

**Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt  
Medizinische Chemie und Pathobiochemie**  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin  
Berlin

DISSERTATION

*Entwicklung eines Mikropartikelhydrolysesondenassays  
für die Genexpressionsanalyse*

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Stefan Rödiger  
aus Gera

Datum der Promotion: 25.10.2013

---

## Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
2. Abstract.....	2
3. Einleitung.....	3
4. Zielstellung.....	6
5. Methodik.....	7
5.1. Molekularbiologische Arbeiten.....	7
5.2. Technologische Entscheidungen und Entwicklungen.....	7
5.3. Statistische Datenanalyse.....	7
6. Ergebnisse.....	8
6.1. Konzept des VideoScan-Systems.....	8
6.2. Statistische Messdatenanalyse.....	9
6.3. Mikropartikelcharakterisierung und Oberflächenfunktionalisierung.....	9
6.4. Kopplungsmethoden von Fängersonden.....	10
6.5. Eigenschaften von Sondensystemen.....	11
6.6. Echtzeitmessung der Fängersondenhybridisierung.....	12
6.7. Schmelzkurvenanalyse von DNA-Sonden.....	12
6.8. Wahl von Amplifikations- und Nachweisverfahren.....	13
6.9. Real-Time-PCR mit Mikropartikeln.....	14
7. Diskussion und Schlussfolgerung.....	17
8. Literaturverzeichnis.....	20
9. Ausgewählte Publikationen.....	21
9.1. Rödiger et al., 2012b.....	22
9.2. Rödiger et al., 2012a.....	62
9.3. Rödiger et al., 2011a.....	96
9.4. Rödiger et al., submitted.....	113
9.5. Rödiger et al., 2011b.....	124
9.6. Rödiger et al., 2008a.....	139
9.7. Lehmann et al., 2008.....	169
10. Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen.....	188
11. Lebenslauf.....	190
12. Publikationsliste.....	192
13. Eidesstattliche Versicherung.....	197
14. Danksagung.....	198

---

---

## 1. Zusammenfassung

Die Entwicklung effektiver Behandlungsmethoden bei kardialen Erkrankungen basiert auf einem umfangreichen Verständnis zellphysiologischer und genregulatorischer Abläufe in Herzmuskelzellen. Kenntnisse über die Genexpression und Charakteristika der involvierten Moleküle ermöglichen Rückschlüsse auf die Reaktion nach Stressereignissen. Es existieren vielzählige Technologien mit denen Genanalysen und Charakterisierung von Biomolekülen möglich sind. Jedoch sind diese i) meist im Multiplexgrad begrenzt, ii) auf eine bestimmte Aufgabe beschränkt, iii) können keine temperaturgesteuerten Real-Time-Anwendungen abarbeiten, iv) haben hohe technische Anforderungen und/oder v) verursachen hohe Kosten.

Ziel der Arbeit war die Entwicklung einer neuen technologischen Plattform, bezeichnet als VideoScan, zusammen mit Assays zur Amplifikation und Quantifizierung von Nukleinsäuren humanen Ursprungs. Um den Ansprüchen der modernen Multiparameternukleinsäureanalytik gerecht zu werden, wurden homogene Assays für quantitative Messungen von Biomolekülen entworfen. Ein Vorsprung über existierende Bioanalytiktechnologien sollte durch Kombination der mikropartikelbasierten VideoScan-Technologie mit Standardlabormethoden erreicht werden.

Zunächst wurden Methoden zur Charakterisierung der Materialien, Sondensysteme und neue Assayformate etabliert. Die neuartige mikropartikelbasierte Technologie wurde für die Multiparameteranalytik charakterisiert und Reaktionsabläufe für die Genexpressionsanalyse entwickelt. Das VideoScan-System wurde um Verfahren zur Kinetikmessung von Hybridisierungsassays, Schmelzkurvenanalysen, und Quantitative-Real-Time-PCRs im Multiplexformat erweitert. Für die Analyse der Kinetikmessdaten wurden Algorithmen und Plugins in eine Statistiksoftware implementiert. Mikropartikelbasierte Assays benötigen eine homogene Funktionalisierung der Mikropartikeloberfläche um in Assays optimal genutzt werden zu können. Dafür wurde ein Fluoreszenzfarbstoffadsorptionsassay entwickelt, mit dem die Qualität und Quantität der Mikropartikelcarboxylierung routinemäßig kontrolliert werden kann. Darauf aufbauend wurden Strategien für die optimale kovalente und nicht-kovalente Immobilisierung von Biomolekülen evaluiert.

Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmalig ein Gesamtsystem bestehend aus vollständig charakterisierten Mikropartikeln, Auswertungssoftware und Assayentwicklungen. Das System kombiniert die Eigenschaften der quantitativen Real-Time-PCR mit einem multiplexen mikropartikelbasiertem Detektionssystem. Es ermöglicht die Genexpressionsanalyse kardialer Marker und Rezeptoren und bietet somit die Möglichkeit, genregulatorische Abläufe von Kardiomyozyten zu analysieren.

## 2. Abstract

The development of effective treatment for cardiac diseases is based on a comprehensive understanding of cell-physiological and gene-regulatory processes of heart muscle cells. Knowledge on gene expression and characteristics of the involved molecules allows conclusions regarding stress mediated reactions. There is a vast number of technologies for gene analysis and characterization of biomolecules. However, most are i) limited in their multiplexing capabilities, ii) tied to a specific task, iii) can not perform temperature controlled real-time applications, iv) have high technical demands and/or v) are cost-intensive.

The aim of this thesis was the development of a novel technological platform, designated VideoScan, along with assays to amplify and quantify DNA of human cardiac origin. In order to meet the requirements of modern multiparameter bioanalytics, assays for quantitative measurements of biomolecules in homogenous formats were designed. A competitive edge compared with existing bioanalytical technologies has been achieved by combining the microbead-based VideoScan-technology and standard laboratory technologies such as multiplex qPCR.

First of all, methods for the characterization of the material, probe systems and new assay formats were established. Using this information, the novel multiparameter microbead-based technology for gene-expression analysis was characterized and reaction schemes were developed. The VideoScan-technology was extended to perform kinetic data acquisition of multiplex hybridization assays, melting curve analysis and multiplex quantitative real-time PCRs. To analyze the amplification-, hybridization and melting curve data algorithms and plugins were implemented within a statistical software framework.

For reproducible performance, microbead-based assays rely on microbeads with homogenous chemical surfaces. A novel, yet simple, fluorescence dye adsorption assay was developed to control routinely both the quality and quantity of the microbead carboxylation. Following this strategy, optimal non-covalent and covalent immobilization methods of biomolecules were developed and DNA probe systems were tested.

The present work describes for the first time an overall system consisting of fully characterized microbeads, software for data analysis and bioanalytical assays restate what the system is used for here. The system combines the properties of quantitative real-time PCR and highly multiplex microbead-based detection. The described system enables gene-expression analysis of cardiac markers and receptors and therefore offers tools to analyze gene-regulatory processes of cardiomyocytes.

### 3. Einleitung

**Einordnung in den klinischen Kontext:** Die Entwicklung neuer Behandlungsmethoden bei kardialen Erkrankungen basiert auf einem umfangreichen Verständnis zellphysiologischer Abläufe in Herzmuskelzellen. Insbesondere Kenntnisse über die zelluläre Differenzierung und Reaktion auf Stressereignisse sind dabei von fundamentaler Bedeutung. Von einigen Genen wurde vermutet, dass sie im Rahmen der Pathogenese der Dilatativen Kardiomyopathie (DCM) ein verändertes Genexpressionsverhalten zeigen (Taylor & Bristow, 2006). Die DCM hat eine Mortalitätsrate von 50 % innerhalb von fünf Jahren und ist die häufigste Ursache für eine Herztransplantation. Charakteristisch für die DCM sind die starke Volumenzunahme (Dilatation) des linken und rechten Ventrikels und eine homogene kontraktile Dysfunktion des Myokards, mit der Folge einer eingeschränkten systolischen Funktion. Für circa 20 – 40 % der DCM-Patienten wird von einer vererbten Form der Erkrankung ausgegangen. Die verbleibenden 60 % sind idiopathisch, beziehungsweise sind mit autoimmunologischen Prozessen, kardialen Toxinen oder viralen Infektionen assoziiert (Osterziel & Perrot, 2005). Autoantikörpern gegen den  $\beta$ 1-Adrenorezeptor der Myokardzelle wird vorrangig eine Bedeutung im Rahmen der Genese der DCM zugebilligt. Ausgehend von klinischen Studien, unter anderem auch durch die Arbeitsgruppe Prof. Schimke, in denen für die DCM eine Assoziation mit gesteigertem oxidativen Stress gezeigt wurde (Keith *et al.*, 1998; Schimke *et al.*, 2001), wurde postuliert, dass oxidativer Stress allgemein beziehungsweise als Vermittler der Autoantikörperwirkung wesentlich zur Veränderung des myokardialen Genexpressionsprofils bei der DCM beitragen könnte (Jahns *et al.*, 2004; Muthumala *et al.*, 2008; Rödiger *et al.*, 2012b).

