzyms. In diesen viersträngigen Komplex konnte Hemin interkalieren und es lag eine katalytisch aktive DNS-Sequenz vor (b). Nach der Konformation wurde durch die DNAzyme das Substrat Amplex Red in der Anwesenheit von Wasserstoffperoxid oxidiert. Dabei entstand ein Fluoreszenzsignal, welches bei λ_{abs} 550 nm and λ_{em} 570 nm ausgelesen werden konnte.

Für die folgenden Versuche wurde zunächst eine gut etablierte 17 Nukleotide lange DNAzymsequenz verwendet, die von Cheglakov und Kollegen beschrieben wurde⁴⁸. Die Sequenz wurde in ein 79 Nukleotide langes Oligonukleotid mittig integriert (Oligonukleotid Q).

Die katalytische Aktivität der DNAzyme könnte durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden, wie z.B. der Konformationszeit, dem Verhältnis von DNAzym zu Hemin, der Sequenzzusammensetzung der umgebenden DNS und der Temperatur. Um diese Fragestellungen genauer zu analysieren, wurde ein Versuchsansatz in einem 96er Mikrotiterplatten Format zum Auslesen der katalytischen DNAzym-Aktivität etabliert.

3.6.1 Charakterisierung der DNAzyme

Der erste Schritt war die Analyse der Konformationszeit, die Zeit bis sich ein katalytisch aktiver Komplex in der Anwesenheit von DNS, Kalium und Hemin ausgebildet hat. Oligonukleotid Q Proben wurden bei 21 °C für 30, 60, 120 und 180 Minuten mit Konformationspuffer und Hemin inkubiert. Die katalytische Aktivität der DNAzyme wurden jeweils für 500 nM DNAzym pro Reaktionsraum einer 96er Mikrotiterplatte mit ABTS als Substrat ermittelt (siehe 2.2.8). Der Anstieg der Signale pro Minute, welche

im Spektralphotometer bei 405 nm detektiert wurden, wurde bestimmt und gegen die Inkubationszeit aufgetragen (Abb. 3.6.1.1).

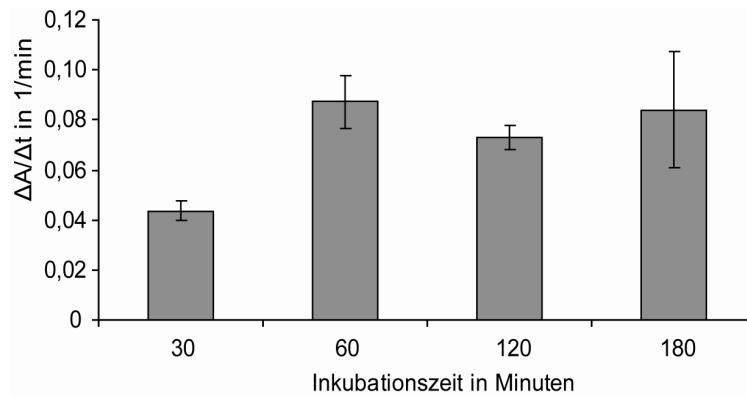


Abbildung 3.6.1.1 | Konformationszeit. Der ABTS Substratumsatz von 500 nM Oligonukleotid Q pro Reaktionsraum im 96er Mikrotiterplattenformat wurde bestimmt. Die Proben wurden unterschiedlichen Konformationszeiten (30, 60, 120 und 180 Minuten) unterzogen. Der Anstieg pro Minute wurde bestimmt und gegen die Konformationszeit aufgetragen. Nach 30 Minuten Konformation wurde eine Steigung ermittelt, welche bei 60 Minuten Konformation ein Maximum erreicht hatte. Danach war keine Zunahme der Steigung zu verzeichnen.

Nach 30 Minuten konnte bereits die katalytische Aktivität der DNAzyme gemessen werden, und nach 60 Minuten erreichte die Steigung ein Plateau. Die Verlängerung der Konformationszeit auf 120 und 180 Minuten führte zu keiner Zunahme der Steigung, so dass über zwei Stunden konstant der gleiche Substratumsatz stattfand. Für alle folgenden Versuchsansätze wurde daher eine Konformationszeit von drei Stunden verwendet, da die Dauer keinen negativen Einfluss auf die Aktivität der DNAzyme hatte.

Die Hemin war der wichtigste Co-Faktor der DNAzyme, da durch das Zusammenspiel von Hemin und DNS ein katalytisch aktiver Komplex entstand. Das Verhältnis von Hemin zu DNS während des Konformationsprozesses wurde untersucht. Das Oligonukleotid T (12,5 μM) wurde mit 100 μM , 50 μM und 25 μM Hemin konformiert. Dies bedeutet ein Verhältnis von 1:2, 1:4 und 1:8 von DNS zu Hemin. Jede Heminkonzentration hatte eine eigene Negativkontrolle, welche keine DNS enthielt. Die Konformation wurde wie in 2.2.8 beschrieben durchgeführt, nur die Hemin Konzentration wurde variiert. Die Proben wurden mit dem Substrat Amplex Red in einer 96er Mikrotiterplatte gemessen (Abb. 3.6.1.2).

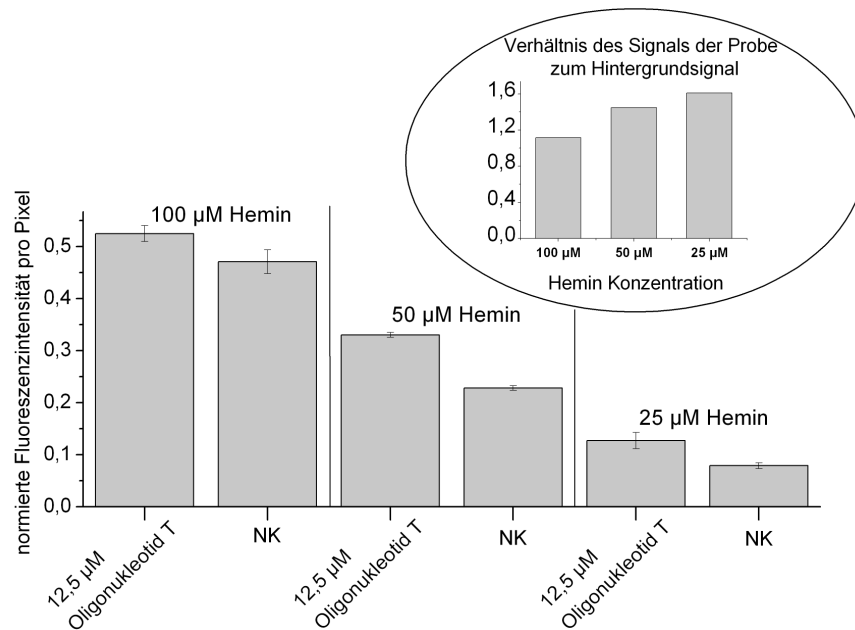


Abbildung 3.6.1.2 | Verhältnis Hemin zu DNS. In einer 96er Mikrotiterplatte wurden die Amplex Red Substratumsätze von 12,5 µM konformierten Oligonucleotid T mit 100 µM, 50 µM und 25 µM Hemin gemessen. Als Negativkontrolle (NK) fungierte der jeweilige Ansatz ohne DNS. Die Daten wurden mittels 0,1 Units HRP in derselben Platte normiert. Für das Verhältnis 1:2 von DNS zu Hemin war der Signalunterschied zwischen Probe und Negativkontrolle am höchsten.

Die erhaltenen Daten wurden gegen 0,1 Units der *Horseradish* Peroxidase (HRP) normiert. Der Wert der Negativkontrolle (NK) nahm mit der Menge an Hemin stark zu. Das Verhältnis des Signals der Probe zu dem Signal des Hintergrundes hatte den höchsten Wert bei 25 µM Hemin. Dies bedeutet, dass das Verhältnis 1:2 von DNS zu Hemin die besten Ergebnisse lieferte. Alle weiteren Ansätze wurden mit diesem Verhältnis von 1:2 für die Konformation der DNS durchgeführt.

Auf Grund der verschiedenen Anforderungen, im speziellen die Inkubation bei hohen und bei niedrigen Temperaturen, die bestimmte Experimente an die Proben haben, wurde die Thermostabilität der DNAzyme untersucht.

Die Thermostabilität des DNAzyms wurde in einem 96er Mikrotiterplatten-Versuch mit Amplex Red untersucht. Das Oligonucleotid Q wurde für 9 Minuten bei 95°C inkubiert, gefolgt von der Inkubation für 3 Stunden bei 21°C oder 4°C. Nach der Konformation der Nukleinsäuresequenz wurde eine Probe erneut für 9 Minuten auf 95°C temperiert, gefolgt von einer Konformation für 3 Stunden bei 21°C. 0,5 µM der DNAzyme wurden je Ansatz analysiert. Die Negativkontrolle (NK) enthielt keine DNS. Die Fluoreszenzsignale der DNAzyme wurden gegen einander aufgetragen (Abb. 3.6.1.3).

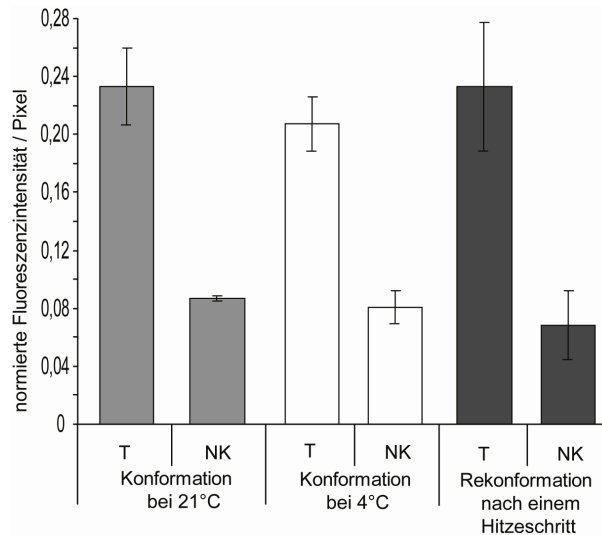


Abbildung 3.6.1.3 | Thermostabilität der DNAzyme. Das Oligonukleotid T wurde je einer Konformation bei 21 °C und einer Konformation bei 4 °C unterzogen. Nach der Konformation wurde das Oligonukleotid T für 9 Minuten bei 95 °C inkubiert und erneut konformiert. Die mitgeführten Negativkontrollen (NK) enthielten keine DNS. Die Aktivität der DNAzyme wurde in einem Amplex Red 96er Mikrotiterplatten Ansatz gemessen. Die Messdaten wurden mittels 0,1 Units HRP normiert. Alle Proben zeigten vergleichbar hohe Messsignale.

Die Messdaten wurden mit den Werten der mitgeführten 0,1 Units HRP normiert. Alle Proben mit DNS zeigten ein deutlich höheres Signal als die Negativkontrolle ohne DNS. Die Signalintensität der DNAzymproben hatte fast die gleiche Höhe. Das bedeutet, dass weder die niedrige Konformationstemperatur noch der zusätzliche Denaturierungsschritt Einfluss auf die katalytische Aktivität der DNAzyme hatte. Das DNAzym konnte sich nach dem Denaturierungsschritt rekonformieren und erlangte seine ursprüngliche katalytische Aktivität zurück. Diese Ergebnisse unterstreichen, wie robust diese katalytisch aktive DNS Strukturen sind. Die Thermostabilität der DNAzyme stellt einen erheblichen Vorteil für den Einsatz der DNS als Markierungssonde im Vergleich zu den Proteinen wie die HRP, welche einem irreversiblen Aktivitätsverlust nach einem Temperatur-Denaturierungsschritt unterliegt, dar.

In dem folgenden Abschnitt wurde die Sensitivität des Amplex Red 96er Mikrotiterplatten Ansatzes (siehe 2.2.8) ermittelt. Eine Verdünnungsreihe der Oligonukleotide T wurde mit 500 nM, 250 nM, 167 nM, 125 nM und 83,4 nM erstellt. Die Proben unterliefen eine Konformation. Nach der Konformation wurde die katalytische Aktivität der Verdünnungsreihe in einem Amplex Red 96er Mikrotiterplatten-Ansatz gemessen. Die Negativkontrolle war ein Ansatz ohne DNS. Über diese Negativkontrolle wurde auch die Nachweisgrenze bestimmt. Die DNAzym Konzentration wurde gegen das normalisierte Fluoreszenzsignal aufgetragen

(Abb. 3.6.1.4). Bis zu 125 nM Oligonukleotid T wurden detektiert. Bei einer Konzentration von 83,4 nM wurde kein Signal mehr gemessen.

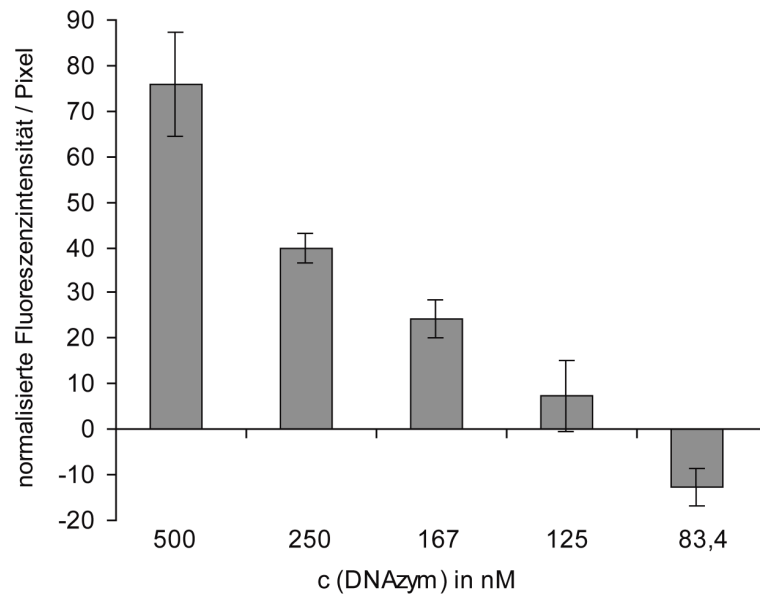


Abbildung 3.6.1.4 | Sensitivität der DNAzyme. Die katalytische Aktivität des Oligonukleotid T wurde nach einer Konformation in einem Amplex Red 96er Mikrotiterplatten-Versuch analysiert. Eine Verdünnungsreihe von 500 nM bis zu 83 nM Oligonukleotide T wurde angesetzt. Die Sensitivität des Ansatzes zum Nachweis der formierten DNAzyme wurde bei einer Konzentration von 125 nM bestimmt.

3.6.2 Multiple verbundene DNAzyme

Das Ziel der Charakterisierung der DNAzyme sollte die Verwendung im RCA-Ansatz sein. Ein Strang an verbundenen DNAzymen entsteht im Verlauf der RCA (Abb. 3.6.2). In einem Vorexperiment war zu prüfen, ob mehrere DNAzyme auf einem Strang katalytisch aktiv waren. Dies wurde zunächst mit diesem simplen Model getestet. Oligonukleotide mit drei und zwei DNAzymsequenzen auf einem Strang wurden designed und die Aktivität mit einem Oligonukleotid mit nur einem DNAzym verglichen. Die Abstände zwischen den drei DNAzymen auf einem Strang waren am kürzesten im Vergleich zu den zwei DNAzymen auf einem Strang. Die Oligonukleotide unterliefen die Konformation, wobei auch hier das Verhältnis 1:2 für DNAzym zu Hemin eingehalten wurde. Alle Ansätze lagen in den gleichen DNAzymkonzentrationen vor, daher mussten die Oligonukleotid-Konzentrationen angepasst werden. Eine Verdünnungsreihe der Oligonukleotide O, P und Q wurde erstellt in den DNAzymkonzentrationen 750 nM, 250 nM, 125 nM und 75 nM. Das Oligonukleotid O hatte drei DNAzymsequenzen auf einem Strang. Das Oligonukleotid P enthielt zwei DNAzyme und das Oligonukleotid Q nur ein DNAzym pro Strang. Die

Signalintensitäten der Oligonukleotide wurden in einem 96er Mikrotiterplatten-Ansatz mit ABTS gemessen. Die Steigung pro Minute wurde ermittelt und die Daten über die Negativkontrolle normalisiert. Die Negativkontrolle enthielt keine DNS. In der Abbildung 3.6.2.1 wurden die gleichen DNAzymkonzentrationen gegen die Steigung des Signals aufgetragen.

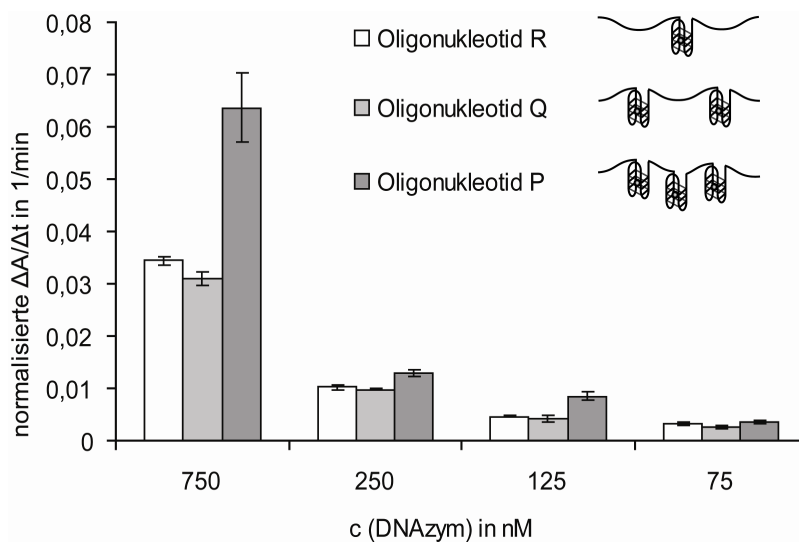


Abbildung 3.6.2.1 | Multiple verbundene DNAzyme. In einem ABTS 96er Mikrotiterplatten Ansatz wurde die Verdünnungsreihe der Oligonukleotide O, P und Q gemessen. Die Oligonukleotide wurden in den DNAzymkonzentrationen 750 nM, 250 nM, 125 nM und 75 nM konformiert. Die Daten wurden über die Negativkontrolle normalisiert, welche sich nur durch das Fehlen von DNS von den Kontrollen unterschied. Die Steigung pro Minute wurde gegen die DNAzymkonzentration aufgetragen.

Die Ergebnisse zeigten, dass verbundene und einzelne DNAzyme fast die gleiche katalytische Aktivität bei einer Konzentration unter 250 nM DNAzym aufwiesen. Der Signalunterschied zwischen den Sequenzen nahm mit abnehmender DNAzymkonzentration ebenfalls ab. Bei der niedrigsten eingesetzten Konzentration von 75 nM konnten alle Oligonukleotide nachgewiesen werden. Für das Oligonukleotide O wurde bei der Konzentration von 750 nM das höchste Signal aufgezeichnet.

Mit diesen Ergebnissen wurde gezeigt, dass eng verbundene DNAzyme einen G-Quadruplex ausbilden und eine katalytische Aktivität gemessen werden konnte. Das Phänomen, dass alle DNAzyme eine katalytische Aktivität zeigten, sollte sich auf die DNAzyme innerhalb des RCPs übertragen lassen.

3.6.3 Zweite Generation an DNAzymen

In neuen Analysen wurde eine sogenannte zweite Generation an DNAzymen beschrieben⁴⁹. Diese speziellen Sequenzen formten DNAzyme mit einer höheren katalytischen Aktivität und höherer Hemin-Bindungseffizienz als die bisher beschriebenen DNAzyme. Die DNAzyme der zweiten Generation formten eine Struktur mit einer zusätzlichen Haarnadelstruktur zu dem bestehenden G-Quadruplex. Für diese Arbeit führte dies zur Vermutung, dass der Einsatz solcher DNAzyme der zweiten Generation zu einer erhöhten Signalintensität innerhalb des RCPs führen könnte. Daher wurde ein Vergleich zwischen dem Oligonukleotid T, welches ein DNAzym der ersten Generation enthielt, und dem Oligonukleotid U, welches ein DNAzym der zweiten Generation enthielt, vorgenommen. Die Negativkontrolle der DNAzyme unterschied sich von den Proben nur durch das Fehlen von DNS. Zusätzlich wurden die beiden Oligonukleotide mit der Aktivität des Proteins HRP verglichen (Abb. 3.6.3.1).

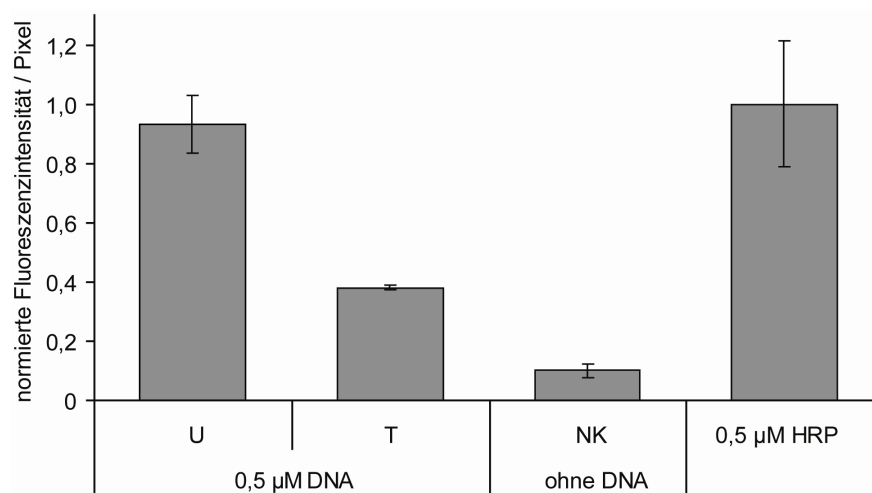


Abbildung 3.6.3.1 | Zweite Generation an DNAzymen. Die katalytische Aktivität des Oligonukleotids T (erste Generation an DNAzymen) und des Oligonukleotids U (zweite Generation an DNAzymen) wurde in einem 96er Mikrotiterplatten-Ansatz mit Amplex Red zusammen mit der gleichen Menge an HRP analysiert. Die Negativkontrolle (NK) enthielt keine DNS. Die dargestellten Signalintensitäten wurden gegen HRP normiert. Die Signalintensität des Oligonukleotides U hatte die gleiche Höhe wie die des Proteins HRP und war ungefähr zweimal höher als die des Oligonukleotids T. Die zweite Generation von DNAzymen (U) hatte eine höhere katalytische Aktivität auf Grund einer speziellen Struktur.

Die höhere katalytische Aktivität des Oligonukleotids U führte verglichen mit dem Oligonukleotid T zu einem doppelt so starken Fluoreszenzsignal. Die Signalintensitäten des DNAzyms der zweiten Generation und der HRP waren vergleichbar.

3.6.4 Nano-Well-Chips

Nach der erfolgreichen Analyse der DNAzyme in dem 96er Mikrotiterplatten-Format wurde der Ansatz durch die Verwendung eines Nano-Well-Chips miniaturisiert. Die Miniaturisierung sollte die Sensitivität des Ansatzes erhöhen und für Multiplexing- und Hochdurchsatz-Ansätze einsetzbar sein.

Die verwendeten Nano-Well-Chips waren aus schwarzem Polypropylen, zeichneten sich durch hohe Resistenz gegenüber Thermobehandlung aus und hatten einen geringen Fluoreszenzhintergrund. 1.024 Kavitäten befanden sich auf einem Chip mit einem maximalen Volumen von 500 nl auf einer Fläche von $40 \times 40 \text{ mm}^2$. Die in dieser Arbeit verwendeten Nano-Well-Chips hatten einen konisch zulaufenden Boden und ein maximales Volumen von 150 nl. Das Auslesen der Chips erfolgte an einem im Haus entwickelten μ PCR-Chip-Auslesegerät.

Alle Lösungen wurden mit Hilfe des Piezo-Dispensers in die Kavitäten gegeben (siehe 2.2.9). Diese Technik erlaubte eine kontaktfreie und zielgenaue Abgabe der Lösungen. Ein Tropfen hatte ein Volumen von $\sim 300 \text{ pl}$.

Die Sensitivität des DNAzymansatzes der Nano-Well-Chips wurde mit dem Oligonukleotid T getestet. Nach der Konformation einer Verdünnungsreihe von 1.000 nM zu 31,25 nM wurde die Amplex Red-Reaktionslösung hergestellt. 150 nl der Lösung wurden pro Kavität des Nano-Well-Chips abgegeben. Direkt nach dem Dispensieren in den Nano-Well-Chip wurde dieser mit Film abgedichtet, um ein Verdampfen des kleinen Volumens zu vermeiden.

Nach einer Stunde Inkubation bei $21 \text{ }^\circ\text{C}$ wurde die katalytische Aktivität in dem μ PCR-Chip-Auslesegerät gemessen. Die Inkubationszeit wurde nach der Zugabe der Probe in die Amplex Red-Reaktionslösung gestartet. Die Abbildung 3.6.4.1 zeigt, dass bis zu 31,25 nM Oligonukleotide T ($2,7 \times 10^{11}$ Moleküle) in 150 nl pro Kavität des Nano-Well-Chip detektiert werden konnten. Der Vergleich der Sensitivität des Amplex Red 96er Mikrotiterplatten-Ansatzes (Abb. 3.4.2.4) mit diesem miniaturisierten Ansatz zeigt, dass eine vierfach gesteigerte Sensitivität erzielt wurde.

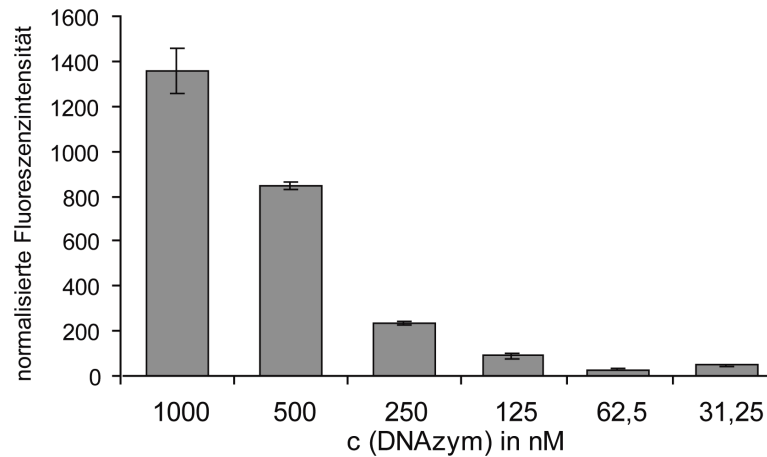


Abbildung 3.6.4.1 | Sensitivität im Nano-Well-Chip. Die Konformation des Oligonukleotids T wurde durchgeführt, gefolgt von der Herstellung einer Verdünnungsreihe. Die in Reaktionspuffer verdünnten Proben wurden zusammen mit der Amplex Red-Reaktionslösung in den Chip mit einem Volumen von 150 nl pro Kavität dispensiert. Der Chip wurde sofort mit PCR-Film verschlossen und nach 1 Stunde wurde die katalytische Aktivität in dem μ PCR-Chip-Auslesegerät gemessen. Die Negativkontrolle unterschied sich nur durch die Abwesenheit von DNS von den Proben. Die DNAzymkonzentration wurde gegen die normalisierte Fluoreszenzintensität aufgetragen. Bis zu 31,25 nM Oligonukleotid T wurden detektiert.

3.6.5 Startmoleküle mit komplementärer DNAzymsequenz

Für die Kombination der DNAzyme mit der RCA wurde ein Startmolekül mit einer komplementären DNAzymsequenz benötigt. Nach dem das Oligonukleotid R mit einer komplementären DNAzymsequenz, welche einem DNAzym der ersten Generation entspricht, designed worden war, erfolgte die Zirkularisierung. Zum Vergleich wurde das Oligonukleotid A neben einer Kontrolle ohne DNS mitgeführt. Beide Oligonukleotide R und A besaßen die gleiche Hybridisierungssequenz für das Oligonukleotid B, welches den Strangschluss für die Ligation vermittelte. Die Startmoleküle wurden mit ExonukleaseVII verdaut. Die Abbildung 3.6.5.1 zeigt ein 2,5 %iges Agarose-Gel der Startmolekülproben, welches mit SYBR Green I gefärbt wurde.

Die Negativkontrolle wies keine Bande im Gel auf. Die Startmoleküle hatten beide eine Bande, die unterhalb der 100 bp Markerbande lief und von den zirkularisierten Oligonukleotiden gebildet wurde. Die Banden hatten in etwa die gleiche Intensität, das bedeutet die Zirkularisierung des Oligonukleotids R war vergleichbar mit der des Oligonukleotids A. Das Oligonukleotid R ließ sich erfolgreich zirkularisieren und wurde für die folgenden RCA-Experimente wie zuvor das Oligonukleotid A als Startmolekül eingesetzt.

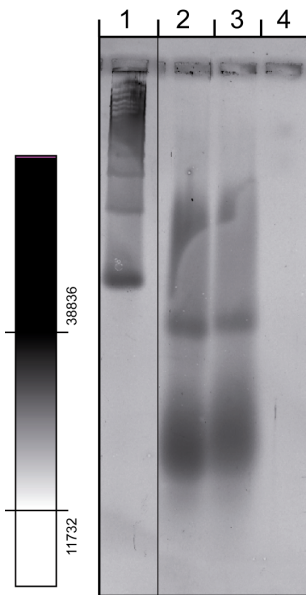


Abbildung 3.6.5.1 | Startmolekül mit komplementärer DNAzymsequenz. Das 2,5 %ige Agarose-Gel gefärbt mit SYBR Green I zeigt in der ersten Spur den 100 bp-DNS-Größenstandard, dessen letzte zusehende Bande die 100 bp Bande darstellte. Nach der Zirkularisierung der Oligonukleotide A und R wurden die Startmoleküle mit ExonukleaseVII verdaut. Diese Proben wurden in die Spur 2 (Startmolekül R) und 3 (Startmolekül A) aufgetragen. In der Spur 3 des Gels wurde die durch alle Behandlungen mitgeführte Negativkontrolle ohne DNS aufgetragen. Für beide Startmoleküle war eine klare Bande zu erkennen, die in etwa die gleiche Intensität hatte.

3.6.6 DNAzyme innerhalb des RCPs

Als nächster Schritt die enzymatische Aktivität des RCPs analysiert. Dafür wurde das Oligonukleotid B als Analyt verwendet um die Eigenschaften der Methode für die Detektion von DNS zu analysieren. Pro Analyt wurde innerhalb von 30 Minuten eine ca. 30.000 Nukleotide²² lange einzelsträngige DNS durch Phi29-Polymerase synthetisiert. Das Startmolekül R hatte eine komplementäre Sequenz zu dem DNAzym. Es entstanden bis zu 1.000 Kopien des DNAzyms pro RCP. Die Hybridisierung des Analyt-Oligonukleotides B an das Startmolekül bildete den Startpunkt der RCA. Sofort nachdem die Phi29-Polymerase zu dem 70 µl RCA-Ansatz (siehe 2.2.5) hinzugegeben worden war (0 Minuten) und nach 30 Minuten Inkubation wurden Proben entnommen. Die Amplifikation wurde durch das Temperieren der Proben auf 75°C für 15 Minuten gestoppt. Auf grund der zuvor durchgeführten Experimente (Abb. 3.6.2.1) wurde erwartet, dass alle synthetisierten DNAzyme innerhalb des RCPs katalytisch aktiv seien. Um diese Annahme weiter zu überprüfen, wurden Aliquote der RCA-Proben enzymatisch verdaut, um einzelne DNAzyme des RCPs zu erhalten. Dafür wurde das Oligonukleotid S innerhalb des RCPs hybridisiert. Der generierte doppelsträngige Bereich innerhalb des RCPs diente als Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym *DdeI*. Aliquote des RCPs und fragmentierte RCPs unterliefen eine Konformation. Danach wurden die Proben zu der Amplex Red-Reaktionslösung gegeben und mit einem Reaktionsvolumen von 150 nl in den Kavitäten des Chips dispensiert. Das Auslesen der Signale erfolgte nach einer Stunde im µPCR-Chip-Auslesegerät bei 21 °C. Eine Probe ohne DNS diente als Negativkontrolle (NK). Der Nano-Well-Ansatz

zeigte eine von der Inkubationszeit der RCA abhängige Zunahme der Peroxidase-Aktivität der DNAzyme im RCP (Abb. 3.6.6.1).

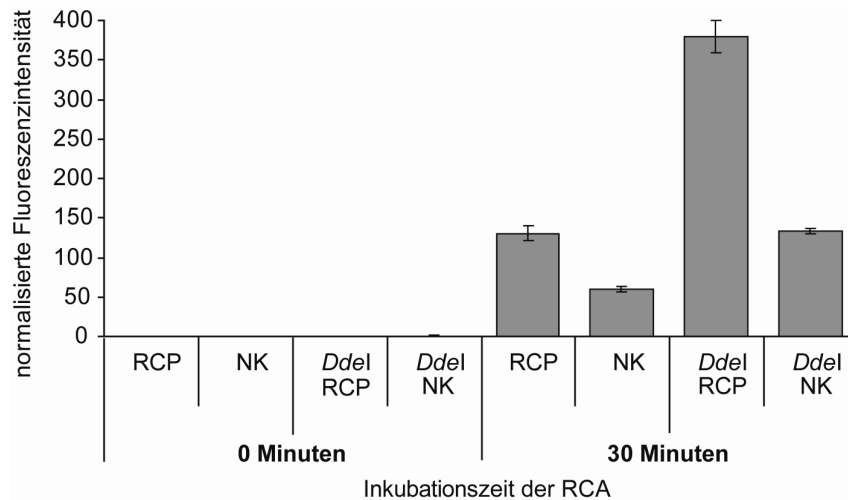


Abbildung 3.6.6.1 | Katalytische Aktivität der multiplen DNAzyme innerhalb des RCPs. Jede dargestellte Negativkontrolle (NK) unterschied sich von der jeweiligen links dargestellten Probe nur durch die Abwesenheit von DNS. Das Startmolekül T wurde an das Analyt-Oligonukleotid B hybridisiert. Dieser doppelsträngige Bereich diente als Startpunkt der RCA. Die Proben wurden während der RCA nach 0 und 30 Minuten genommen und Aliquote davon mittels *Ddel*-Enzym geschnitten. Alle Proben unterliefen eine Konformation und wurden in der Amplex Red Reaktionslösung in einer 384er Mikrotiterplatte verdünnt. Die Proben (1×10^8 Analyt-Oligonukleotide pro Kavität) wurden in den Nano-Well-Chip mit einem Volumen von 150 nl dispensiert. Nachdem der Chip versiegelt wurde, konnten die Fluoreszenzsignale mit dem μ PCR-Chip-Auslesegerät detektiert werden. Die Daten wurden mit dem Wert der Nachweisgrenze für die leeren Kavitäten des Nano-Well-Chips normalisiert. Die Signalintensität nahm mit der Inkubationszeit der RCA zu. Unmittelbar nach dem Start der RCA (0 Minuten) konnte kein Signal detektiert werden. RCA Inkubation von 30 Minuten führte zum Nachweis von katalytisch aktiven DNAzymen innerhalb des RCPs. Das Amplikon der RCA konnte vor und nach dem Schneiden des Stranges in kleinere Fragmente detektiert werden. Die katalytische Aktivität der DNAzyme nahm nach dem enzymatischen *Ddel*-Verdau zu.

Die Proben zum Zeitpunkt 0 Minuten der RCA zeigten kein Signal über der Nachweisgrenze, da zum Zeitpunkt 0 Minuten keine Amplifikation erfolgt sein konnte und dadurch auch keine DNAzyme synthetisiert wurden. Die Signale des RCPs nach 30 Minuten der RCA waren klar über der Nachweisgrenze. 1×10^8 Analytmoleküle B wurden in 150 nl pro Kavität detektiert mit dem RCP und dem geschnittenen RCP. Die Signale des zerschnittenen RCPs waren höher als die der kompletten RCP-Probe. Im Gegensatz zu unserer Annahme unterliefen nicht alle DNAzyme im RCP die Konformation. Es konnte erfolgreich bestätigt werden, dass innerhalb des RCPs katalytisch aktive DNAzyme detektiert werden konnten und ein Zerschneiden des RCPs nicht notwendigerweise erforderlich war für die Ausbildung von aktiven

DNAzymen. Wie angenommen, verstärkte die RCA als Amplifikationsschritt der DNAzyme die Sensitivität des Ansatzes (Abb. 3.6.6.1), verglichen mit dem einfachen DNAzymansatz (Abb. 3.6.1.4) um den Faktor 10^3 . Basierend auf diesen Ergebnissen wurde der folgende Hotpot-Assay entwickelt.

3.6.7 Einfluss der Proteine

Sämtliche Inkubationsschritte, Pipettierschritte bzw. die Handhabung der Proben können bei einem Assay zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen. Der Hotpot-Ansatz sah vor, dass alle Reaktionen ineinandergreifend hintereinander ablaufen in einem homogenen Ansatz. Um sicherzustellen, dass der Rest an Proteinen, der sich in allen RCA-Ansätzen befindet, keinen negativen Einfluss auf die katalytische Aktivität der DNAzyme hatte, wurde ein Experiment mit der Proteinase K durchgeführt. Die Proteinase K baut durch das Spalten der Peptidbindung die Proteine in der Lösung zu einzelnen Aminosäuren ab. Um den Einfluss der Proteine zu testen, wurden verschiedene Ansätze mit dem Oligonukleotid T gewählt, welches eine DNAzymsequenz trug. Der Versuchsaufbau enthielt die HRP und die dazu gehörige Negativkontrolle (NK HRP) zum Normieren der Daten. Als Kontrolle wurde das Oligonukleotid T allein verwendet. Alle angegebenen Negativkontrollen unterschieden sich von der Probe nur durch das Fehlen von DNS. Alle Ansätze enthielten die gleiche Menge an Oligonukleotid T. Um den Einfluss der Proteine zu analysieren, die im Verlauf der Synthese des Startmoleküls bis zur RCA in dem Ansatz angesammelt wurden, wurde eine RCA-Protein Lösung aller anfallenden Proteine hergestellt, welche den Konzentrationen eines Ansatzes entsprachen. In den 5 µl Ansätzen wurden 25 µM Oligonukleotid T mit den Proteinen und der Proteinase K für 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Reaktion gestoppt durch einen Inkubationsschritt bei 95°C für 10 Minuten. Da es sich bei der Proteinase K auch um ein Protein handelt, wurde der Einfluss des zusätzlichen Proteins auch analysiert. Ein Ansatz wurde jeweils direkt nach der Zugabe der Proteinase K auf 95°C für 10 Minuten inkubiert und der Abbau der Proteine damit verhindert. Die Ansätze unterliefen eine Konformation in einem Volumen von 10 µl und wurden zusammen in einem 96er Mikrotiterplatten-Format analysiert mit Amplex Red (Abb. 3.6.7.1).

Durch die Proteine wurden alle Signalwerte im Vergleich zum Oligonukleotid T allein erhöht. Je mehr Proteine in dem Ansatz waren, desto größer wurden die Signale der Probe und der Negativkontrolle (NK). Jedoch ließen sich alle Signale der Probe mit aktiven DNAzymen von den Negativkontrollen unterscheiden. Lässt man die

Proteinase K die RCA-Proteine abbauen, erhöht sich das Signalverhältnis der Probe zur Negativkontrolle von 3:1 auf 4:1.

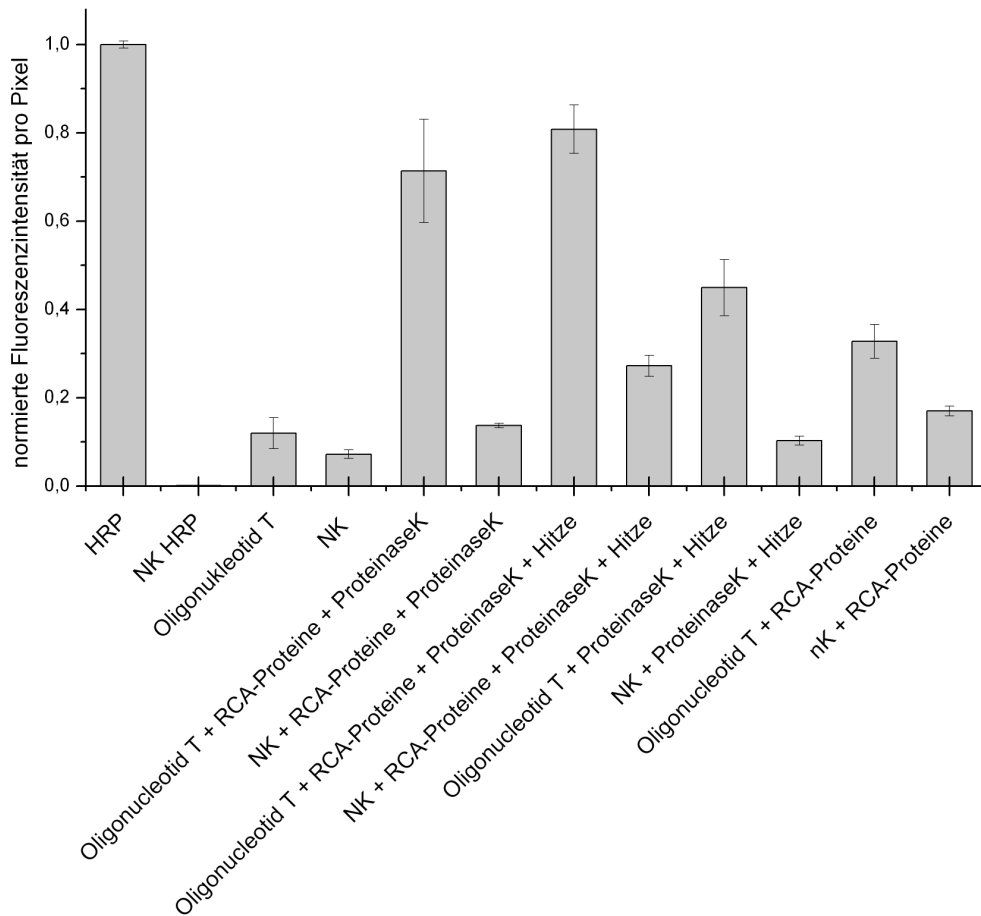


Abbildung 3.6.7.1 | Einfluss der Proteine. Der Einfluss der Proteine auf die DNAzym-Aktivität wurde analysiert. Die verschiedenen Ansätze unterliefen eine Konformation in einem Volumen von 10 μ l und wurden in einem Amplex Red 96er Mikrotiterplatten Format analysiert. Die Daten wurden gegen die Signale der 0,1 Units HRP normiert und in dem Graphen aufgetragen. Die Negativkontrollen (NK) unterschieden sich zur Probe (links von ihnen dargestellt) nur durch das Fehlen von DNS. Alle Ansätze enthielten die gleiche Menge an 400 nM Oligonucleotid T. Um den Einfluss der Proteine, der RCA und der Startmolekülsynthese zu analysieren, wurde eine RCA-Protein-Lösung hergestellt, welche den Proteinkonzentrationen eines RCA-Reaktionsansatzes entsprachen. In den Proteinase K-Ansätzen wurden 25 μ M Oligonucleotid T mit den Proteinen und 0,4 Units Proteinase K für 1 1/2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch einen Temperaturschritt bei 95°C für 10 Minuten beendet. Der Einfluss des Proteins Proteinase K wurde auch in einem Ansatz analysiert, in dem direkt nach Zugabe der Proteinase K für 10 Minuten auf 95°C erhitzt und der Abbau der Proteine damit verhindert wurde. Für alle Proben wurde ein Fluoreszenzsignal gemessen.