**Methoden für die Genexpressionsanalyse und Bioanalytik:** Sowohl im *Life Science*-Bereich als auch in der Diagnostik besteht der Anspruch, die komplexen Veränderungen der Genexpression anhand einer geringen Probenmenge multiparametrisch quantifizieren zu können. Zwar existieren mehrere Technologien, allerdings unterliegen diese verschiedenen Limitationen, was folgend kurz umrissen wird. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) etablierte sich zur Standardmethode für die DNA-Amplifikation. Alternative Amplifikationsverfahren, die in Rödiger *et al.*, 2011b umfangreich beschrieben sind, haben nicht eine derartige Entwicklung genommen, sondern spielen nur bei speziellen Fragestellungen eine Rolle. Eine quantitative Variante der PCR ist die quantitative Real-Time-PCR (qPCR), bei der Amplifikation und Quantifizierung in einem Reaktionsraum (homogen) stattfinden (Rödiger *et al.*, 2011b). Die Quantifizierung des PCR-Produktes erfolgt in Echtzeit anhand der Änderung des Fluoreszenzsignals pro Zyklus. Ursprünglich wurde mit nicht-spezifisch DNA-bindenden

Fluoreszenzfarbstoffen (z. B. SYBR® Green) gearbeitet. Multiplexreaktionen oder der Ausschluss von Kontaminationen waren im Amplifikationssignal nicht möglich. Multiplexreaktionen wurden erst durch das Aufkommen von primerbasierten Technologien (z. B. *AmpliFluor primers*), Hybridisierungstechnologien (z. B. *Molecular Beacon*) oder hydrolysebasierten Sondensystemen (z. B. *TaqMan*) realisiert (Bustin, 2004). Die qPCR gilt als eines der präzisesten Verfahren und zeichnet sich durch einen geringen Zeitbedarf und ein gutes Verhältnis von Kosten zu Nutzen aus. Einige Technologien erlauben zudem die Differenzierung mittels Schmelzkurvenanalyse. Mit Multiplex-PCRs (mPCR) können mehrere DNA-Fragmente simultan amplifiziert werden, so dass mit dem gleichen Probenvolumen die Informationsdichte und der Probendurchsatz erhöht wird. Dabei werden mehrere Primerpaare simultan zur Amplifikation unterschiedlicher Genabschnitte eingesetzt. Für quantitative Multiplex-PCRs (mqPCR) müssen zusätzlich unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Nachweissonden oder Primer eingesetzt werden (Rödiger *et al.*, 2008a; Rödiger *et al.*, 2011b; Rödiger *et al.*, 2012b). Jedoch haben konventionelle qPCR-Thermocycler Beschränkungen bezüglich des Multiplexgrades. Derzeit sind maximal sieben Fluoreszenzkanäle (entspricht sieben *Targets*, 7-plex) verfügbar. Die Abstimmung der Fluoreszenzkanäle ist nicht trivial, da es zu spektralen Überlappungen kommt. Deshalb lassen sich in der Praxis meist nur Assays mit einem Multiplexgrad von 3 – 4 *Targets* aufbauen. Diese Technologie ist demnach nur für die simultane Quantifizierung von wenigen Genen anwendbar. Zur Ergänzung der hier angeführten Aspekte wird auf Rödiger *et al.*, 2011b verwiesen, wo alternative Methoden und Details zur Amplifikation beschrieben sind und weiterführende Literatur angeführt ist. Eine große Anzahl exprimierter Gene kann mit der Microarray-Technologie untersucht werden. Details zur Funktionsweise und Aufbau sind Rödiger *et al.*, 2008a zu entnehmen. Nachteilig sind allerdings der hohe Preis, lange Reaktionszeiten, ein geringer Probendurchsatz und die Beschränkung auf semiquantitative Aussagen, so dass Microarray-Ergebnisse durch qPCRs verifiziert werden müssen (Rödiger *et al.*, 2008a). Im Gegensatz zum *Life Science*-Bereich haben sich in der Routinediagnostik bisher nur wenige Microarrays durchgesetzt. Einen Ansatzpunkt für die zuvor beschriebenen Punkte liefern die in Rödiger *et al.*, 2011b angesprochenen „Kombinierten Technologien“. In den vergangenen Jahren wurden mikropartikelbasierte Detektionssysteme etabliert. Details der mikropartikelbasierten Technologien, wie Aufbau, Funktionsweise, Anwendungen und technische Abgrenzungen zu anderen Technologien, wurden in Rödiger *et al.*, 2008a und Rödiger *et al.*, 2012b diskutiert. Diese ermöglichen einen deutlich höheren Multiplexgrad als mqPCRs, der abhängig von der Technologie an den Multiplexgrad von Microarrays heranreicht.