Die in der Lösung vorhandenen Proteine hatten einen Einfluss auf die Signalhöhe, wobei die DNAzym-Aktivität jedoch nicht negativ beeinflusst wurde. Diese Ergebnisse unterstrichen, dass eine Aufreinigung der Proben, um die vorhandenen Proteine zu

entfernen, nicht notwendig war, da die Aktivität der DNAzyme nicht maßgeblich negativ beeinflusst wurde.

3.7 Hotpot-Ansatz

Die Hotpot-Reaktion beschreibt eine mehrstufige Reaktionsfolge, bei welcher die Reaktionen (RCA, Konformation und Substratumsatz) in einer Kavität in aufeinanderfolgend ineinandergreifen. Die Hybridisierung des Analyten an das Startmolekül war die Voraussetzung für diese Reaktion. Die RCA startete und die neu synthetisierten DNAzyme im RCP konnten sofort konformiert werden. Der Formierung der DNAzyme folgte der kontinuierliche Substratumsatz in der gleichen Kavität. Währenddessen lief die RCA weiter. In der Abbildung 3.7.1 wurde dieser Ansatz im Nano-Well-Chip illustriert.

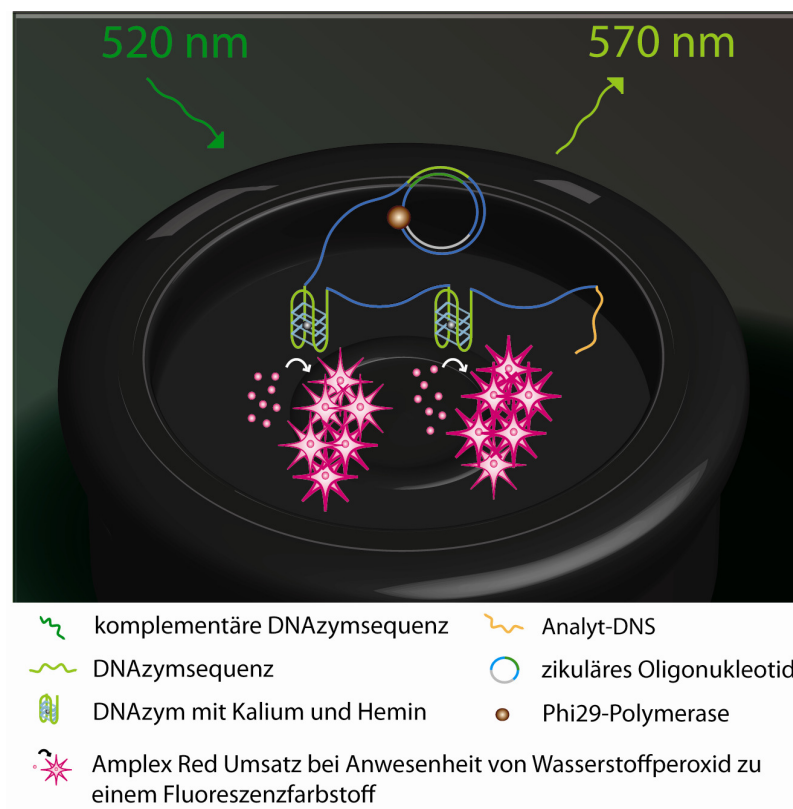


Abbildung 3.7.1 | Schema vom Hotpot-Assay. Während des Hotpot-Assays erfolgten alle Reaktionen aufeinander aufbauend. Ein Nano-Well-Chip mit 1.024 Kavitäten wurde für diesen Assay verwendet. Jede Kavität stellt einen unabhängigen Reaktionsraum dar. Alle beteiligten Substanzen wurden in den Chip dispensiert. Durch die Mischung der Startmoleküle mit dem hybridisierten Analyten in der Reaktionslösung wurde die RCA gestartet und das RCP wurde synthetisiert. Die synthetisierten DNAzyme in dem RCP wurden einer Konformation unterzogen, und die katalytisch aktiven DNAzyme setzten das Substrat Amplex Red um. Das Produkt, ein Fluoreszenzfarbstoff wurde in dem μ PCR-Chip-Auslesegerät gemessen.

Die Hotpot-Reaktion erlaubt es, Analysen in einer homogenen Lösung durchzuführen, wobei kovalente Markierungen der Proben für den Nachweis nicht nötig waren. Dadurch wird der Ansatz deutlich vereinfacht. Mit dem Hotpot-Ansatz sind Hochdurchsatzexperimente in kleinen Volumina in den Nano-Well-Chips durchzuführen. Zur Etablierung des Nano-Well-Ansatzes wurden zunächst Experimente im größeren Maßstab der 96er Mikrotiterplatte durchgeführt.

3.7.1 Einfluss von Hemin und DMSO auf die RCA

Alle beteiligten Substanzen im Hotpot-Ansatz wurden einzeln auf ihren Einfluss auf die RCA-Reaktion und die DNAzym-Aktivität getestet. Für alle Komponenten außer Hemin konnte kein negativer Einfluss ermittelt werden. Daher wurde die Wirkung von Hemin und seinem Lösungsmittel DMSO auf das RCP in einem 35 µl RCA-Ansatz (siehe 2.2.5) mit 5,5 pmol Startmolekül V mit dem hybridisierten Analyt-Oligonukleotid B nach 30 Minuten Amplifikation untersucht. Die Reaktion wurde durch das Temperieren der Probe auf 95°C für 15 Minuten beendet. Hierbei hatte ein Ansatz zur Kontrolle kein Hemin und DMSO. Jeweils ein Ansatz hatte eine 50 µM Hemin Konzentration durch eine 8,6 mM und eine 25,8 mM Hauptlösung in DMSO. Reines DMSO ohne Hemin wurde in die RCA-Ansätze gegeben mit einem Anteil von 0,025 %, 0,1 % und 0,3 % im gesamten Ansatz. Die gesamte Probe wurde in einem 8 %iges Acrylamid/Bisacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 3.7.1.1).

Das Lösemittel DMSO führte zu einer reduzierten Menge an RCP. Da Hemin nur in DMSO löslich war, wurde der Einfluss durch die Verwendung einer höheren Konzentration an Hemin in der Hauptlösung minimiert. Damit nimmt das DMSO-Volumen ab, welches zum Konformationsansatz gegeben werden muss, um eine bestimmte Hemin Konzentration zu erreichen.

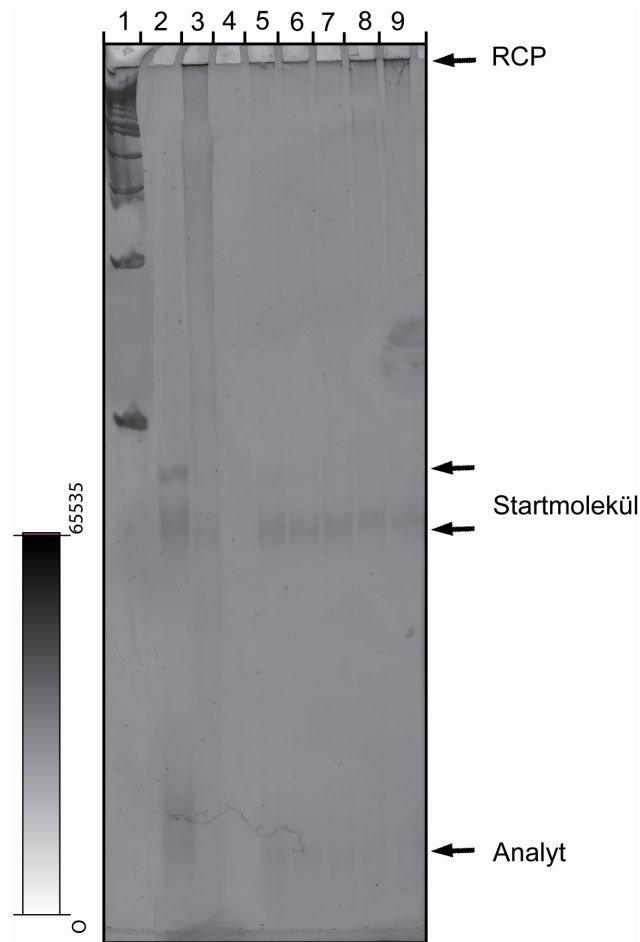


Abbildung 3.7.1.1. I SYBR Gold gefärbtes 8 %iges Acrylamid/Bisacrylamid-Gel. In der ersten Spur des Gels wurde der 100 bp Marker aufgetragen. In der zweiten Spur befanden sich 10 pmol des eingesetzten Startmoleküls V, gefolgt von der Spur mit der RCA mit 5,5 pmol Startmolekül V und dem hybridisierten Analyt-Oligonukleotid B. Jeweils die gesamte Probe wurde aufgetragen. Die Negativkontrolle der RCA ohne DNS wurde in der Spur 4 aufgetrennt. Die RCA-Ansätze mit den Zusätzen an Stocklösung von 8,6 mM Hemin (5) und von 25,8 mM Hemin (6) wurden mit 0,025 % DMSO (7), 0,1% DMSO (8) und 0,3% DMSO (9) der Reihenfolge nach in den Spuren des Gels aufgetragen. DMSO hatte einen Einfluss auf die RCA.

3.7.2 Hotpot-Ansatz in einer 96er Mikrotiterplatte

In diesen Experimenten wurde der Hotpot-Ansatz in einer 96er Mikrotiterplatte etabliert (siehe 2.2.8). Die Zugabe aller Lösungen erfolgte in einer speziellen Reihenfolge, die während aller Experimente beibehalten wurde. Durch die Zugabe der RCA-Reaktionslösung zu dem Startmolekül mit dem hybridisierten Analytmolekül wurde der Versuch gestartet. Nach erfolgten Kontrollen wurde ein Hotpot-Ansatz durchgeführt. Experimente hatten gezeigt, dass ein Temperaturschritt für eine erfolgreiche Konformation nicht notwendigerweise erfolgen muss (Ergebnisse nicht gezeigt). Daher konnte im Hotpot-Assay auf den Temperaturschritt verzichtet werden, um die Aktivität der Phi29-Polymerase weiter beizubehalten. In einem 70 μ l Hotpot-Ansatz (siehe

2.2.8) wurden 157 nM Analytmolekül B hybridisiert an das Startmolekül V gegeben, was $6,6 \times 10^{12}$ Molekülen entsprach. Dabei wurden verschiedene Kontrollen des Hotpot-Ansatzes mitgeführt. Eine Kontrolle hatte keine DNS, eine weitere entsprach der 70 μ l RCA mit Wasserstoffperoxid. Für die Amplex Red-Reaktion selbst wurde eine Kontrolle mit 0,1 Units HRP mitgeführt. Die Reaktionslösungen wurden in eine 96er Mikrotiterplatte pipettiert und mittels FLA-5100 Gerät detektiert (siehe 2.2.8) über einen Zeitraum von 20 bis 120 Minuten bei 21 °C gemessen. In der Abbildung 3.7.2.1 wurden die Signale des vollständigen Hotpot-Ansatzes über den Verlauf der Inkubationszeit des Hotpot dargestellt. Die Signale der RCA-Kontrollen waren alle unterhalb der Nachweisgrenze. Für die HRP war ein Signal zu messen.

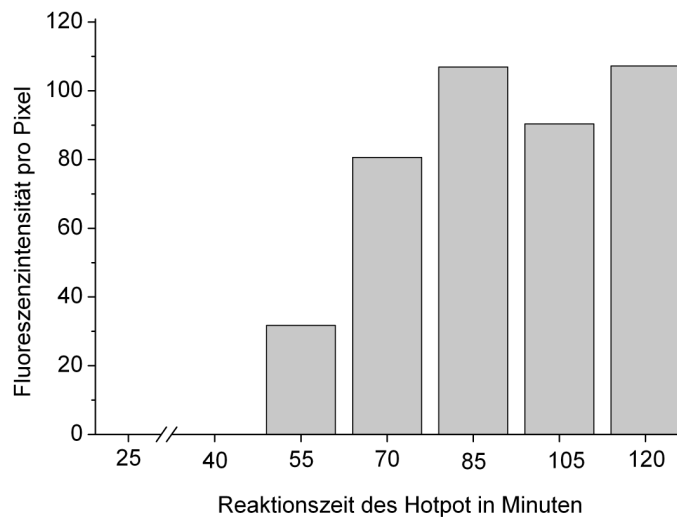


Abbildung 3.7.2.1 | Hotpot-Assay im 96er Mikrotiterplatten Ansatz. In einem 70 μ l Reaktionsansatz wurde der Amplex Red-Hotpot-Assay mit 7×10^{12} Analytmolekülen B und Startmolekülen V pro Kavität durchgeführt. Die Negativkontrolle enthielt keine DNS. Die Fluoreszenzintensität der Proben wurde bei 21 °C über die Inkubationszeit gemessen. In diesem Experiment wurde nur eine RCA-Probe gemessen. Die Daten wurden normalisiert gegen die Nachweisgrenze und gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Nach 40 Minuten Inkubation konnte kein Signal nachgewiesen werden. Das erste Signal trat nach 55 Minuten Inkubation auf und nahm mit der Zeit zu.

Nach 55 Minuten konnte ein Signal des Hotpot-Ansatzes detektiert werden, das danach beständig zunahm. Dieser Zeitverzug, bis ein Signal gemessen werden konnte, trat auf, da die RCA und die Konformation bis zu einem detektierbaren Substratumsatz erfolgen müssen. Dies war die Voraussetzung für die katalytische Aktivität der DNAzyme im RCP, welches dann in einem messbaren Substratumsatz resultierte. Vorher gehende Experimente hatten gezeigt, dass die Konformation selber 30 Minuten benötigt, bis ein Substratumsatz gemessen werden kann (Abb. 3.6.1.1). Nach dem

Hotpot-Assay wurden die Proben heraus pipettiert, und durch Temperieren auf 95 °C für 15 Minuten wurde die Reaktion gestoppt.

Nach dem Hybridisieren eines weiteren Primers konnte eine *Ddel*-Restriktionserkennungssequenz generiert werden. Der Verdau führte zu einer Fragmentierung des RCPs in einzelne DNAzyme. Ein Aliquot (11 µl) jeder Probe entsprach 1,7 pmol Startmolekülen und wurde mit 150 pmol Oligonukleotid S gemischt und einer Hybridisierung unterzogen (2.2.1). Zu dem Ansatz wurden 10 Units *Ddel*-Restriktionsenzym und 10x NEB Puffer 3 gegeben. Die Restriktion erfolgte über Nacht bei 37 °C. Die Restriktionsenzymaktivität wurde durch das Temperieren der Proben auf 75 °C für 20 Minuten beendet.

Je 5 µl der Restriktionsproben (0,57 pmol Startmolekül) wurde mit 1 µl Glycerin versetzt. Je 3,67 µl (0,57 pmol Startmolekül) der Original-RCA-Proben wurden ebenfalls mit je 1 µl Glycerin versetzt und auf 6 µl mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt. Diese präparierten Aliquote wurden in einem 2,5 %igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, mit SYBR Gold gefärbt und die DNS detektiert (Abb. 3.7.2.2).

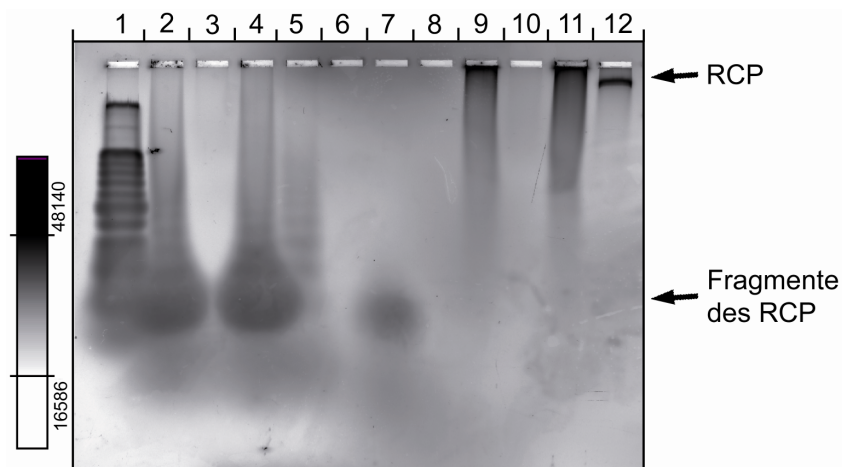


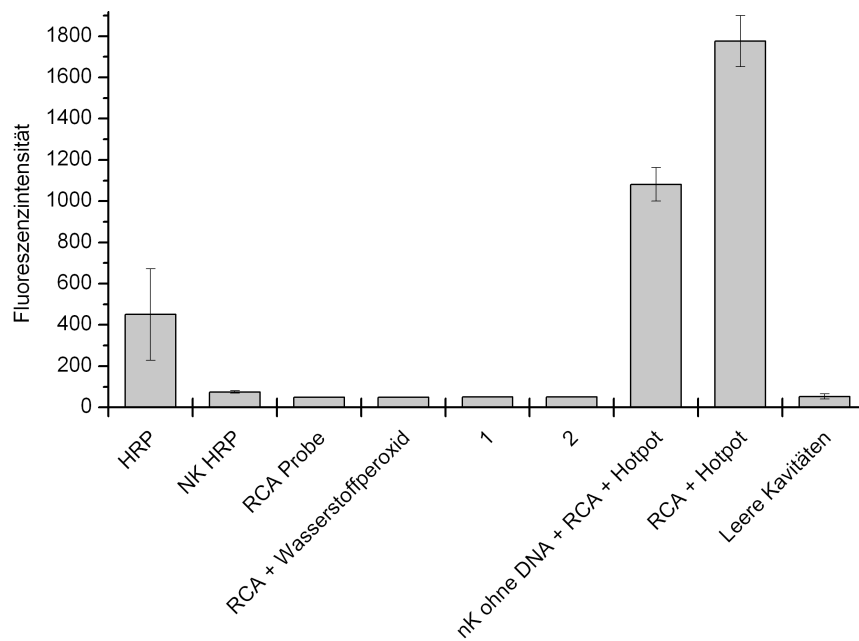
Abbildung 3.7.2.2 | Restriktionsmuster des Hotpot-Ansatzes. In einem SYBR Gold gefärbten 2,5 %igen Agarose-Gel wurden die Hotpot-Proben aufgetrennt. In der 1. Spur befand sich der 100 bp Marker. Jede aufgetragene Hotpot-Probe enthielt 0,57 pmol Startmolekül V mit Analyt-Oligonukleotid B. In den folgenden Spur befanden sich die Aliquots der jeweiligen Proben RCA, keine DNS + Hotpot, RCA + Wasserstoffperoxid und Hotpot des Hotpot-Assays, der in einer 96er Mikrotiterplatte durchgeführt worden war, welche einer Restriktion mit dem Enzym *Ddel* unterzogen worden waren. Die Restriktionsproben enthielten zusätzlich 50 pmol Oligonukleotid S. Die Spur 6 enthielt 10 pmol Oligonukleotid S, gefolgt von 10 pmol Oligonukleotid V. 10 pmol des Oligonukleotides B wurden in der 8. Spur aufgetrennt. In den Spuren 9 –12 wurden die 4 unverdauten Aliquots der Proben RCA, keine DNS + Hotpot, RCA + Wasserstoffperoxid und Hotpot des Hotpot-Assays aufgetragen.

Schon vor dem Restriktionsverdau als auch nach dem Schneiden ließen sich klar RCPs im Gel erkennen. Damit war der Beweis erbracht worden, dass die RCA im Hotpot-Ansatz funktionierte und aktive DNAzyme im RCP in Echtzeit konformiert werden konnten und in der Lage waren, ein Substrat umzusetzen, dessen Produkt nachgewiesen werden konnte.