Mikropartikelbasierte Assays sind hervorragende Werkzeuge für die Unterscheidung mehrerer Analyten in einer Probe. Sie können schnell an neue Fragestellungen adaptiert werden, da die Kombination von Mikropartikeln und deren Multiplexgrad frei bestimmbar ist. Durch die Mikropartikel kann eine drastische Erhöhung des Multiplexgrades gegenüber Standard qPCR-Thermocyclern erreicht werden, da theoretisch jede Mikropartikelpopulation gleichwertig zu einem Fluoreszenzkanal eines konventionellen qPCR-Thermocyclers ist. Mikropartikel sind in beliebiger Anzahl (redundant) einstellbar und können somit „Spottvariationen“ kompensieren. Ein definiertes Arraydesign wie beim Microarray entfällt (Rödiger *et al.*, 2008a; Rödiger *et al.*, 2012b). Eine fundamentale Eigenschaft von Mikropartikeln ist, dass sie aufgrund ihrer sphärischen Struktur eine bessere Hybridisierungskinetik als planare Oberflächen aufweisen. Dies trifft selbst dann zu, wenn sie nicht freischwebend in Lösung, sondern auf einer Oberfläche lokalisiert sind (Rödiger *et al.*, 2012b). Neben dem VideoScan-System existieren noch weitere mikropartikelbasierte Technologien mit computergestützter Auswertung (z. B. Luminex®-Systeme). Zumeist werden Endpunktbestimmungen von Biomolekülen durchgeführt, um eine qualitative oder (semi)quantitative Aussage zu erhalten (Rödiger *et al.*, 2008a; Rödiger *et al.*, 2012b). Unter den miniaturisierten Chip-Systemen beziehungsweise mikrofluidischen Systemen gibt es Plattformen, mit denen teilweise Kinetikmessungen (z. B. qPCRs, Schmelzkurvenanalysen oder Hybridisierungsassays) realisiert wurden (Godin *et al.*, 2008; Rödiger *et al.*, 2008a). Die meisten Technologien können nur einen Teilaspekt, wie Amplifikationen oder Hybridisierungsreaktionen, bearbeiten.

## 4. Zielstellung

Das Ziel der kumulativen Dissertation war die Weiterentwicklung des unter Beteiligung des Autors patentierten VideoScan-Systems zur multiplexen Genexpressionsanalyse, um die Interaktionen von Autoantikörpern und oxidativem Stress in Hinblick auf das daraus resultierende pathogenetische Potential untersuchen zu können.