3.7.3 Miniaturisierung des Hotpot-Ansatzes

Der Hotpot-Assay wurde durch die Übertragung des etablierten 96er Mikrotiterplatten-Ansatzes auf den Nano-Well-Chip miniaturisiert. Die Miniaturisierung geht einher mit einem geringeren Probenverbrauch und der Möglichkeit zur simultanen Analyse vieler Proben in den 1.024 Kavitäten des Nano-Well-Chips.

Verschiedene Kontrollen wurden auf dem Chip mitgeführt. Aus einer 384er Mikrotiterplatte in der 70 µl Hotpot-Ansätze (siehe 2.2.9.2) vorlagen, wurde der Chip mit dem Piezo-Dispenser befüllt. Die Ansätze enthielten 11 pmol Startmolekül V. Das Startmolekül wurde an 11 pmol Analyt-Oligonukleotid B nach dem Protokoll (siehe 2.2.1) hybridisiert. Bei den jeweiligen Kontrollen wurde die fehlende Substanz durch die Zugabe von bidestilliertem Wasser ersetzt, so dass alle Proben in einem 70 µl-Ansatz vorlagen. Neben dem Hotpot-Ansatz wurde ein weiterer Ansatz verfolgt, um die RCA-Produkte durch die direkte Zugabe von SYBR Gold in den RCA-Ansatz zu detektieren. Dafür wurde ein 70 µl RCA-Ansatz mit 1 µl der SYBR Gold Farbstoffes (siehe 2.2.4) versehen. Nach dem Dispensieren von 75 nl jedes Ansatzes in den Chip wurde dieser versiegelt und nach insgesamt einer Stunde bei 21 °C wurde der Chip im µPCR-Chip-Auslesegerät analysiert (Abb. 3.7.3.1). Die SYBR Gold RCA-Probe und die dazugehörige Negativkontrolle ohne DNS zeigten beide kein Signal und wurden in der Abbildung nicht aufgeführt.



1: RCA + Wasserstoffperoxid + Konformationspuffer + Hemin

2: RCA + Wasserstoffperoxid + Konformationspuffer + Hemin + Reaktionspuffer

Abbildung 3.7.3.1 | Miniaturisierung des Hotpot-Ansatzes. Ein 70 μ l Hotpot-Ansatz (11 pmol Startmolekül V mit hybridisierter Analyt-DNS B) wurde von einer 384er Mikrotiterplatte in einen Nano-Well-Chip mit einem Volumen von 75 nl je Kavität dispensiert. Hier wurden nach einer Stunde Inkubation bei 21 $^{\circ}$ C die technischen Triplikate analysiert und gegeneinander aufgetragen. 0,1 Unit HRP wurden mitgeführt als Positivkontrolle. Der Versuch enthielt den RCA-Ansatz und einen RCA-Hotpot-Ansatz. Zur Kontrolle gab es Ansätze mit dem RCA-Reaktionsansatz und Wasserstoffperoxid, Wasserstoffperoxid und Konformationspuffer mit Hemin und einen Ansatz mit Wasserstoffperoxid, Konformationspuffer mit Hemin und Reaktionspuffer. Eine zusätzliche Negativkontrolle (NK) enthielt den RCA-Hotpot-Ansatz ohne DNS. Das Signal des RCA-Hotpot-Ansatzes hatte den höchsten Wert.

Nach 60 Minuten Inkubation konnte zwischen den Negativkontrollen (NK) und der RCA-Hotpot-Probe unterschieden werden. Die Kontrollen der RCA hatten alle Signale im Bereich der Signale der leeren Kavitäten. Für die RCA-Hotpot-Negativkontrolle ohne DNS wurden Signale unterhalb des RCA-Hotpot-Probe gemessen. In einem Volumen von 75 nl wurde ein Signal des Hotpot bei einer Menge von 11,8 fmol eingesetzter Analytmolekülen B pro Kavität gemessen. Um diese Ergebnisse weiter zu verifizieren wurden die Probenansätze direkt nach dem Dispensieren in den Nano-Well-Chip aus der 384er Mikrotiterplatte pipettiert und durch Temperieren der Proben auf 95 $^{\circ}$ C für 10 Minuten wurden die Reaktionen gestoppt. Jeweils 5 μ l Aliquote der Probe wurden auf einem 2,5 %igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit SYBR Green I gefärbt (3.7.3.2).

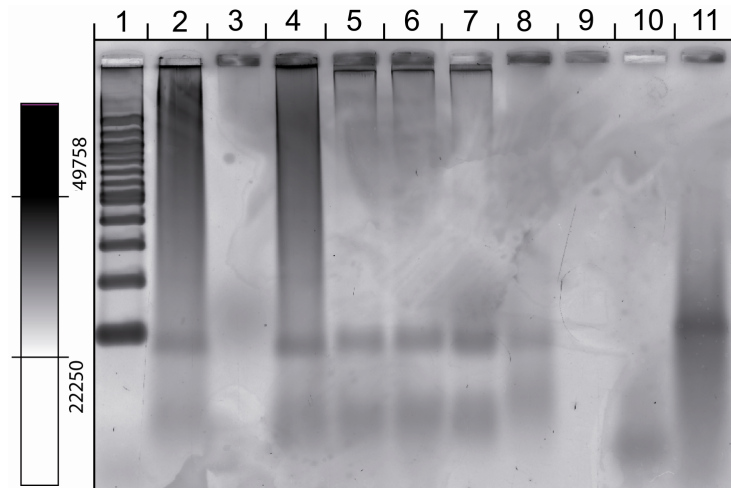


Abbildung 3.7.3.2 | SYBR Green I gefärbtes 2,5 %iges Agarose-Gel des Hotpot-Ansatzes. In diesem Gel wurden die 5 μ l RCA Hotpot-Aliquots nach einer Stunde Inkubation bei 21 °C aufgetragen. In der ersten Spur befand sich der 100 bp-Marker. In der Spur 2 wurde der RCA-Ansatz, gefolgt von der Negativkontrolle des Hotpot-Ansatzes ohne DNS (3) aufgetragen. Die vierte Spur beinhaltet den RCA-Ansatz und Wasserstoffperoxid, und die nächste Spur (5) enthielt neben dem Wasserstoffperoxid den 2x Konformationspuffer mit Hemin. In der 6. Spur befanden sich alle RCA-Hotpot-Substanzen, abgesehen von dem Amplex Red. Die Gelspur 7 enthielt den vollständigen RCA Hotpot-Ansatz. In den Spuren 8 und 9 wurden die RCA-Ansätze mit dem SYBR Gold aufgetragen und die dazugehörige Negativkontrolle ohne DNS. Die vorletzte Spur (10) enthielt 10 pmol Analyt-Oligonukleotid B gefolgt von 10 pmol Oligonukleotid V in der Spur 11.

Für den SYBR Gold-Ansatz ließ sich kein Produkt der RCA im Gel (Spur 8) nachweisen. Im Gel wurden für alle RCA-Hotpot-Ansätze RCPs nachgewiesen. Die Fluoreszenzmesdaten der Substratumsätze der DNAzyme im RCP (Abb. 3.7.3.1) wurden bestätigt. Der Hotpot wurde erfolgreich miniaturisiert auf 75 nl im Nano-Well-Chip.

Nach den positiven Ergebnissen der Miniaturisierung des Hotpot-Ansatzes wurden verschiedene Volumina getestet. Das Ziel dieser Analyse war, das effizienteste Verhältnis zwischen Volumen und Signalintensität der DNAzyme innerhalb des RCPs zu ermitteln. Dafür wurden 100 nl, 75 nl, 50 nl und 25 nl Reaktionsvolumina in einem Nano-Well-Chip dispensiert. 35 μ l Hotpot-Ansatz (siehe 2.2.9.2) wurde aus einer 384er Mikrotiterplatte zum Testen der verschiedenen Volumina verwendet. Der 35 μ l-Ansatz enthielt 5,5 fmol Startmolekül V, welches mit der gleichen Menge an Oligonukleotid B zuvor eine Hybridisierung unterlief. Als Negativkontrolle für den Hotpot-Ansatz wurde eine DNS-freie Probe verwendet, welche den gleichen Behandlungen unterzogen worden war wie das Startmolekül. Das bedeutet, dass die gleiche Anzahl an Proteinen und die gleiche Pufferzusammensetzung in der Negativkontrolle vorhanden war. Da die vorherigen gehenden Experimente

(Abb. 3.6.7.1) einen Einfluss der Proteine auf die Signalhöhe gezeigt hatten, sollte so der Wert der Nachweisgrenze die eigentliche DNAzym-Aktivität aufzeigen. Nach einer Inkubationszeit von 105 Minuten wurden die Signale der technischen Triplikate im μ PCR-Chip gemessen. Die Daten wurden über die Nachweisgrenze normalisiert (Abb. 3.7.3.3).

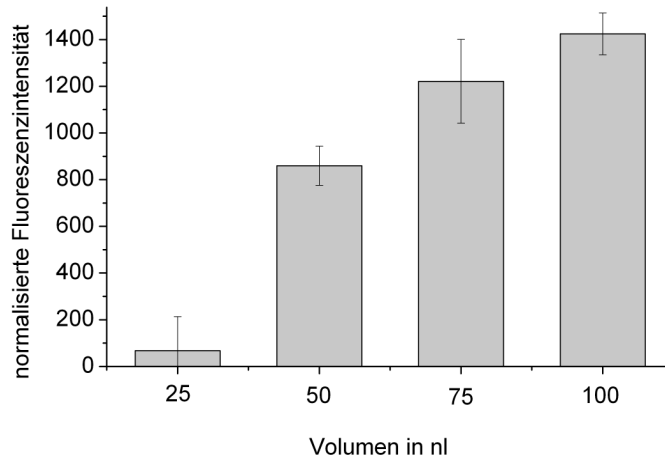


Abbildung 3.7.3.3 | Verschiedene Volumina im Nano-Well-Chip. Ein 35 μ l Hotpot-Ansatz wurde in die Kavitäten des Nano-Well-Chips dispensiert in 25 nl, 50 nl, 75nl und 100 nl. 5,5 fmol Startmolekül V mit hybridisiertem Analyt-DNS B lagen in dem 35 μ l-Ansatz vor. In den Kavitäten hatten sich nur die Volumina geändert und nicht die Zusammensetzung der Probe. Die Daten der technischen Replikate wurden über die Nachweisgrenze der jeweiligen Volumina der Negativkontrolle normalisiert. Die Negativkontrolle unterschied sich nur durch die Abwesenheit von DNS von den Hotpot-Proben. Alle verwendeten Volumina zeigten ein Signal.

Die verschiedenen Volumina zeigten alle ein Signal. Theoretisch müsste die Signalintensität mit dem Volumen korrelieren, also bei jeder Stufe um den Faktor der Volumenzunahme ebenfalls zunehmen. Dies war nur für die 50 nl zu 75 nl und 75 nl zu den 100 nl Proben der Fall. Die größte Differenz wurde bei 25 nl zu 50 nl ermittelt. Das Volumen von 25 nl war zu gering. Mit 50 nl Probenvolumen wurde die untere Grenze des Volumens für den Hotpot-Ansatz erreicht. Hier befand sich eine Konzentration von 0,16 nM Analyt-DNS B in den 50 nl pro Kavität. Dies entsprach 6×10^5 Molekülen Analyt-DNS.

Auf Grund der geringen Volumina wurden verschiedene Ansätze ausprobiert, um dem Verdampfungseffekt während des Dispensierens vorzubeugen. Direkt nach dem Dispensieren wurde der Chip verschlossen, so dass es während der Messung zu keinem Verlust kommen konnte.

Ein Ansatz sah vor, Mineralöl in den Nano-Well-Chips zu verwenden. Da sich das Mineralöl nicht mit dem Piezo-Dispenser abgeben ließ, wurden die Nano-Well-Chips mit Hilfe von 2 Objektträgern mit je 0,5 µl Mineralöl von zwei Seiten bestrichen. Dabei wurde eine Ecke des Chips ausgespart. In dieser Mineralölfreien Ecke wurden die gleichen Proben dispensiert wie in den Kavitäten mit Mineralöl.

Um zu testen, ob das Mineralöl ein Problem beim Substratumsatz der DNAzyme darstellte, wurden zunächst die Oligonukleotide T und U konformiert. Die Amplex Red-Reaktionslösung (siehe 2.2.9.2) wurde mit 12,5 µM der Oligonukleotide in einem Endvolumen von 50 µl aus der 384er Mikrotiterplatte in die mit Mineralöl präparierten Chips dispensiert. 50 nl des Reaktionsansatzes wurden abgegeben und der Substratumsatz wurde über den entstanden Fluoreszenzfarbstoff detektiert. Als Negativkontrolle (NK) wurde der Ansatz ohne DNS verwendet. Die Fluoreszenzintensitäten der Proben mit und ohne Mineralöl wurde in Abbildung 3.7.3.4 aufgetragen.

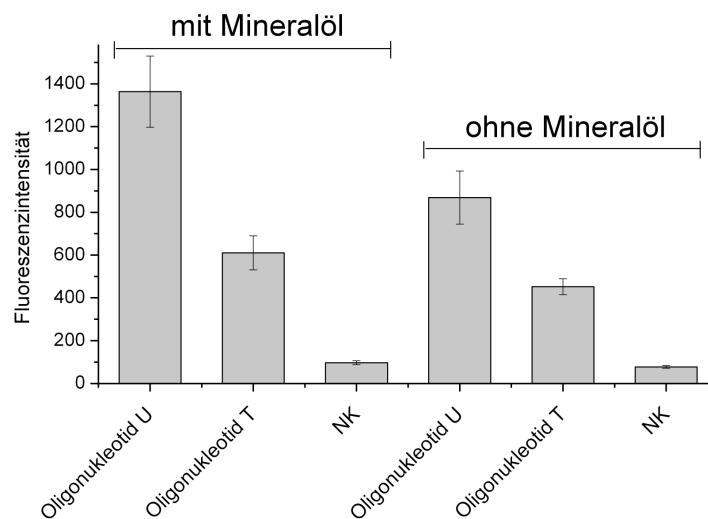


Abbildung 3.7.3.4 | DNAzyme in Mineralöl. Aus einem 50 µl DNAzymansatz mit 12,5 µM konformierten Oligonukleotiden U und T wurden 50 nl in die Kavitäten des Nano-Well-Chips gegeben. Die Aktivität der DNAzyme U und T wurde in Mineralöl und ohne Mineralöl auf einem Nano-Well-Chip detektiert über den umgesetzten Fluoreszenzfarbstoff. Die jeweilige Negativkontrolle (NK) unterschied sich von den Proben nur durch das Fehlen von DNS.

Die Nachweisgrenze der Proben in Mineralöl war höher als für die Proben ohne Mineralöl pro Kavität. Die Proben mit Mineralöl hatten eine höhere Signalintensität als die Proben ohne Mineralöl. Damit relativiert sich die hohe Nachweisgrenze für das Mineralöl. Es konnte keine Beeinträchtigung des Amplex Red-Substratumsatzes durch

das Mineralöl verzeichnet werden. Daher erfolgte in dem nächsten Schritt die Kombination des Hotpot-Ansatzes mit Mineralöl.

Für den Hotpot-Ansatz in Mineralöl wurden von 5,5 fmol Startmolekül Oligonukleotid R mit hybridisierter Analyt-DNS B in einem 35 μ l Reaktionsvolumen in 50 nl in die Kavitäten des Nano-Well-Chips mit Mineralöl und ohne Mineralöl dispensiert. Der Nano-Well-Chip wurde mit Hilfe von 2 Objektträgern mit je 0,5 μ l Mineralöl von zwei Seiten bestrichen und dann mit Mineralöl befüllt. Eine Ecke des Chips blieb von dem Mineralöl für die Mineralölfreien Kontrollproben ausgespart. Dieser Chip wurde nach dem Dispensieren nicht mit PCR-Film versiegelt. Die Messungen der Fluoreszenzintensitäten des Chips erfolgten über 30 Minuten nach 100 Minuten Inkubationszeit. Die Inkubationszeit war durch die Dauer des Dispensierens bedingt. Die Proben wurden in der Abbildung 3.7.3.5 miteinander verglichen.

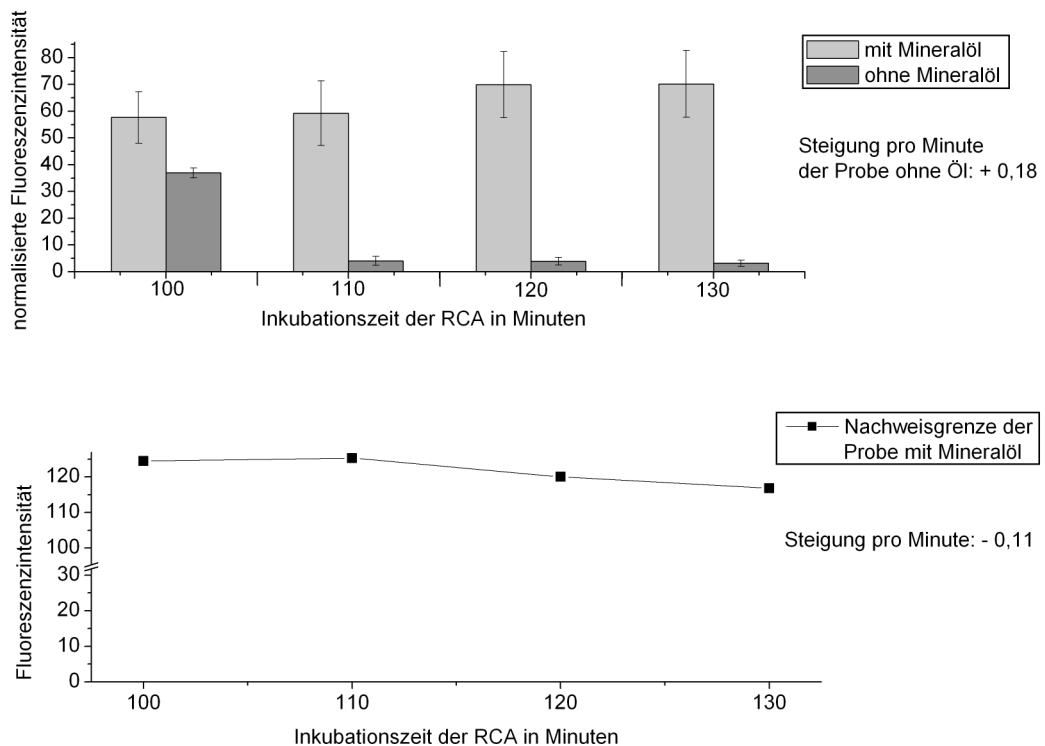


Abbildung 3.7.3.5 | Mineralöl versus Mineralölfrei. Aus einem 35 μ l Hotpot-Ansatz mit 5,5 fmol Startmolekül R und der gleichen Menge an hybridisierter Analyt-DNS B wurden 50 nl der Probe in die Kavitäten des Nano-Well-Chips mit und ohne Mineralöl dispensiert. Die Nachweisgrenzen wurden über Negativkontrollen mit und ohne Mineralöl bestimmt. Die Negativkontrollen unterschieden sich von den Proben nur durch das Fehlen von DNS. Die normalisierten Fluoreszenzintensitäten der Hotpot-Proben mit Mineralöl und ohne Mineralöl wurden in der oberen Abbildung nach der Inkubationszeit aufgetragen. Die Signale der Probe ohne Mineralöl fielen mit der Zeit ab, und die mit Mineralöl zeichneten sich durch eine Steigung von +0,18 des Fluoreszenzsignals pro Minute aus. In der unteren Abbildung wurde der Verlauf der Nachweisgrenze über die Zeit dargestellt. Diese nahm mit der Zeit ab, bei einer Steigung von -0,11 des Fluoreszenzsignals pro Minute.

Die Fluoreszenzsignale der Probe in Mineralöl waren höher als die der Probe ohne Mineralöl. In Anbetracht der Standardabweichung konnte keine Zunahme der Signalintensität detektiert werden. Die Signale der Proben ohne Mineralöl nahmen mit der Zeit rapide ab, wahrscheinlich trocknete die Probe ohne Mineralöl aus. Die Steigung des Fluoreszenzsignals pro Minute lag bei +0,18, wobei die Nachweisgrenze der Proben in Mineralöl über die Zeit um eine Steigung von -0,11 Fluoreszenzsignal pro Minute abnahm. Das Mineralöl stabilisierte die Signale, führte jedoch nicht zu einer starken Zunahme des Signals wie sie durch eine kontinuierliche RCA in Anbetracht der zuvor gehenden Ergebnisse des Hotpot-Ansatzes in der 96er Mikrotiterplatte (Abb. 3.7.2.1) zu erwarten gewesen wäre .

Da unter anderem durch das einstreichen des Mineralöls, keine genaue Volumenangaben für die Experimente gemacht werden konnte, wurde ein alternativer Ansatz zu dem Mineralöl unternommen, die Verdampfung der Probe während des Dispensierens zu minimieren. Die Verdampfung während der Messung konnte durch Verschließen des Nano-Well-Chips direkt nach dem Dispensieren der Proben verhindert werden. Abhängig von der Anzahl der abzugebenden Proben, dauerte das Dispensieren der Hotpot-Ansätze zwischen 20 und 35 Minuten. Daher wurde die Nano-Well-Chip-Halterung während des Abgebens der Proben auf 17°C gekühlt und die Umgebungstemperatur wurde immer auf 21 °C eingestellt.