1. Das VideoScan-System sollte ausgebaut werden, um unter dynamischen Temperaturprofilen Kinetikmessungen, wie qPCRs in Kombination mit Mikropartikeln, zu ermöglichen. Dafür musste geklärt werden, welche Eigenschaften Mikropartikel und Sondensysteme haben müssen, um in temperaturgesteuerten Assays genutzt werden zu können. Es sollte geklärt werden, ob es Unterschiede im Hybridisierungs- und Schmelzverhalten aufgrund der Immobilisierungsstrategie der Sondensysteme gibt.
2. Die Messdaten des VideoScan-Systems setzten gesonderte Maßstäbe für die statistische Analyse. Zudem war die Analyse von Messdaten aus kompetitiven Technologien, wie Durchflusszytometer und qPCR-Thermocycler notwendig, um Vergleiche anstellen zu können. Wesentliche Messdatentypen waren Kinetikmessreihen in Form von Multiplexhybridisierungsassays, -schmelzkurven, -amplifikationskurven und statische Messreihen aus Endpunktbestimmungen. Dafür sollte spezialisierte Statistiksoftware für die automatisierte Datenaufarbeitung und -analyse entwickelt und evaluiert werden, so dass sie in der Multiparameteranalytik, insbesondere für Kinetikmessungen, angewendet werden kann.
3. Die Auswahl von Mikropartikel, sowie deren qualitative und quantitative Charakterisierung stellte einen weiteren Schwerpunkt dar. Dafür waren die Oberflächenmodifikation und das temperaturabhängige Verhalten der Mikropartikel qualitativ und quantitativ zu beschreiben, so dass deren Verwendbarkeit unter qPCR-Bedingungen gewährleistet ist.
4. Weitere Fragestellungen bezogen sich auf die Charakterisierung und die Entwicklung neuer homogener Assayformate für Real-Time-Anwendungen. Es musste geklärt werden, welche Amplifikations- und Nachweisverfahren sich eignen und ob sich mit der neuentwickelten Technologie vergleichbare Ergebnisse wie mit etablierten Technologien erreichen lassen. Anhand spezifischer Transkripte aus Biopsiematerial von humanem Herzgewebe sollten Multiplex-PCRs und quantitative Real-Time-PCRs für herzspezifische Markergene, Rezeptoren und Referenzgene erstellt werden.



## 5. Methodik

In der vorliegenden Arbeit sind Schritte für die Entwicklungen eines neuartigen mikropartikelbasierten Nachweissystems zusammengefasst. Details sind Rödiger *et al.*, submitted, Rödiger *et al.*, 2012a, Rödiger *et al.*, 2011a und Rödiger *et al.*, 2012b zu entnehmen. In den Übersichtsarbeiten Rödiger *et al.*, 2008, Rödiger *et al.*, 2011b und dem Patent Lehmann *et al.*, 2008 sind Inhalte für technologische Entscheidungen dargestellt.

### 5.1. Molekularbiologische Arbeiten

Anhand von Literaturdaten wurden Primerpaare für herzspezifische Marker, Referenzgene und Rezeptoren entwickelt, die im Kontext der DCM und Kardiomyozytendifferenzierung eine Relevanz haben könnten. Die cDNA wurde entsprechend Rödiger *et al.*, 2012b aus ventrikulären Biopsiematerial präpariert. Für Adreno- und Endothelinrezeptoren (*ADRB1*, *ADRB2*, *ET<sub>A</sub>*, *ET<sub>B</sub>*) wurden Primerpaare entwickelt, welche bei der DCM bedeutsam sind. In qPCRs, mPCRs und Schmelzkurvenanalysen wurde mit *HPRT1*, *GAPDH* (Referenzgene), *SERCA2*, *MLC-2v*, *cTnT* (herzspezifische Marker) und *VIM* (Fibroblastenmarker) gearbeitet.

### 5.2. Technologische Entscheidungen und Entwicklungen

Als technische Grundlage wurde das unter Beteiligung des Autors patentierte VideoScan-System (Lehmann *et al.*, 2008; Rödiger *et al.*, 2012b) charakterisiert und mikropartikelbasierte Assays für die Multiplex-Real-Time-Detektion entwickelt. Die Eigenschaften des Systems wurden mit konventionellen Technologien verglichen. In Rödiger *et al.*, 2008a und Rödiger *et al.*, 2011b wurden Mikropartikeltechnologien und alternative Nukleinsäureamplifikationsverfahren diskutiert, die als Entscheidungsgrundlage während der Entwicklung dienten. Anhand der Ergebnisse und Konzeptentwürfe wurde das neuartige mikropartikelbasierte mqPCR-System entwickelt. Mikropartikelassays beruhen auf der Kopplung von Biomolekülen (z. B. Oligonukleotide) die als Bindungsstelle für weitere Biomoleküle fungieren. Es wurden Sondensysteme, Reaktionsbedingungen und Mikropartikeloberflächenmodifikation evaluiert, um eine optimale Biomolekülkopplung zu erreichen. Eine zentrale Komponente dieser Evaluation war der neuartige SYTO-62-Assay (Rödiger *et al.*, 2011a) zur exakten Beschreibung der Mikropartikelcarboxylierung.