Für den Hotpot-Ansatz wurden 5,5 fmol Startmolekül Oligonukleotid V und die gleiche Menge an hybridisierter Analyt-DNS B in ein 35 µl-Reaktionsvolumen gegeben und 50 nl von der resultierenden Lösung in die Kavitäten des Nano-Well-Chips dispensiert. 250 nM konformierte Oligonukleotide T in einer 50 µl Amplex Red Reaktionslösung wurden ebenfalls mit je 50 nl in den Chip dispensiert. Die Negativkontrollen der jeweiligen Proben unterschieden sich nur durch das Fehlen von DNS. Die Analyse der Proben erfolgte nach 60 Minuten Inkubationszeit für 80 Minuten. Die Messergebnisse wurden in der Abbildung 3.7.3.6 dargestellt.

Die Proben waren über die Zeit von 80 Minuten sehr stabil. Der Substratumsatz des Oligonukleotids T war stabil, da die Abnahme der normalisierten Signale auf die Zunahme der Nachweisgrenze zurückging. Der Substratumsatz des Oligonukleotids T hatte hier ein Plateau, da das µPCR-Chip-Auslesegerät die Grenze zur Detektion erreicht hatte. Die Nachweisgrenze konnte durch den geringen spontanen Substanzumsatz mit der Zeit zunehmen und führte zu den widersprüchlichen Ergebnissen für das Oligonukleotid T.

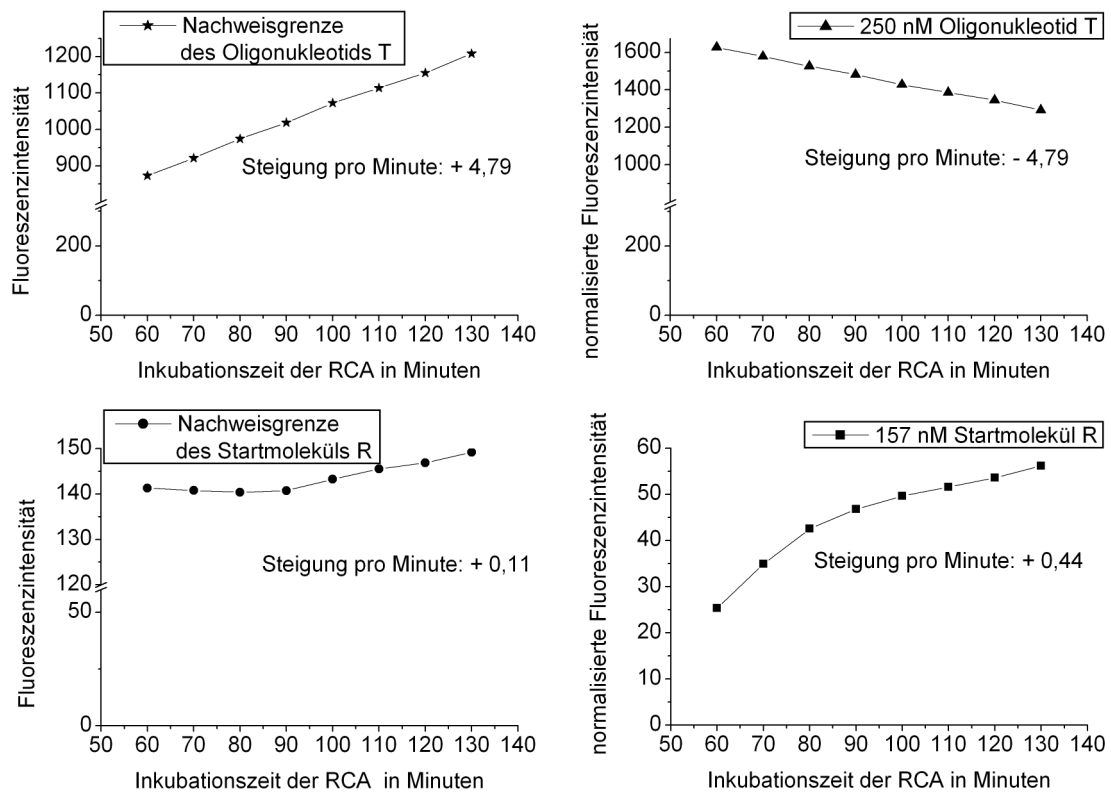


Abbildung 3.7.3.6 | Gekühlte Nano-Well-Chips. Ein Hotpot-Ansatz mit 5,5 fmol Startmolekül Oligonukleotid R und der gleichen Menge an hybridisierter Analyt-DNS B in einem 35 μ l-Reaktionsvolumen wurden in die Kavitäten des Nano-Well-Chips mit einem Volumen von 50 nl dispensiert. Das Oligonukleotid T wurde konformiert und mit einer Konzentration von 250 nM in einer 50 μ l Amplex Red-Reaktionslösung mit je 50 nl in den Chip dispensiert. Der Nano-Well-Chip wurde während des Dispensierens auf 17°C gekühlt. Nach einer Stunde Inkubation wurde eine Messreihe über 80 Minuten aufgenommen. Die Negativkontrollen der jeweiligen Proben unterschieden sich nur durch das Fehlen von DNS. Über diese wurden die Nachweisgrenzen der Proben bestimmt. In den oberen beiden Abbildungen wurde links die Nachweisgrenze des Oligonukleotids T aufgetragen und rechts die normalisierte Fluoreszenzaktivität des Oligonukleotids T. Die Nachweisgrenze nahm in dem Maße zu wie das Signal des Oligonukleotids abnahm. Die normalisierten Signale der Hotpot-Proben wurden in der unteren Abbildung rechts aufgetragen und die dazu gehörige Nachweisgrenze unten links. Die Signale der Probe und der Nachweisgrenze nahmen mit der Zeit zu. Die Steigung der Probe war höher als die der Nachweisgrenze.

Es wurde erwartet, den gleichen Effekt bei dem Hotpot-Ansatz zu sehen. Die normalisierte Signalintensität nahm mit der Zeit zu, trotz der Zunahme der dazugehörigen Nachweisgrenze. Die Steigung der Fluoreszenzintensität der Hotpot-Probe mit 0,44 pro Minute war viel höher als für die Hotpot-Proben in Mineralöl (Abb. 3.5.3.5). Die hier verzeichnete Zunahme der Fluoreszenzintensität der Hotpot-Proben war auf die Synthese der DNAzyme und der damit verbundenen Zunahme an Substratumsatz zurückzuführen. Die Verwendung von Chips, welche auf 17°C während des Dispensierens gekühlt wurden, führte zu stabileren Signalen als die Verwendung von Mineralöl.

3.7.4 Sensitivität des Hotpot-Ansatzes

Um die Sensitivität des Hotpot-Assays zu ermitteln, wurden in dem Hotpot-Ansatz Verdünnungsreihen der Startmoleküle R und V mit dem hybridisierten Analyt-Oligonukleotid B analysiert. Für den Hotpot-Ansatz wurden 50 nl Reaktionsansätze je Kavität des Nano-Well-Chips dispensiert. Der Chip wurde während des Dispensierens auf 17°C gekühlt. Die Proben wurden aus 35 µl Hotpot-Ansätzen entnommen. Die jeweiligen Negativkontrollen enthielten keine DNS. Zum Normieren der Daten wurde das Oligonukleotid T mitgeführt in einer 250 nM Konzentration in einem 50 µl Amplex Red-Reaktionsansatz. Die Fluoreszenzintensität wurde über eine Stunde alle 10 Minuten in dem µPCR-Chip-Auslesegerät gemessen. Die Messdaten wurden mit den jeweiligen Nachweisgrenzen normalisiert, gegen die Signalintensitäten des mitgeführten DNAzyms T normiert (siehe 2.2.10) und in Abbildung 3.7.4.1 aufgetragen.

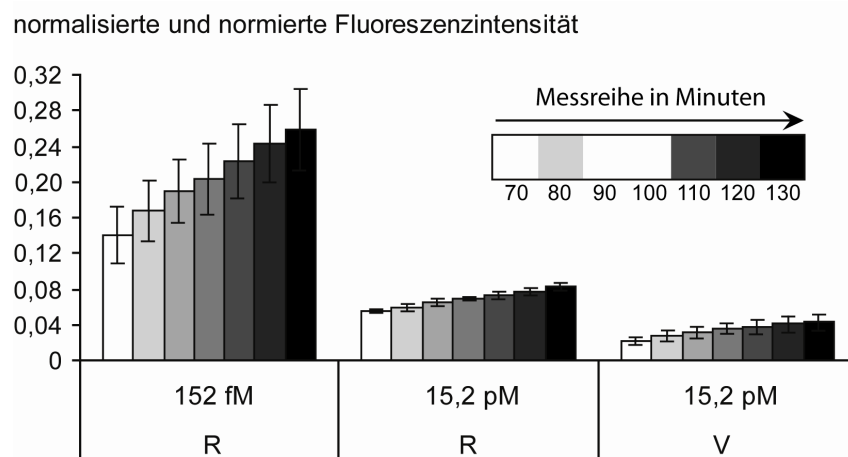


Abbildung 3.7.4.1 | Sensitivität des Hotpot-Ansatzes. Eine Verdünnungsreihe der Startmoleküle R und V mit der gleichen Menge an hybridisiertem Analyt-Oligonukleotid B wurde im Hotpot analysiert. 50 nl je Probe wurden in die Kavitäten des Nano-Well-Chips gegeben, der auf 17°C gekühlt worden war. Als Negativkontrolle wurden vergleichbare Ansätze zur jeweiligen Probe ohne DNS dispensiert. Die Messdaten wurden zuerst normalisiert und danach gegen die Signale des 250 nM Oligonukleotids T auf demselben Chip normiert. Nach 70 Minuten Inkubation wurden die Fluoreszenzsignale über einen Zeitraum von einer Stunde gemessen. Eine zeitabhängige Zunahme der Signalintensität wurde detektiert. Bei 15,2 pM Analytmolekülen hatte das Oligonukleotid V eine geringere Signalhöhe als das Oligonukleotid R. Bei einer Konzentration von 152 fM Analytmolekülen wurden nur die Fluoreszenzsignale des Startmoleküls T detektiert.

Die Fluoreszenzintensität nahm proportional mit der Inkubationszeit zu, basierend auf der Synthese der katalytisch aktiven DNAzyme im RCP. Die Höhe der Signalintensitäten der Proben mit weniger Startmolekülen nahm ausnahmslos zu. Die

Nachweisgrenze des Analyt-Oligonukleotids B wurde experimentell auf 152 fM (4.600 Moleküle) pro Kavität unter Verwendung des zirkulären Oligonukleotides R bestimmt. Mit dem zirkulären Oligonukleotid V (zweite Generation an DNAzymen) konnten bereits 15,2 pM Oligonukleotid B nachgewiesen werden. Bei der gleichen Konzentration von 15,2 pM hatte das Oligonukleotid R (erste Generation an DNAzymen) höhere Signalintensitäten als das Oligonukleotid V. Die Analyse der Aktivität der ersten und zweiten Generation an DNAzymen auf einzelnen Strängen (Abb. 3.6.2.1) hatte zu dem Ergebnis geführt, dass die zweite Generation an DNAzymen einen höheren Substratumsatz aufwies. Dies konnte nicht für die DNAzyme innerhalb des RCPs bestätigt werden, die zweite Generation an DNAzymen hatte einen geringeren Substratumsatz als die DNAzyme der ersten Generation innerhalb des RCPs. Die zweite Generation an DNAzymen formte zu dem eigentlichen G-Quadruplex eine zusätzliche Haarnadelstruktur⁴⁹ aus. Daher war es sehr wahrscheinlich, dass die Ausbildung der G-Quadruplex-Struktur innerhalb des RCPs sterisch behindert wurde. Die einfachere Struktur der DNAzyme der ersten Generation führte im Hotpot Ansatz zu einer gesteigerten Sensitivität des Ansatzes. Die Verwendung des Oligonukleotids E für die RCA in dem Hotpot-Assay war zu favorisieren.

4. Diskussion

4.1 Startmolekül

Eine Voraussetzung für die RCA ist ein zirkuläres Oligonukleotid, das Startmolekül, an das ein Primer mit einem freien 3'-Ende binden kann. In dieser Arbeit wird ein Protokoll beschrieben (siehe 2.2.2), in dem unter Verwendung von Enzymen erfolgreich Oligonukleotide zirkularisiert werden (siehe 3.1).

Bei der Anzahl der angegebenen Startmoleküle handelt es sich stets um einen idealisierten Wert, der davon ausgeht, dass 100 % der Oligonukleotide zirkularisiert werden. Die nach der Zirkularisierung durchgeführte Auftrennung der Oligonukleotide zeigt jedoch keine klare Bande, die sich quantifizieren ließe (Abb. 3.1.3). Daher ist eingesetzte Menge an zirkulärem Startmolekül nicht bekannt. Die Versuche zeigen das die Effizienz der Zirkularisierung sehr hoch war. Eine Aufreinigung großer Mengen an zirkularisierten Oligonukleotides ist nicht sinnvoll, da bei der Lagerung der DNS und dem Auftauen Strangbrüche auftreten. Durch den Einsatz chemisch hergestellter Startmoleküle^{59, 60} kann eine Quantifizierung erfolgen. Die chemische Zirkularisierung ist jedoch sehr aufwendig und wird daher im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt. Bei der chemischen Synthese eines Nukleinsäurestranges kommt es nicht zum Einsatz von Enzymen, sondern zu einer Kette chemischer Reaktionen, bei denen eine Phosphodiesterbindung zwischen zwei Nukleotiden entsteht. Die Forschung an der chemischen Zirkularisierung von Nukleinsäuren schreitet voran und könnte für die RCA-Ansätze von großer Bedeutung sein. Die Problematik des Strangbruchs bleibt jedoch.

Neben dem erwarteten Monomer treten zirkuläre Dimere oder Trimere des Startmoleküls auf. Diese dürften die RCA nicht beeinflussen, da die Phi29-Polymerase, während sie am Startmolekül entlang geht, weitere gebundene Analyten durch ihre Strangverdrängungsaktivität entfernen kann²⁶. Durch die Hybridisierung von mehreren Analyten an das Startmolekül entstehen mehrere Startpunkte der Polymerase auf den multimeren Startmolekülen. Liegen alle Startpunkte auf einem Multimer mit Phi29-Polymerase besetzt vor, könnte die unmittelbare Nähe der Polymerasen zueinander zu einer Hemmung der Synthese führen. Es sind Ansätze bekannt, die sich viele Startpunkte zu nutze machen, wie der *multiply-primed* RCA-Ansatz⁶². Viele Startpunkte auf einem zirkulären DNS-Strang, der mehrere Kilobasen groß ist, werden verwendet, um diesen zu vervielfältigen. Daher läßt sich ein Einfluss auf die Phi29-Polymerase bei den multimeren Startmolekülen ausschließen.

4.2 RCA-Ansatz in Lösung

Mit den synthetisierten Startmolekülen wird erfolgreich ein RCA-Protokoll in Lösung etabliert. Dabei wird der Einfluss des einzelstrang-bindenden Proteins T4 gp32 auf die RCP-Synthese und die Einbaurate von Biotin-markierten Nukleotiden mittels *Dot Blot* untersucht.

▪ T4 gp32

Das T4 gp32 ist ein einzelstrang-bindendes Protein des Phagen *T4*. Das Protein bindet die DNS und löst doppelsträngige Bereiche auf, die sonst die Synthese blockieren könnten^{31, 57}. Dadurch wirkt sich T4 gp32 unterstützend auf die Syntheseleistung der Polymerase aus. Der Vergleich von RCA-Ansätzen mit und ohne das Protein T4 gp32 zeigt im Gel keinen Unterschied zwischen den RCPs (Abb. 3.3.4). Die Signalintensitäten der eingebauten Biotin-16-dUTPs auf dem *Dot Blot* zeigten jedoch einen Einfluss des T4 gp32 auf die Höhe der Signale. Dies wird im folgenden Experiment weiter untersucht.

Für den Einbau von Biotin-16-dUTP wird das Verhältnis von markiertem Nukleotid zu dTTP verändert. Die Änderung des Verhältnisses von Biotin-16-dUTP zu dTTP von 1:200 (β -RCA-Ansatz) auf 1:20 (γ -RCA-Ansatz) führt zu einer Zunahme des Einbaus von Biotin-16-dUTP in das RCP (Abb. 3.3.5). Die Einbaurate des Biotin-16-dUTP müsste linear ansteigen mit der linearen Synthese des RCPs durch die Phi29-Polymerase. Dies ist für die Proben der β -RCA-Ansätze der Fall, aber für die Proben der γ -RCA-Ansätze tritt nach 20 Minuten ein Plateau ein. Für die Proben der δ -RCA-Ansätze (10 nmol Biotin-16-dUTP, 240 ng T4 gp32) ist dieser Effekt nicht zu sehen. Das T4 gp32 stabilisiert den RCP-Strang und verhindert eine Ausbildung von kompakten Strukturen. Die RCP-Struktur liegt lockerer vor, und die Bindungspartner Biotin und Streptavidin haben einen freien Zugang zu einander. Dadurch befinden sich die markierten Nukleotide weiter voneinander entfernt. Eine Auslöschung des Fluoreszenzsignals durch dicht benachbarte Cy3-Streptavidin kann verhindert werden.

T4 gp32 hat einen Einfluss auf die Signalhöhe der RCA-Proben, jedoch keinen auf die Menge der synthetisierten RCPs.

▪ Einfluss des Verhältnisses von dTTP zu Biotin-dUTP

Der Vergleich der Signalintensitäten des RCA-Ansatzes ohne (Abb. 3.3.3) und mit dTTP (Abb. 3.3.5, γ -RCA-Ansatz) zeigt für den Ansatz mit dTTP eine viel höhere Einbaurate des Biotin-16-dUTPs, obwohl durch die Abwesenheit von dTTP 20fach mehr Biotin-16-dUTP eingebaut werden sollte. Der Signalintensitätsunterschied könnte auf die unmittelbare Nachbarschaft der markierten Nukleotide im Ansatz ohne dTTP

zurück zuführen sein, da dies zu einer Auslöschung der Cy3-Farbstoffe⁶³ am gebundenen Streptavidin mit zunehmender RCP-Größe führt. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass durch die Nähe der markierten Nukleotide in dem RCA-Ansatz ohne dTTP ein Cy3-Streptavidin-Molekül mit seinen drei Untereinheiten drei Biotin-Markierungen binden kann. Dadurch tritt ein schwächeres Signal auf, obwohl mehr Biotin-16-dUTP im RCP eingebaut wird.

Das Verhältnis von Biotin-dUTP zu dTTP ist wichtig für eine effiziente Markierung des RCPs. Für die RCA-Ansätze in Lösung führt ein 1:20 Verhältnis der Biotin-markierten Nukleotide zu den dTTPs zu den besten Ergebnissen.

- **Einbaurate markierter Nukleotide der Phi29-Polymerase**

Die Phi29-Polymerase gehört zu der Familie der B Polymerasen. Die in dieser Arbeit ermittelten Einbauraten der Phi29-Polymerase werden mit denen der anderen Polymerasen der Familie B verglichen. Untersuchungen zeigen, dass Polymerasen dieser Familie ca. 60 % der vorhandenen Einbaupositionen mit dem markierten Nukleotid besetzen⁶⁴.

In der Sequenz des Startmoleküls A (Tabelle 2.1.4) befinden sich 20 mögliche Positionen des Biotin-16-dUTPs innerhalb eines 100 Nukleotide langen RCPs. Daher sollten theoretisch 12 Biotin-16-dUTP in 100 Nukleotiden des RCP vorhanden sein. Diese Angaben werden mit der im *Dot Blot* ermittelten Einbaurate von 15 pmol in 1 µl des γ-RCP-Ansatzes (Abb. 3.3.5) der Probe nach 20 Minuten RCA überprüft. In dem γ-RCA-Ansatz befinden sich 0,55 pmol und damit $3,3 \times 10^{11}$ Startmoleküle pro µl. Bei einer Syntheseleistung der Phi29-Polymerase von 1000 Nukleotiden pro Minute²² entstehen pro Startmolekül theoretisch in 20 Minuten ein 20.000 Nukleotide langes RCP. Damit sollten insgesamt $6,6 \times 10^{15}$ Nukleotide des RCPs pro µl des γ-RCA-Ansatzes vorliegen und davon könnten jeweils $1,3 \times 10^{15}$ Nukleotide dTTP durch Biotin-16-dUTP ersetzt werden. Geht man von einer 60 %igen Einbaurate aus, müssten in dem µl 8×10^{14} Biotin-markierte Nukleotide vorliegen, dies entspricht 1,3 nmol markierten Nukleotiden. Jedoch werden in dem Ansatz nur 278 pmol Biotin-16-dUTP pro µl eingesetzt. Diese Menge an Biotin-16-dUTP müsste nach den publizierten Einbauraten⁶⁴ nach 5 Minuten RCA komplett eingebaut werden. Es können nur 5 % der theoretisch errechneten Menge an Biotin-16-dUTP nachgewiesen werden. Da das Signal über die Inkubationszeit der RCA von 40 Minuten kontinuierlich zunimmt, scheint die Menge an Biotin-16-dUTP ausreichend zu sein. Daraus lässt sich ableiten, dass ein anderer Faktor die RCA-Einbaurate beeinflusst.

Berechnet man das Verhältnis der Phi29-Polymerase zu den vermeintlichen 100 % zirkularisierten Oligonukleotiden, liegt bei dem verwendeten 36 µl-RCA-

Reaktionsansatz mit 20 pmol Startmolekülen ein Verhältnis von Polymerase zu Startmolekül von 1 zu 2,6 vor. Damit werden nicht alle zirkulären Oligonukleotide mit einer Phi29-Polymerase besetzt. Ausgehend von der Menge an Phi29-Polymerase, welche in $1,3 \times 10^{11}$ Molekülen pro μl vorliegt, könnten maximal $2,5 \times 10^{15}$ Nukleotide RCP in 20 Minuten entstehen. Daraus lässt sich der theoretische Wert von 500 pmol eingebautem Biotin-16-dUTP errechnen und damit ist der experimentell ermittelte Wert von 15 pmol ebenfalls niedriger.

Die ermittelten Einbauraten für Biotin-16-dUTP weichen von den theoretisch errechneten ab. Diese Abweichung geht unter Umständen auf die geringe Zugänglichkeit der Biotine im RCP zurück, welches auf der Membran fixiert wird und dadurch nur schwer zugänglich für das Streptavidin-Cy3 ist. Eine weitere Möglichkeit zeigen die folgenden Experimente auf den Aldehydarrays auf (siehe 3.5). Hier zeigt sich, dass der Einbau von Biotin-dUTP in das RCP von der Linkerlänge zwischen dem Biotin und dem dUTP beeinflusst wird. Je kürzer der Linker ist, umso besser ist der Einbau des markierten Nukleotides. Dies kann zwanglos damit erklärt werden, dass die Phi29-Polymerase einen engen Tunnel für die Nukleotide zum Einbau in das RCP aufweist (Abb. 4.2)

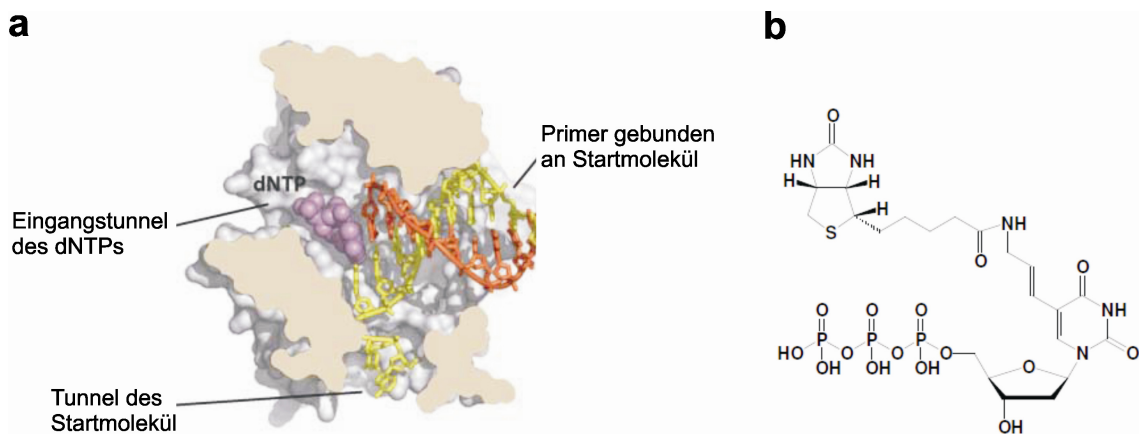


Abbildung 4.2 I (a) Oberflächen Präsentation des Querschnitts der Phi29-Polymerase basierend auf der Kristallstruktur, Abbildung aus Kamtekar et al. 2004, verändert²⁰. (b) Struktur des eingesetzten Biotin-dUTPs (Abbildung von Jena Bioscience, verändert).

Da die Einbaurate der Phi29-Polymerase durch das Biotin-16-dUTP beeinflusst wird, ist anzunehmen, dass die Menge an Biotin-16-dUTP, die bei dem *Dot Blot*-Experiment ermittelt wird, aufgrund der Linkerlänge nicht direkt mit den publizierten Angaben der anderen Polymerasen verglichen werden kann. Des Weiteren könnte die Einbaurate

speziell der Phi29-Polymerase von den anderen Polymerasen der Familie B abweichen und im Vergleich unter der Einbaurrate der publizierten Polymerasen sein.

4.3 Konzentration der Phi29-Polymerase

Die Phi29-Polymerase führt durch das Erkennen eines freien 3'-Endes zum Start der RCA. Für eine optimale Synthese und einen sensitiven Nachweis sollte jedes Startmolekül mit einer Polymerase besetzt sein. Daher ist das Verhältnis von Startmolekül zu Polymerase ein entscheidender Faktor für eine erfolgreiche RCA.

In einem 36 µl-RCA-Reaktionsansatzes (siehe 2.2.5) mit 50 Units Phi29-Polymerase sind 0,8 pmol der Phi29-Polymerase enthalten. Damit liegt die Phi29-Polymerase in einem Verhältnis von 1 zu 24 zum Startmolekül (20 pmol) vor. Dies ist nicht optimal, da nicht alle Startmoleküle mit einer Phi29-Polymerase abgedeckt sind für den RCA. Jedoch kann aufgrund der Konzentration der Polymerase nicht mehr eingesetzt werden, ohne das Volumen des Ansatzes maßgeblich zu erhöhen.

In den miniaturisierten Ansätzen auf den Aldehydarrays (siehe 2.2.9.1) sind ebenfalls 50 Units Phi29-Polymerase vorhanden, dies entspricht 0,8 pmol. Auf den Arrays werden insgesamt 167 fmol Startmoleküle pro Feld auf die Oberfläche abgegeben. Damit liegt in den 36 µl-RCA-Reaktionsansätzen der Gasket Slides ein Verhältnis von Phi29-Polymerase zu den Startmolekülen auf der Oberfläche von 4,8 zu 1 vor. Die kleinen Volumina führen zu einer Optimierung des Verhältnisses von Polymerase zu Startmolekül, da aufgrund der hohen Sensitivität mit geringeren Startmolekülkonzentrationen gearbeitet wird. Jedes Startmolekül sollte von mindestens einem Phi29-Polymerase-Molekül besetzt vorliegen.

Für den miniaturisierten Hotpot-Assay wird ebenfalls der bewährte 36 µl-RCA-Reaktionsansatz verwendet, und damit liegen 0,8 pmol Moleküle Phi29-Polymerase vor. Das bedeutet, in dem 50 nl Ansatz sind 1 fmol Moleküle Phi29-Polymerase. Dadurch hat der Ansatz mit 8 zmol (152 fM) Startmolekül (Abb. 3.7.4.1) ein Verhältnis von $1,3 \times 10^5$ Moleküle Phi29-Polymerase zu einem Startmolekül. Damit liegt die Polymerase im großen Überschuss zum Startmolekül vor. Die Phi29-Polymerase hat ein Syntheseoptimum bei 30 °C. Beim Hotpot-Ansatz erfolgt die Synthese des RCPs bei 21 °C. Der Überschuss an Polymerase soll die verminderte Syntheseleistung auf Grund der Temperatur ausgleichen.

Durch das Miniaturisieren der Ansätze ist es möglich, das Verhältnis der Phi29-Polymerase zum Startmolekül zu optimieren und dadurch die höhere Sensitivität der Nachweissysteme zu erreichen.

4.4 Aldehydarrays

Die RCA wird auf der Oberfläche von *Microarrays* durchgeführt, die mit Aldehydgruppen beschichtet sind. Dafür werden Oligonukleotide mit hybridisiertem Startmolekül mittels Dispensierroboter aufgebracht und kovalent an die Oberfläche des Arrays gebunden (siehe 2.2.9.1). Die RCA konnte erfolgreich etabliert und ein direkter Nachweis des RCPs über markierte Nukleotide und eine indirekter Nachweis über markierte Sonden geführt werden. 6×10^8 Startmoleküle pro Spot können auf der Oberfläche des Aldehydarrays nachgewiesen werden.

4.4.1 Linkerlänge der Oligonukleotide und der Markierungen

Zur Immobilisierung auf der Aldehydoberfläche werden Oligonukleotide mit einer 5'-Aminogruppe verwendet. Zwischen dem 5'-Ende und der Sequenz zum hybridisierten des Startmoleküls befinden sich unterschiedlich lange Linkersequenzen (Tabelle 3.5.1). Die Linkersequenz besteht aus einer Kette von Nukleotiden, die den Abstand der Hybridisierungssequenz zum Startmolekül und damit dem Startpunkt der RCA zur Oberfläche vergrößern sollen. Der Einfluss der Linkerlänge der immobilisierten Oligonukleotide auf die RCP-Synthese wird untersucht, da vermutet wird, dass die Nähe des Startpunktes auf dem Startmolekül zur Oberfläche die Bindung der Phi29-Polymerase behindern könnte und dadurch die RCA nicht stattfinden könnte.

Die Verwendung von einem immobilisierten Oligonukleotid mit einem 17 Nukleotide langen Linker führt auf der Arrayoberfläche bei dem direkten Nachweis und dem indirekten Nachweis des RCPs zu den besten Ergebnissen. Die Phi29-Polymerase hat bei dieser Länge keine Probleme, den Startpunkt zu binden und die Synthese zu starten. Die Oligonukleotide mit einem 50 Nukleotide langen Linker und ohne Linker zur Oberfläche haben durch alle Experimente die niedrigsten Signalintensitätswerte für das RCP. Dies ist in Abbildung 4.4.1.1 exemplarisch dargestellt für den Einbau von Biotin-dUTP in die RCPs auf der Oberfläche des Arrays (Abb. 3.5.2.4)

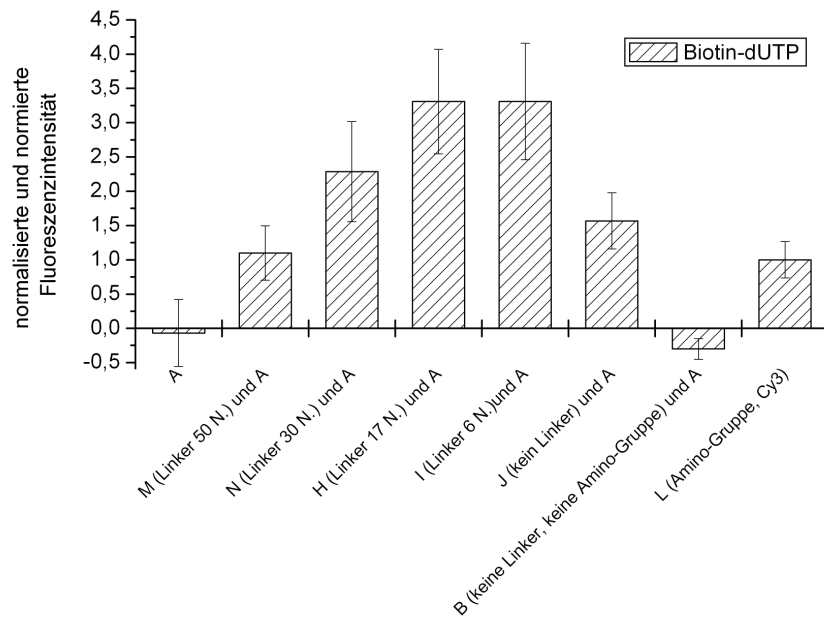


Abbildung 4.4.1.1 | Einbau des Biotin-dUTPs während der RCA auf Microarrays. Jeweils 1 nl der Oligonukleotide werden auf einen Aldehydarray abgegeben und immobilisiert. Die Oligonukleotide B, H, I, J, M und N werden mit dem hybridisierten Startmolekül A dispensiert. 4 technische Replikate der 1 μ M konzentrierten Proben werden dargestellt. Das Oligonukleotid H mit einem 17 Nukleotide (N.) langen Linker hat mit die stärkste Signalintensität. Die Oligonukleotide M mit dem längsten und J ohne Linker haben das schwächste Signal.

Ist der Linker zu kurz, liegt der Startpunkt zu nah an der Oberfläche, und die Polymerase hat Schwierigkeiten zu binden. Bei einem sehr langen Linker können innerhalb des Linkers Sekundärstrukturen auftreten und dadurch den doppelsträngigen Startpunkt der Phi29-Polymerase verdecken. Die Linkerlänge zur Oberfläche hat einen erheblichen Einfluss auf die Proteinbindung, dies wird im besonderen für Aptamer-Protein-Bindungen⁶⁵ und für Hybridisierungsreaktionen⁶⁶ beschrieben. Die Linkerlänge des immobilisierten Oligonukleotides zur Oberfläche hat einen Einfluss auf die Phi29-Polymerase.

Bei dem direkten Nachweis des RCPs werden ebenfalls verschiedene Linkerlängen zwischen dem Biotin und dem markierten Nukleotid getestet. Eine kurze Linkerlänge zwischen dem Biotin und dem markierten Nukleotid führt zu den besten Ergebnissen für den direkten Nachweis des RCPs über den Einbau markierter Nukleotide (Abb. 4.4.1.2).

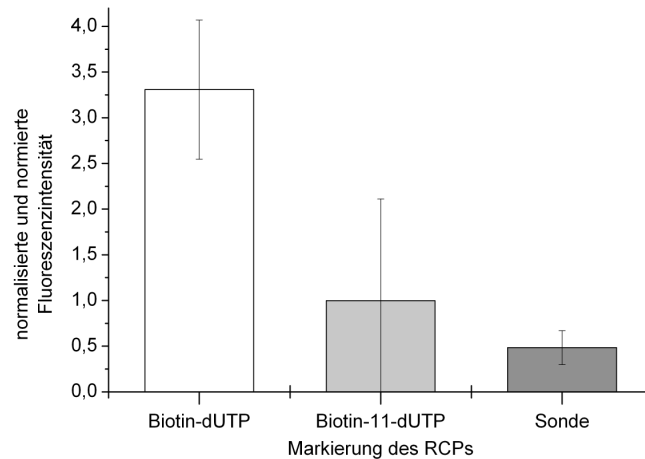


Abbildung 4.4.1.2 | Direkter und indirekter Nachweis des RCPs auf den Aldehydarrays. Jeweils 1 nl der 1 μ M konzentrierten Oligonukleotide mit einem 17 Nukleotide langen Linker werden auf der Oberfläche immobilisiert und ein 36 μ l-RCA-Reaktionsansatz durchgeführt. Der Einbau von Biotin-dUTP zeigt die höchsten Signale im Vergleich zum Biotin-11-dUTP und zur hybridisierten Sonde am RCP.

Die Kristallstruktur der Phi29-Polymerase zeigt einen engen Tunnel in dem Protein für die Nukleotide, um diese in das RCP einzubauen²⁰. Damit lassen sich die Ergebnisse für die Aldehydarrays für den direkten Nachweis erklären: je kleiner die Markierung und ihr Linker zum Nukleotid ist, umso effizienter ist der Einbau aufgrund des geringen Platzes in der Phi29-Polymerase (Abb. 4.2). Damit ist auch der Einbau von Nukleotiden, die mit Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, erschwert, da die Fluoreszenzfarbstoffe wesentlich größer sind als das in dieser Arbeit verwendete Biotinmolekül. Erfolgt der Nachweis des RCPs direkt über den Einbau von markierten Nukleotiden, ist zu beachten, dass kleinere Markierungen der Nukleotide zu einer erhöhten Einbaurrate im Vergleich zu großen Markierungen führen.

4.4.2 Spotmorphologie

Die Spots der Proben auf der Oberfläche der Aldehydarrays führen bei der Analyse der technischen Replikate zum Teil zu großen Standardabweichungen. In Abbildung 4.4.2.1 ist exemplarisch ein Ausschnitt eines Arrays dargestellt. Deutliche Unterschiede zwischen den Replikaten sind zu erkennen. Die Spots weisen zum größten Teil Doughnut-Strukturen auf, das bedeutet, die runden Spots zeichnen sich durch einen Ring an Fluoreszenzfarbstoffen aus, in der Mitte mit einem dunklen Bereich. In dem hier dargestellten Beispiel zeigen die Proben die Inkorporation von Biotin-dUTP in das RCP und dem Nachweis über Cy3-Streptavidin (Abb. 4.4.2.1 A) und den Einbau von Cy5-dUTP in das RCP (4.4.2.1 B).

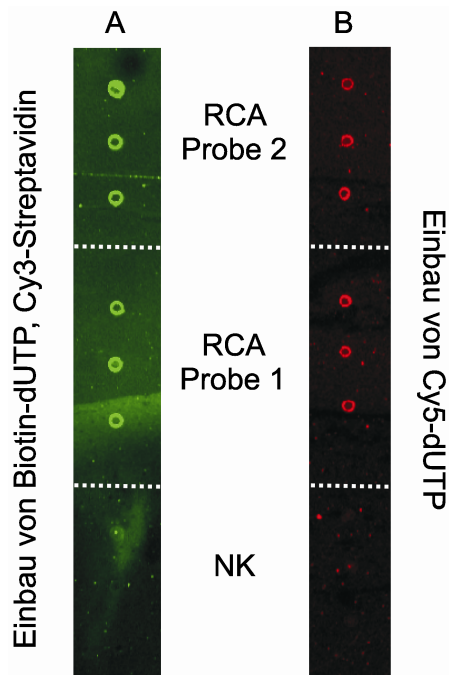


Abbildung 4.4.2.1 | Struktur der RCP-Spots. Das Startmolekül, hybridisiert an Oligonukleotide, die mit einer Aminogruppe markiert sind, wird auf den Aldehydarray dispensiert und kovalent an diesen gebunden. Die RCA wird durchgeführt mit Biotin-dUTP (A) und Cy5-dUTP (B) detektiert. Die Negativkontrolle (NK) ist 3x SSC-Puffer. Die Cy5-dUTP Inkorporation wird direkt nach der RCA ausgelesen, der Ansatz mit Biotin-dUTP nach einem zusätzlichen Markierungsschritt durch Cy3-Streptavidin. Die Spots zeigen unabhängig von der Markierungsstrategie Doughnut-Strukturen der Proben auf und Unterschiede zwischen den Replikaten.

Unabhängig von der Markierung sind Doughnut-Strukturen der Spots zu erkennen. Dies lässt sich durch das Immobilisieren der Oligonukleotide erklären. Die DNS neigt dazu, nach dem Auftragen auf die Oberfläche durch Kohäsion und Oberflächenspannung⁶⁷ in die Mitte der Spots zu wandern. Dadurch liegt ein Konzentrationsgefälle innerhalb eines Spots⁶⁸ bereits während des Immobilisieren vor. In der Mitte ist die Konzentration so hoch, dass die Phi29-Polymerase nicht zwischen die Oligonukleotide kann, um an dem Startpunkt der RCA zu binden. In den äußeren Bereichen der Spots befinden sich geringere Konzentrationen der Oligonukleotide. Hier kann die Phi29-Polymerase an die Startmoleküle binden und das RCP synthetisieren, was zu den Fluoreszenzfarbstoffen im äußeren Ring führt. Eine weitere Theorie wäre, dass durch das Eintrocknen der Spots sich ein Konzentrationsgradient von innen nach außen bildet und so nur im äußeren Rand der Spot sich gebundene Oligonukleotide befinden. Dadurch kann nur am Spotrand eine RCA erfolgen.

Dies stimmt mit den Ergebnissen überein, dass eine höhere Konzentration als 1 μM dispensierter Oligonukleotide in 1 nl in einem Spot zu keinen Signalen führt.

Unter einer Konzentration von 1 μM der Oligonukleotide kann ebenfalls kein Signal der RCA über den direkten und den indirekten Nachweis detektiert werden. Eine Erklärung dafür ist, dass bei der geringen Konzentration die Oligonukleotide keinen „Halt“ durch benachbarte Oligonukleotide haben und nicht in den Raum ragen, sondern planar auf der Oberfläche der Aldehydarrays liegen. Dadurch liegt der doppelsträngige Bereich nahe an der Oberfläche und die Phi29-Polymerase kann nicht an den Startpunkt

binden. Dem liegt ein ähnliches Problem zugrunde wie die Linkerlänge zur Oberfläche (siehe 4.4.1). Um diesen Effekt zu untersuchen, könnte man weiterführende Studien durchführen mit einem Gemisch aus Oligonukleotiden, welche auf der Oberfläche immobilisiert werden. Oligonukleotide dienen als Platzhalter um den an Startmoleküle gebundenen Primer herum und stabilisieren ihn. Diese These wird unterstützt durch die gewonnenen Ergebnisse aus den dispensierten Startmolekül-Ansätzen mit und ohne ExonukleaseVII-Verdau. Die ExonukleaseVII-Ligationsansatzproben haben für das Biotin-dUTP niedrigere Signale als die Ligationsansatzproben (Abb. 3.5.2.4). Die Zusammensetzung der Oberflächenbeladung ist eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse. Der Anteil an Oligonukleotidmolekülen, welche nicht zirkularisiert vorliegen, spielt vielleicht eine stabilisierende Rolle für die RCA auf der Oberfläche.