### 5.3. Statistische Datenanalyse

Alle soweit vorgestellten Verfahren produzieren eine Fülle experimenteller Daten mit erheblichen Anforderungen an die Auswertesoftware. Daher wurden Plugins für die Statistiksoftware **RKward** (Rödiger *et al.*, 2012a), das **MBmca<sup>1</sup>** R-Paket (Rödiger *et al.*,

<sup>1</sup> <http://cran.r-project.org/web/packages/MBmca/index.html>

submitted) und **R**-Skripte entwickelt. Sie dienten zur Auswertung von statistischen Standardverfahren, Durchflusszytometer- und VideoScan-Daten in Rödiger *et al.*, 2011a und Rödiger *et al.*, 2012b. **RKward** ist ein graphisches Nutzerinterface (GUI, *Graphical User Interface*) und integrierte Entwicklungsumgebung (IDE, *Integrated Development Environment*) für die kommandozeilenorientierte Statistiksprache **R**. Die **RKward**-Plugins stellen komplette GUI-Dialoge bereit und setzen komplexe Abläufe systematisch in **R**-Code um. **RKward** und eine Vielzahl von Plugins wurden mit Thomas Friedrichsmeier (*Lead Developer*, Ruhr-Universität Bochum) und weiteren Autoren gemeinsam entwickelt. Die Plugins basieren auf **ECMAScript**, **R** und XML. Grundlagen zur Erstellung von Plugins und weiterführende Informationen sind in Rödiger *et al.*, 2012a dargestellt. Intern werden in **R**-Funktionen, Daten und Ergebnisse als Objekte prozessiert und ausgegeben werden können. Der Report erfolgt als HTML-Dokument (Rödiger *et al.*, 2012a). Da die Verteilung der Messwerte unbekannt war wurden parameterfreie Tests genutzt und p-Werte  $< 0,05$  als signifikant angesehen.

## 6. Ergebnisse

### 6.1. Konzept des VideoScan-Systems

Das VideoScan-System ist eine Multiplextechnologie für unterschiedliche Analyte. Messungen können sowohl in Lösung als auch auf Oberflächen erfolgen. Dafür werden computergestützt Bildausschnitte erstellt und anschließend prozessiert (Rödiger *et al.*, 2012b). Im Gegensatz zu anderen Plattformen nutzt das VideoScan-System kommerziell erhältliche Hardware und Verbrauchsmaterialien und bietet dem Nutzer im Labor gewohnte Arbeitsmaterialien. Bisher wurde das VideoScan-System ausschließlich zur Detektion von Proteinen und Antikörpern genutzt. Es ist eine zentrale Leistung der vorgelegten Dissertation, dass die Nukleinsäureanalytik insbesondere als zeit- und temperaturgesteuerte Kinetikmessungen (z. B. qPCRs, Hybridisierungskinetiken) mittels der VideoScan-HCU (*heating/cooling-unit*) durchgeführt werden können und sich auch qPCR-Bedingungen realisieren lassen. Zum Nachweis von *HPRT1* und *MLC-2v* wurde in qPCRs mit dem DNA-bindenden Farbstoff EvaGreen® oder einer Duplex-*TaqMan*-qPCR gearbeitet. Die Amplifikationseffizienzen und  $C_T$ -Werte waren vergleichbar mit dem iQ5-Thermocycler (Bio-Rad). Für Schmelzkurvenanalysen in Lösung konnte anhand von kurzen Oligonukleotidsequenzen und PCR-Produkten (Rödiger *et al.*, 2012b Kapitel 6.1, 6.2) gezeigt werden, dass mit dem VideoScan-System ebenfalls vergleichbare Ergebnisse wie mit einem kommerziellen System (iQ5-Thermocycler, Bio-Rad) erreicht werden. Eine detaillierte technische Beschreibung des VideoScan-Systems und weiterer Plattformen ist Rödiger *et al.*, 2012b und Rödiger *et al.*, 2008a zu entnehmen.