Des Weiteren beeinflussen die Dispensierbedingungen die Immobilisierung der Proben. Dabei spielen insbesondere die Luftfeuchtigkeit und der jeweilige Puffer, der zum Abgeben der Proben verwendet wird, eine Rolle⁶⁹. Da die Startmoleküle vor dem Dispensieren nicht aufgereinigt werden, liegt auf der Oberfläche ein Gemisch aus Oligonukleotiden und Proteinen vor. Die Proteine verfügen über reaktive Aminogruppen und können demnach auch kovalent an die Oberfläche gebunden werden und dadurch die Menge an immobilisierter DNS reduzieren. Mit den diskutierten chemisch zirkularisierten Startmolekülen (siehe 4.1) ließe sich das Array leichter mit reinen Monomeren Startmolekülen beschreiben. Die Startmoleküle können grundsätzlich nach der enzymatischen Zirkularisierung vor der Verwendung aufgereinigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wird darauf verzichtet, da eine Aufreinigung auch immer mit einem Verlust an Material einhergeht, das Material möglicherweise verändert wird und das zu erstellende Protokoll mit einer minimalen Anzahl an Schritten auskommen soll.

4.4.3 Beladungskapazität

Die Immobilisierung der Oligonukleotide wird mit RCA-unabhängigen Kontrollen untersucht. Dabei wird ein Oligonukleotid auf den Aldehydarrays mit einer Aminogruppe immobilisiert und über die Hybridisierung einer Sonde markiert. Diese Sonde ist mit einem Biotin markiert und kann über einen Cy3-Streptavidin-Schritt nachgewiesen werden (Abb. 4.4.3 a). Dabei zeigt sich, dass eine Konzentration von 10 μM des immobilisierten Oligonukleotides zu den höchsten Signalen führt (Abb. 3.5.1.1). Die Probe liegt auf einer Fläche mit einem Durchmesser von 200 μm vor. Geht man davon aus, dass eine gerichtete Immobilisierung über die Aminogruppe am 5'-Ende der Oligonukleotide vorliegt, kann über den Durchmesser eines

Nukleotides eine theoretische Beladungskapazität berechnet werden. Damit ergibt sich über die Berechnung eines idealisierten Nukleotides (siehe 2.2.10) eine Beladungskapazität von 3×10^{11} Oligonukleotiden. Bei einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ nach dem Beschreiben des Arrays mit 1 nl liegen 6×10^9 Moleküle auf der Oberfläche vor.

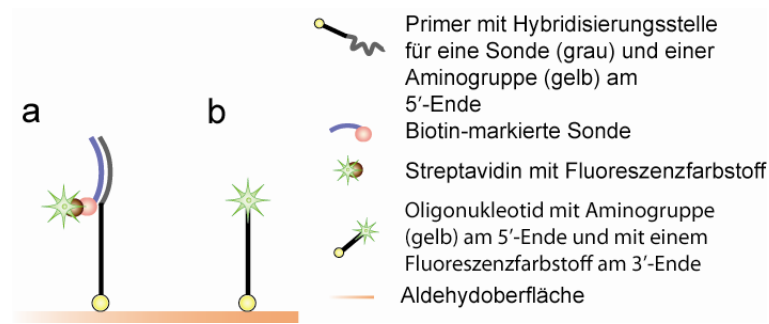


Abbildung 4.4.3 | Immobilisierungsstrategien zur Analyse der Oberflächenbeladungskapazität. (a) Das immobilisierte Oligonukleotid wird durch eine markierte Sonde detektiert. (b) Das Oligonukleotid trägt zwei Markierungen, eine zur Immobilisierung und eine mit einer Markierung zum Nachweis.

Damit ist die Beladungskapazität der Oberfläche theoretisch noch nicht ausgelastet. Bei höheren Konzentrationen des Oligonukleotids ($50 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$) sind die Signale schwächer. Hier liegen die immobilisierten Oligonukleotide enger beieinander und somit auch die Fluoreszenzfarbstoffe, so dass es zu einem teilweisen Auslöschen⁶³ der Fluoreszenzsignale kommen kann. Es ist auch möglich, dass aufgrund der hohen Beladungsdichte die Hybridisierung der Sonden durch elektrostatische Interaktionen mit den anderen Oligonukleotiden behindert wird⁷⁰. Bei einer Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ kann kein Signal mehr nachgewiesen werden. Das Oligonukleotid liegt unter Umständen bei dieser geringen Konzentration planar auf der Oberfläche, so dass die Bindestelle zur Hybridisierung verdeckt wird und die Sonde nicht binden kann. Die $0,1 \mu\text{M}$ konzentrierten Oligonukleotide liegen unterhalb der Nachweisgrenze des Ansatzes. Neben dieser indirekten Methode zur Überprüfung der Bindung an die Oberfläche, wird ein weiterer Ansatz mit einem doppelmarkierten Oligonukleotid durchgeführt (Abb. 3.5.1.2). Das Oligonukleotid ist mit einer Aminogruppe und einem Cy3-Farbstoff markiert (Abb. 4.4.3 b). Auch hier können die $10 \mu\text{M}$ und die $1 \mu\text{M}$ konzentrierten Oligonukleotide gemessen werden. Dies spricht dafür, dass bei einer $0,1 \mu\text{M}$ Konzentration der immobilisierten Oligonukleotide die Nachweisgrenze des Ansatzes erreicht ist, da bei der direkten Detektion ein Verdecken der Bindestelle nicht relevant für das Entstehen eines Signals ist.

4.5 DNAzyme

Die katalytische Peroxidase-Aktivität der DNAzyme der ersten⁴⁸ und der zweiten Generation⁴⁹ wird erfolgreich im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert (siehe 3.6.1).

Bei der katalytischen Aktivität der DNAzyme spielt im Besonderen das DNAzym zu Hemin Verhältnis eine wichtige Rolle, da mit zunehmender Heminkonzentration das Hintergrundsignal zunimmt und die Aktivität der DNAzyme überdeckt (Abb. 3.6.1.2.). Hervorzuheben ist die hohe Thermostabilität der DNAzyme. Diese zeichnet sich aus durch die Fähigkeit, bei hohen Temperaturen reversibel katalytische Komplexe bilden zu können (Abb. 3.6.1.3). Damit heben sich die DNAzyme von den Proteinen ab, die nach einem Schritt bei hohen Temperaturen irreversibel denaturieren. Die zweite Generation an DNAzymen zeichnet sich als Einzelstrang durch eine gleichwertige Aktivität zu dem Protein HRP aus (Abb. 3.6.3.1).

Aufgrund ihrer ausgeprägten Thermostabilität und hohen katalytischen Aktivität stellen die DNAzyme eine alternative Markierungsstrategie zu den herkömmlichen Methoden dar. Nach dem Etablieren des Nachweises der RCPs über klassische direkte und indirekte Markierungen auf den Aldehydarrays wird ein weiterer Ansatz verfolgt, bei dem die RCA mit den DNAzymen kombiniert wird.

4.5.1 Multiple DNAzyme

Zur Kombination der DNAzyme mit der RCA wird untersucht, ob DNS-Sequenzen mit mehreren verbundenen DNAzymen die Fähigkeit haben katalytische Zentren auszubilden. Dafür werden Oligonukleotide mit 2 und 3 DNAzymsequenzen auf einem Strang getestet und mit einem DNAzym je Strang verglichen (Abb. 3.6.2.1). Die Oligonukleotide zeigen bei der gleichen DNAzymkonzentration eine annähernd vergleichbare katalytische Aktivität. Nur die höchste Konzentration des Oligonukleotids mit 3 DNAzymsequenzen hat eine höhere Signalintensität. Ein dosisabhängiger Effekt tritt bei hohen DNAzymkonzentrationen auf. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die DNAzymsequenz bei hohen Konzentrationen eine supramolekulare Struktur zwischen den Oligonukleotiden ausbilden. In diesen Komplex aus mehreren Oligonukleotiden könnten zusätzliche Heminmoleküle auf Grund der Nähe der DNAzyme zu einander interkalieren. Dieser Effekt wurde bisher nicht beschrieben. Für die RCA könnte es bedeuten, dass es durch die DNAzyme, die nahe beieinander im RCP und in hohen Konzentrationen vorliegen, zu einer gesteigerten Signalintensität kommt. Die Vermutung wird in den darauffolgenden Experimenten nicht bestätigt. Die DNAzyme im RCP zeigen ein geringeres Signal als die geschnittenen Aliquote des RCPs, diese

RCP-Fragmente enthalten vereinzelte DNAzyme (Abb. 3.6.6.1). Der dosisabhängige Effekt kann erst bei sehr kleinen Abständen der DNAzyme zustande kommen und dadurch nicht im RCP zu sehen sein, da diese Abstände größer sind. Die umgebende Sequenz hat einen Einfluss auf die Effektivität der Konformation⁷¹ und damit auf die katalytische Aktivität. Mehrere DNAzyme innerhalb einer Sequenz können zu katalytischen Zentren konformiert werden. Die katalytische Aktivität der verbundenen DNAzyme in Oligonukleotiden und im RCP wird erfolgreich detektiert.

4.5.2 Substrate der DNAzyme

Die Verwendung des Substrates Amplex Red für die Peroxidase-Reaktion des DNAzyms führt zur Detektion eines Fluoreszenzfarbstoffes. Der direkte Nachweis des RCPs über DNAzyme in Kombination mit der RCA wurde ursprünglich nur mit den Substraten ABTS und Luminol gezeigt^{48, 72}. Dabei wird Luminol oft als Peroxidase-Substrat verwendet, obwohl es nur ein schmales Zeitfenster von wenigen Sekunden bis zum Erlöschen des Signals hat. Die Experimente mit Luminol erfordern spezielle transparente Probenkammern und Auslesegeräte und machen Luminol daher zu einem für diesen Ansatz unbrauchbaren Substrat. ABTS ist stabiler, aber der Substratumsatz erfolgt sehr schnell und eine Signalzunahme ist über die Zeit nur bedingt zu detektieren. Der erforderliche pH-Wert unter pH 6,0 für den ABTS-Ansatz⁷² würde die Phi29-Polymerase inaktivieren. Die Kombination der RCA und der Substratumsatz durch die aus der RCA entstandenen DNAzyme mit ABTS kann daher nicht in einem Reaktionsansatz, wie in dem vorgestellten Hotpot-Assay, realisiert werden. Daher wird die Verwendung von Amplex Red favorisiert, das zu einem über Stunden stabilen Signals führt.

4.6 Hotpot-Assay

Die RCA kombiniert mit den DNAzymen wird zu dem Hotpot-Assay weiterentwickelt. Der Hotpot-Assay kombiniert sämtliche Reaktionen, die in einandergreifend ablaufen. Dabei wird die Reaktion durch den doppelsträngigen Bereich auf dem Startmolekül ausgelöst und führt zur Synthese des RCPs mit verbundenen DNAzymen. Die DNAzyme formen katalytische Zentren und setzen ein Substrat zu einem Fluoreszenzfarbstoff um, welcher detektiert werden kann, während die Synthese des RCPs weiter läuft. Dieser Hotpot-Ansatz findet in Lösung statt. Alle verwendeten Substanzen für den Hotpot-Assay wurden einzeln auf ihren Einfluss auf die RCA untersucht (3.7.1.1). Das Lösungsmittel DMSO, in welchem das Hemin gelöst wird,

führt zu einer verminderten RCP-Synthese. Der Effekt des DMSO wird durch die Verwendung der höchsten löslichen Konzentration an Hemin minimiert. Der Einfluss von Komponenten der RCA auf die katalytische Aktivität der DNAzyme wird auch untersucht. Die Proteine aus dem Zirkularisierungsansatz und die Phi29-Polymerase selbst erhöhen den Substratumsatz der Lösung (Abb. 3.6.7.1). Ein negativer Einfluss auf katalytische Aktivität der DNAzyme liegt nicht vor.

Zunächst wird ein Hotpot-Assay auf 96er Mikrotiterplatten-Format etabliert. Bei diesem Ansatz kann nach 55 Minuten Inkubation ein erstes Signal der synthetisierten DNAzyme im RCP detektiert werden, das stetig stärker wird (Abb. 3.7.2.1). Dies ist die Zeitdifferenz, welche die Reaktionen brauchen, um nach dem Start der RCA über das RCP die DNAzyme auszubilden und das Substrat umzusetzen. Vorhergehende Experimente zur Charakterisierung der DNAzyme zeigen, dass es 30 Minuten Konformationszeit dauert, bis ein Signal detektiert werden kann (Abb. 3.6.1.1). Daher ist die Dauer der Inkubationszeit des Hotpot-Assays bis zu einem detektierbaren Signal in Einklang mit der erwarteten Dauer.

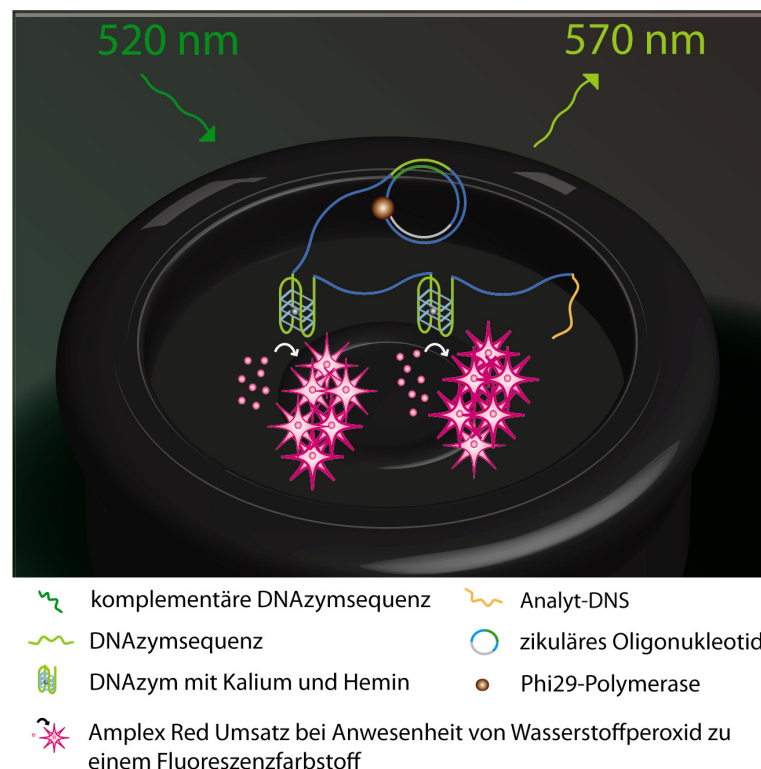


Abbildung 4.6.1 | Hotpot-Assay Prinzip. Für den Ansatz wird ein schwarzer Nano-Well-Chip aus Polypropylen und 1.024 Kavitäten genutzt. Jede Kavität stellt einen eigenen Reaktionsraum dar. Alle verwendeten Substanzen werden zusammen mittels Dispensierroboter in die Nano-Wells dispensiert. Die Zugabe des Startmoleküls mit dem gebundenen Analyten in das Reaktionsgemisch startet die RCA und das RCP wird synthetisiert. Die synthetisierten DNAzyme in dem RCP werden konformiert. Während die RCA weiter läuft, setzen die katalytisch aktiven DNAzyme bereits das Amplex Red um.

Der erfolgreich erstellte Hotpot-Assay im 96er Mikrotiterplatten-Format wird von 70 μl auf 50 nl in den Nano-Well-Chips miniaturisiert (Abb. 4.6.1). Aufgrund der effizienten Miniaturisierung auf 50 nl Reaktionsansatz pro Kavität ist nur ein geringer Einsatz von Probenmaterial notwendig, was den Ansatz sehr attraktiv für den Nachweis von geringen Stoffmengen macht. Durch die Kombination der RCA mit den DNAzymen und der weiteren Miniaturisierung des Ansatzes zu dem Hotpot-Assay beobachtet man eine gesteigerte Sensitivität.

Von ursprünglich 125 nM einzelsträngiger DNAzyme in einer 96er Mikrotiterplatte (Abb. 3.6.1.4) werden im optimierten Hotpot-Assay 152 fM Analyt-DNS in den Nano-Well-Chip pro Kavität detektiert (Abb. 3.7.4.1). Damit wird die Sensitivität um den Faktor 10^6 gesteigert.

Die RCA ist eine lineare Amplifikation und führt daher, wie in Abbildung 4.6.2 sehr gut zu sehen ist, zu einem linearen Signalanstieg, der auf die Synthese der DNAzyme und deren katalytische Aktivität zurückzuführen ist. Die dargestellten Daten werden aus technischen Triplikaten der Probe in den Kavitäten berechnet. Der Hotpot-Assay zeichnet sich durch ein sehr stabiles Signal mit einer geringen Abweichung der Triplikate aus. Der Hotpot-Assay weist eine stabile Messgenauigkeit auf.

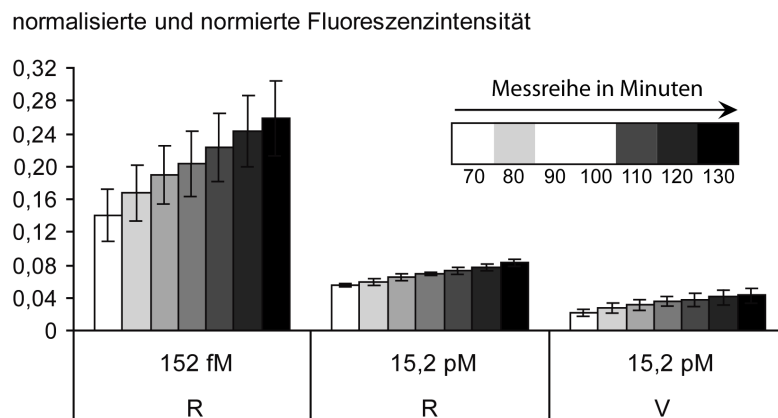


Abbildung 4.6.2 | Sensitivität des Hotpot-Ansatzes. Im Hotpot-Ansatz wird die katalytische Aktivität der DNAzyme der ersten (R) und der zweiten Generation (V) im RCP bei 152 fM und 15,2 pM Startmolekülen nach 70 Minuten Inkubation über einen Zeitraum von einer Stunde gemessen.

Die Kombination der RCA mit DNAzymen ermöglicht es, einen Assay zu entwickeln, der einen Analyten mit 4.600 Molekülen in einem Volumen von 50 nl (Abb. 3.7.4.1) nachweisen kann. Die Höhe der Signalintensitäten der Proben mit weniger Startmolekülen nimmt ausnahmslos zu, wie exemplarisch in der Abbildung 4.6.2 zu sehen ist. Eine mögliche Erklärung dafür wäre ein Effekt des Verhältnisses von

Molekülen zum Volumen. Durch die Zunahme an Platz für jedes RCP in den Reaktionsräumen könnten auch die benötigten Komponenten des Hotpot-Ansatzes leichter an die DNAzymsequenzen kommen. Der Substratumsatz würde durch das kontinuierliche Angebot an Substrat in der Nähe gesteigert werden. Es zeigt sich ein klarer Unterschied zwischen DNAzymen erster und zweiter Generation innerhalb des RCPs. DNAzyme zweiter Generation haben eine viel höhere katalytische Aktivität als Einzelmoleküle, aber die erste Generation an DNAzymen zeigt die besseren Ergebnisse in der RCA, bei der die DNAzyme miteinander verbunden vorliegen. Dies könnte auf die einfachere Konformationsstruktur des DNAzyms der ersten Generation zurück gehen⁴⁹, da das DNAzym der zweiten Generation neben dem G-Quadruplex eine zusätzliche Haarnadelstruktur ausbildet. Zusätzlich ist bekannt, dass die umgebende Sequenz einen Einfluss auf die Effektivität der Konformation hat⁷¹.

Abschließend lässt sich feststellen, dass die amplifizierte DNS die Fähigkeit hat, innerhalb der Struktur des RCPs katalytisch aktive DNAzyme zu bilden, deren Substratumsatz in dem Hotpot-Assay gemessen werden kann. Der Hotpot-Assay wird erfolgreich miniaturisiert und mit 4.600 Startmolekülen durchgeführt. Basierend auf der RCA wird mit dem Hotpot-Assay im Rahmen dieser Arbeit ein sehr sensitives Nachweissystem entwickelt.

4.7 Anwendungen

Vergleicht man die etablierten miniaturisierten Nachweissysteme, können die direkte und indirekte Markierung 6×10^8 Moleküle und die Markierung über DNAzyme 4.600 Moleküle detektieren. Vergleicht man die etablierten klassischen Ansätze des RCA-basierten Nachweises auf Aldehydarrays mit dem Hotpot-Assay, steht eine Sensitivität von 1 μM der von 157 fM gegenüber. Der Hotpot-Ansatz ist um den Faktor 6×10^7 sensitiver und zeigt das größte Potential auf, zu einem effektiven Werkzeug weiter entwickelt werden zu können.

Ein Ansatz zur *microRNA* Detektion von Cheng et al. und Kollegen⁶¹ hat unter Verwendung der RCA zu einem Nachweis von 10 fM Probe geführt. Dieser Ansatz wurde in Lösung in einem Volumen von 600 μl mit 6 amol Probe durchgeführt. *MicroRNA* sind kurze nichtkodierende RNS-Sequenzen, die eine regulatorische Funktion der Genexpression in den Zellen ausüben. In dem vorgestellten Ansatz wurden *microRNAs* über eine spezielle RCA, der *branched* RCA nachgewiesen. Bei der *branched* RCA werden entlang des entstehenden RCPs weitere Primer gebunden, die als Startpunkt für weitere RCPs dienen. Das RCP wurde über SYBR Green I markiert. Die *microRNAs* dienen in der *branched* RCA als Primer zur Ligation eines

Oligonukleotides, so wie die Primer der in dieser Arbeit vorgestellten Ansätze. Dieses Startmolekül wurde nur in der Anwesenheit der entsprechenden *microRNA* ligiert. Der *branched* RCA-Ansatz lässt sich daher gut mit den in dieser Arbeit vorgestellten Ansätzen vergleichen.

Die klassischen Nachweissysteme können 1 μM Zielmoleküle pro nl detektieren, dies entspricht 1 fmol Molekülen. Damit ist die *branched* RCA mit 6 amol Molekülen um den Faktor 10^3 sensitiver. Die klassischen Nachweissysteme müssen weiter optimiert werden, um die Sensitivität der bestehenden Systeme zu erreichen. Der in dieser Arbeit beschriebene Ansatz wird im Vergleich zu dem *branched* RCA-Ansatz mit 600 μl bereits eine erfolgreiche Miniaturisierung vorgenommen, die auf der Oberfläche von *Microarrays* einen hohen Probendurchsatz zur parallelen Analyse ermöglicht. Dies ist ein bedeutsamer Vorteil der klassischen Nachweissysteme gegenüber dem *branched* RCA-Ansatz.

Der Hotpot-Ansatz detektiert wie der *branched* RCA-Ansatz ebenfalls im fM Bereich, jedoch nur bei 157 fM und damit ist der *branched* RCA-Ansatz sensitiver. Durch die Miniaturisierung des Hotpot-Ansatzes, der wie der *branched* RCA-Ansatz in Lösung abläuft, werden in 50 nl 8 zmol des Moleküls detektiert. In dem 600 μl *branched* RCA-Ansatz befinden sich 6 amol der Probe. Damit ist der in dieser Arbeit vorgestellte Hotpot-Assay relativ gesehen durch die Miniaturisierung sensitiver, da weniger Probe zur Detektion eingesetzt werden muss. Wie die klassischen Nachweissysteme dieser Arbeit zeichnet sich der Hotpot-Assay ebenfalls durch einen hohen Probendurchsatz und die parallele Analyse aus.

Dadurch ist der Hotpot-Assay mit der speziellen Kombination von RCA mit DNAzymen ein sehr sensitiver Ansatz, dessen erfolgreiche Miniaturisierung Möglichkeiten eines Nachweissystems für Multiplexing und Hochdurchsatz Ansätze eröffnet, bei dem die Probe selber nicht markiert werden muss.

Die DNS dient hier in Form des RCPs mit den gekoppelten DNAzymen als Sensor und Verstärker des Signals. Der Hotpot-Assay kann gekoppelt an Bindungspartner wie Antikörper, Aptamere oder Nukleinsäuren wie im Fall der *microRNAs* für den Nachweis von verschiedensten Molekülen eingesetzt werden. Die Konjugation von Nukleinsäuren an Proteinen führt zu stabilen Verbindungen⁷³, daher ist die Kombination mit Antikörpern möglich. Basierend auf dem Prinzip herkömmlicher Schnelltests könnte ein einfacher gebräuchlicher Lab-on-a-Chip für gering konzentrierte Proben entstehen, da alle Reaktionen des Hotpot in einer homogenen Lösung aufeinanderfolgend ablaufen.

5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es, Ansätze für Nachweissysteme von Biomolekülen zu entwickeln, die auf dem Prinzip der *Rolling Circle Amplification* beruhen. Dafür wurde zunächst ein Protokoll zur enzymatischen Synthese des Ausgangsmaterials der RCA, eines zirkulären Oligonukleotids, erstellt und optimiert. Mit dem zirkulären Oligonukleotid wurde ein RCA-Protokoll in Lösung entwickelt. Der Nachweis der Produkte der RCA erfolgte direkt über den Einbau von markierten Nukleotiden und indirekt durch die Hybridisierung von markierten Sonden an das *Rolling Circle Product* (RCP) und wurde mittels *Dot Blots* analysiert. Das erfolgreich etablierte RCA-Protokoll wurde auf magnetische *Beads* und auf *Microarrays* übertragen. In diesem miniaturisierten Format war es möglich, das RCP direkt und indirekt nachzuweisen. Die Untersuchung verschiedener Linkerlängen der Primer und des Biotin-dUTPs zeigte, dass bei Verwendung eines immobilisierten Primers mit einer Linkerlänge von 17 Nukleotiden und dem Biotin-dUTP ohne Linker auf dem *Microarray* die höchsten Fluoreszenzintensität der RCA erzielt wurden.

Alternativ zu diesen herkömmlichen Nachweissystemen wurde ein Ansatz entwickelt, der die RCA mit katalytisch aktiven Nukleinsäuresequenzen, den DNAzymen kombiniert. Für diesen Ansatz wurden DNAzyme mit einer Peroxidase-Aktivität verwendet. Zunächst wurden die DNAzyme der ersten und der zweiten Generation charakterisiert. Über die RCP-Synthese war es möglich, gekoppelte DNAzyme herzustellen und deren katalytische Aktivität durch den Umsatz des Eduktes zu einem Fluoreszenzfarbstoff zu messen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein neuer Ansatz, der Hotpot-Assay, entwickelt. In dem Hotpot-Assay laufen alle Reaktionen der RCA und der DNAzyme kombiniert in einer homogenen Lösung ab. Der Hotpot-Assay wurde von einem 70 µl Ansatz im 96er Mikrotiterplatten-Format erfolgreich auf 50 nl miniaturisiert in Nano-Well-Chips durchgeführt. Durch die Kombination von RCA und einem DNAzym der ersten Generation in einem Volumen von 50 nl konnten 4.600 Moleküle nachgewiesen werden. Die in dieser Arbeit vorgestellten direkten, indirekten und alternativen Nachweissysteme können als Sensoren dienen und können mit analytischspezifischen Bindungspartnern wie Nukleinsäuresonden, Antikörpern oder Aptameren kombiniert werden. Mit dem Hotpot-Assay wurde ein sehr sensibler Ansatz erarbeitet, der für den Nachweis von Biomolekülen, die in geringen Stoffmengen vorliegen, weiter entwickelt werden kann und damit für die klinische Diagnostik, die Lebensmittelindustrie, die Forschung und im speziellen für *Lab-on-a-Chip*-Modelle von großer Bedeutung ist.

6. Zusammenfassung (englisch)

The aim of this work was the development of alternative detection assays based on the Rolling Circle Amplification (RCA). Therefore the protocol for the enzymatic synthesis of the starting material for the RCA a circular oligonucleotide was optimised. With this circular oligonucleotide a protocol for the RCA in solution was developed. The detection of the Rolling Circle Product (RCP) was carried out directly by incorporation of labelled nucleotides and indirectly by labelled probes and was analysed via dot blots. The successfully established protocol for the RCA in solution was transferred to an approach using magnetic beads and miniaturised to microarrays. The direct and indirect detection of the RCP was also possible for this miniaturised format. Analysis of the spacer lengths of the immobilised primer and the biotin-dUTP revealed that a 17 nucleotide long spacer and biotin-dUTP without a spacer showed the highest fluorescence signals after RCA on microarrays. As an alternative to the common detection approaches an assay was developed which combined the RCA with catalytic nucleic acid sequences, so-called DNAzymes. For this approach a DNAzyme with a peroxidase activity was used. First the catalytic activity of first and second generation DNAzymes was characterised. Through the RCP synthesis it was possible to produce linked DNAzymes and to measure their catalytic activity by the turnover of an educt to a fluorescent dye. Based on these results a new assay, the hotpot assay was developed. The hotpot assay works by adding all required components in one step to the wells. It combines all reactions in a homogeneous mix. This assay was subsequently miniaturised from 70 µl in 96 well plates to 50 nl in nano-well chips. With this alternative assay 4,600 molecules could be detected in a 50 nl per cavity using the combination of RCA and first generation DNAzymes. The presented direct, indirect and alternative detection systems can serve as sensor and can be combined with analyte specific detection molecules like antibodies, aptamers or nucleic acid probes. With the hotpot assay a very sensitive approach was developed, which can be further improved for the detection of biomolecules in low amounts. Therefore it has a great potential for clinical diagnostic, food industry, research and lab-on-a-chip systems.

7. Literaturverzeichnis

1. Kolin, A. & Kado, R.T. Miniaturization of the Electromagnetic Blood Flow Meter and Its Use for the Recording of Circulatory Responses of Conscious Animals to Sensory Stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **45**, 1312-21 (1959).
2. Ekins, R., Chu, F. & Micallef, J. High specific activity chemiluminescent and fluorescent markers: their potential application to high sensitivity and 'multi-analyte' immunoassays. *J Biolumin Chemilumin* **4**, 59-78 (1989).
3. Ekins, R. Immunoassay: recent developments and future directions. *Nucl Med Biol* **21**, 495-521 (1994).
4. Ekins, R.P. & Chu, F. Developing multianalyte assays. *Trends Biotechnol* **12**, 89-94 (1994).
5. Zhou, Y. et al. A dumbbell probe-mediated rolling circle amplification strategy for highly sensitive microRNA detection. *Nucleic Acids Res.*
6. Jazdzewski, K. et al. Polymorphic mature microRNAs from passenger strand of pre-miR-146a contribute to thyroid cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 1502-5 (2009).
7. Bas, A., Forsberg, G., Hammarstrom, S. & Hammarstrom, M.L. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scand J Immunol* **59**, 566-73 (2004).
8. Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. & Williams, P.M. Real time quantitative PCR. *Genome Res* **6**, 986-94 (1996).
9. Gibson, U.E., Heid, C.A. & Williams, P.M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* **6**, 995-1001 (1996).
10. Shalon, D., Smith, S.J. & Brown, P.O. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res* **6**, 639-45 (1996).
11. Pease, A.C. et al. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 5022-6 (1994).

12. Horak, C.E. et al. GATA-1 binding sites mapped in the beta-globin locus by using mammalian chlp-chip analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2924-9 (2002).
13. DeRisi, J. et al. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet* **14**, 457-60 (1996).
14. Baek, Y.S. et al. Identification of novel transcriptional regulators involved in macrophage differentiation and activation in U937 cells. *BMC Immunol* **10**, 18 (2009).
15. Swift, J.L. & Cramb, D.T. Nanoparticles as fluorescence labels: is size all that matters? *Biophys J* **95**, 865-76 (2008).
16. Kapanidis, A.N. & Strick, T. Biology, one molecule at a time. *Trends Biochem Sci* **34**, 234-43 (2009).
17. Conze, T. et al. Single molecule analysis of combinatorial splicing. *Nucleic Acids Res.*
18. Blanco, L., Lazaro, J.M., de Vega, M., Bonnin, A. & Salas, M. Terminal protein-primed DNA amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12198-202 (1994).
19. Weigel, C. & Seitz, H. Bacteriophage replication modules. *FEMS Microbiol Rev* **30**, 321-81 (2006).
20. Kamtekar, S. et al. Insights into strand displacement and processivity from the crystal structure of the protein-primed DNA polymerase of bacteriophage phi29. *Mol Cell* **16**, 609-18 (2004).
21. Blanco, L. & Salas, M. Relating structure to function in phi29 DNA polymerase. *J Biol Chem* **271**, 8509-12 (1996).
22. Baner, J., Nilsson, M., Mendel-Hartvig, M. & Landegren, U. Signal amplification of padlock probes by rolling circle replication. *Nucleic Acids Res* **26**, 5073-8 (1998).
23. Liu, D., Daubendiek, S.L., Zillman, M.A., Ryan, K.a. & Kool, E.T. Rolling Circle DNA Synthesis: Small Circular Oligonucleotides as Efficient Templates for DNA Polymerases. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 1587-1594 (1996).
24. Zhou, L., Ou, L.J., Chu, X., Shen, G.L. & Yu, R.Q. Aptamer-based rolling circle amplification: a platform for electrochemical detection of protein. *Anal Chem* **79**, 7492-500 (2007).

25. Neubacher, S. & Arenz, C. Rolling-Circle Amplification: Unshared Advantages in miRNA Detection. *ChemBiochem* (2009).
26. Blanco, L. et al. Highly efficient DNA synthesis by the phage phi 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. *J Biol Chem* **264**, 8935-40 (1989).
27. Sato, K. et al. Microbead-based rolling circle amplification in a microchip for sensitive DNA detection. *Lab Chip* **10**, 1262-6 (2010).
28. Landegren, U. et al. Padlock and proximity probes for in situ and array-based analyses: tools for the post-genomic era. *Comp Funct Genomics* **4**, 525-30 (2003).
29. Dahl, F. et al. Circle-to-circle amplification for precise and sensitive DNA analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4548-53 (2004).
30. Kingsmore, S.F. & Patel, D.D. Multiplexed protein profiling on antibody-based microarrays by rolling circle amplification. *Curr Opin Biotechnol* **14**, 74-81 (2003).
31. Lizardi, P.M. et al. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nat Genet* **19**, 225-32 (1998).
32. Fredriksson, S. et al. Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays. *Nat Biotechnol* **20**, 473-7 (2002).
33. Mizuta, R., Mizuta, M. & Kitamura, D. Atomic force microscopy analysis of rolling circle amplification of plasmid DNA. *Arch Histol Cytol* **66**, 175-81 (2003).
34. Breaker, R.R. & Joyce, G.F. A DNA enzyme that cleaves RNA. *Chem Biol* **1**, 223-9 (1994).
35. Carmi, N. & Breaker, R.R. Characterization of a DNA-cleaving deoxyribozyme. *Bioorg Med Chem* **9**, 2589-600 (2001).
36. Breaker, R.R. & Joyce, G.F. A DNA enzyme with Mg(2+)-dependent RNA phosphoesterase activity. *Chem Biol* **2**, 655-60 (1995).
37. Li, Y. & Breaker, R.R. Phosphorylating DNA with DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2746-51 (1999).
38. Purtha, W.E., Coppins, R.L., Smalley, M.K. & Silverman, S.K. General deoxyribozyme-catalyzed synthesis of native 3'-5' RNA linkages. *J Am Chem Soc* **127**, 13124-5 (2005).

39. Breaker, R.R. Catalytic DNA: in training and seeking employment. *Nat Biotechnol* **17**, 422-3 (1999).
40. Ito, Y. & Hasuda, H. Immobilization of DNAzyme as a thermostable biocatalyst. *Biotechnol Bioeng* **86**, 72-7 (2004).
41. Willner, I., Shlyahovsky, B., Zayats, M. & Willner, B. DNAzymes for sensing, nanobiotechnology and logic gate applications. *Chem Soc Rev* **37**, 1153-65 (2008).
42. Travascio, P., Li, Y. & Sen, D. DNA-enhanced peroxidase activity of a DNA-aptamer-hemin complex. *Chem Biol* **5**, 505-17 (1998).
43. Li, B., Dong, S. & Wang, E. Homogeneous Analysis: Label-Free and Substrate-Free Aptasensors. *Chem Asian J* (2010).
44. Zhou, W.H. et al. Amplified detection of protein cancer biomarkers using DNAzyme functionalized nanoprobe. *Chem Commun (Camb)*, 6845-7 (2009).
45. Li, W. et al. Label-free colorimetric assay for methyltransferase activity based on a novel methylation-responsive DNAzyme strategy. *Anal Chem* **82**, 1935-41 (2010).
46. Xiao, Y., Pavlov, V., Gill, R., Bourenko, T. & Willner, I. Lighting up biochemiluminescence by the surface self-assembly of DNA-hemin complexes. *Chembiochem* **5**, 374-9 (2004).
47. Teller, C., Shimron, S. & Willner, I. Aptamer-DNAzyme hairpins for amplified biosensing. *Anal Chem* **81**, 9114-9 (2009).
48. Cheglakov, Z., Weizmann, Y., Basnar, B. & Willner, I. Diagnosing viruses by the rolling circle amplified synthesis of DNAzymes. *Org Biomol Chem* **5**, 223-5 (2007).
49. Li, T., Wang, E. & Dong, S. A grafting strategy for the design of improved G-quadruplex aptamers and high-activity DNAzymes. *PLoS One* **4**, e5126 (2009).
50. Nallur, G. et al. Signal amplification by rolling circle amplification on DNA microarrays. *Nucleic Acids Res* **29**, E118 (2001).
51. Stougaard, M., Lohmann, J.S., Zajac, M., Hamilton-Dutoit, S. & Koch, J. In situ detection of non-polyadenylated RNA molecules using Turtle Probes and target primed rolling circle PRINS. *BMC Biotechnol* **7**, 69 (2007).

52. Berger, M.F. & Bulyk, M.L. Universal protein-binding microarrays for the comprehensive characterization of the DNA-binding specificities of transcription factors. *Nat Protoc* **4**, 393-411 (2009).
53. Dahl, A. et al. Quantitative PCR based expression analysis on a nanoliter scale using polymer nano-well chips. *Biomed Microdevices* **9**, 307-14 (2007).
54. Wing, R. et al. Crystal structure analysis of a complete turn of B-DNA. *Nature* **287**, 755-8 (1980).
55. Lohmann, J.S., Stougaard, M. & Koch, J. A new enzymatic route for production of long 5'-phosphorylated oligonucleotides using suicide cassettes and rolling circle DNA synthesis. *BMC Biotechnol* **7**, 49 (2007).
56. Navidad, P.D., Li, H., Mankertz, A. & Meehan, B. Rolling-circle amplification for the detection of active porcine circovirus type 2 DNA replication in vitro. *J Virol Methods* **152**, 112-6 (2008).
57. Yang, L., Fung, C.W., Cho, E.J. & Ellington, A.D. Real-time rolling circle amplification for protein detection. *Anal Chem* **79**, 3320-9 (2007).
58. Branham, W.S. et al. Elimination of laboratory ozone leads to a dramatic improvement in the reproducibility of microarray gene expression measurements. *BMC Biotechnol* **7**, 8 (2007).
59. Kumar, R. et al. Template-directed oligonucleotide strand ligation, covalent intramolecular DNA circularization and catenation using click chemistry. *J Am Chem Soc* **129**, 6859-64 (2007).
60. Pourceau, G., Meyer, A., Vasseur, J.J. & Morvan, F. Azide solid support for 3'-conjugation of oligonucleotides and their circularization by click chemistry. *J Org Chem* **74**, 6837-42 (2009).
61. Cheng, Y. et al. Highly sensitive determination of microRNA using target-primed and branched rolling-circle amplification. *Angew Chem Int Ed Engl* **48**, 3268-72 (2009).
62. Dean, F.B., Nelson, J.R., Giesler, T.L. & Lasken, R.S. Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Res* **11**, 1095-9 (2001).
63. Randolph, J.B. & Waggoner, A.S. Stability, specificity and fluorescence brightness of multiply-labeled fluorescent DNA probes. *Nucleic Acids Res* **25**, 2923-9 (1997).

64. Anderson, J.P., Angerer, B. & Loeb, L.A. Incorporation of reporter-labeled nucleotides by DNA polymerases. *Biotechniques* **38**, 257-64 (2005).
65. Balamurugan, S., Obubuafo, A., McCarley, R.L., Soper, S.A. & Spivak, D.A. Effect of linker structure on surface density of aptamer monolayers and their corresponding protein binding efficiency. *Anal Chem* **80**, 9630-4 (2008).
66. Shchepinov, M.S., Case-Green, S.C. & Southern, E.M. Steric factors influencing hybridisation of nucleic acids to oligonucleotide arrays. *Nucleic Acids Res* **25**, 1155-61 (1997).
67. Tran, P.H. et al. Microarray optimizations: increasing spot accuracy and automated identification of true microarray signals. *Nucleic Acids Res* **30**, e54 (2002).
68. Dandy, D.S., Wu, P. & Grainger, D.W. Array feature size influences nucleic acid surface capture in DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 8223-8 (2007).
69. Preininger, C., Sauer, U., Dayteg, J. & Pichler, R. Optimizing processing parameters for signal enhancement of oligonucleotide and protein arrays on ARChip Epoxy. *Bioelectrochemistry* **67**, 155-62 (2005).
70. Dufva, M. Fabrication of high quality microarrays. *Biomol Eng* **22**, 173-84 (2005).
71. Hazel, P., Huppert, J., Balasubramanian, S. & Neidle, S. Loop-length-dependent folding of G-quadruplexes. *J Am Chem Soc* **126**, 16405-15 (2004).
72. Tian, Y., He, Y. & Mao, C. Cascade signal amplification for DNA detection. *ChemBiochem* **7**, 1862-4 (2006).
73. Niemeyer, C.M. Semisynthetic DNA-protein conjugates for biosensing and nanofabrication. *Angew Chem Int Ed Engl* **49**, 1200-16 (2010).