## 6.2. Statistische Messdatenanalyse

Während der Dissertation wurden **RKWord**-Plugins für Plots (z. B. *Box plot*, *ECDF plot*, *Density plot*), Statistikverfahren (z. B. Momentanalysen, Ausreißertests, Wilcoxon-Test) erstellt und erweitert, die nun standardmäßig in **RKWord** (Rödiger *et al.*, 2012a) enthalten sind. Für die Analyse der Messdaten des VideoScan-Systems, iQ5-Thermocyclers (Rödiger *et al.*, 2012b) und dem BD FACSCanto™II Durchflusszytometer (Rödiger *et al.*, 2011a), war die Entwicklung einer Statistiksoftware zur Verarbeitung und Darstellung der Kinetikmessreihen (z. B. Amplifikationskurven) und statischen Messreihen notwendig. Für die qPCR-Daten in Rödiger *et al.*, 2012b wurde das **RKWord**-qPCR-Plugin entwickelt. Es stellt sinnvolle Startparameter bereit und erzeugt automatisch einen Ergebnisreport. Vom *qpcR* R-Paket wurden Funktionen zur Amplifikationseffizienzabschätzung und  $C_T$ -Wertbestimmung integriert und um selbstentwickelte **R**-Funktionen zur Glättung (z. B. `smoother.spline()`), Photobleachingkorrektur und automatischen Bestimmung des Hintergrundbereiches (`bg.max()`) ergänzt. Ein weiterer Aspekt war das Schmelzverhalten von Oligonukleotidhybriden. Der mathematische Algorithmus ist in Rödiger *et al.*, submitted detailliert beschrieben und weitere molekularbiologische Methoden wurden in Rödiger *et al.*, 2012b dargestellt. Schmelzkurvenanalysen wurden routinemäßig mit dem **RKWord**-Melt-Plugin durchgeführt, das Funktionen und Algorithmen des *MBmca* R-Paketes von Rödiger *et al.*, submitted nutzt. Temperaturbereich, Hintergrundkorrektur und Glättung können definiert werden (analog **RKWord**-qPCR-Plugin). Diese statistische Datenauswertung erhöht die Robustheit des VideoScan-Systems, denn auch „verrauschte“ Datensätze sind auswertbar. In Rödiger *et al.*, submitted wurde erstmalig vorgeschlagen das Maximum und das Minimum der zweiten Ableitung als weitere Informationen zu nutzen, um den Beginn und das Ende des Schmelzprozesses an Mikropartikeloberflächen näher zu charakterisieren. In Rödiger *et al.*, 2012b wurde die Bestimmung der Hybridisierungstemperatur, -zeit und -effizienz für Fängersonden beschrieben, so dass es möglich war optimale Reaktionsbedingungen einzustellen. Die Analyse wurde mit dem **RKWord**-Hybridization-Plugin durchgeführt, dass für Messreihen mit einem asymptotischen Verlauf geeignet ist. Das Plugin greift in der selbstentwickelten **R**-Funktion `asym.reg()` und auf Funktionen vom *drc* R-Paket zu und ermittelt automatisch die optimale Anpassungsfunktion anhand eines Informationskriteriums.

## 6.3. Mikropartikelcharakterisierung und Oberflächenfunktionalisierung

Mikropartikelassays basieren auf der Kopplung von gut zugänglichen Fängermolekülen (z. B. Streptavidin, DNA-Fängersonden) an funktionelle Gruppen (z. B. Amino-, Carboxyl- und

Thiolmodifikation). Die Fängermoleküle fungieren als Bindungsstelle für Analyte. Carboxylierte Mikropartikel wurden favorisiert, da diese hohe Kopplungsausbeuten ermöglichten, eine geringe Aggregationsneigung hatten und eine hohe Lagerungsstabilität aufwiesen (Rödiger *et al.*, 2008a; Rödiger *et al.*, 2011a; Rödiger *et al.*, 2012b). Die Fängermolekülmenge ist abhängig von der Dichte der funktionellen Gruppe (mol/Fläche). Deren präzise Charakterisierung ist daher für die Qualität von Mikropartikelassays von hoher Bedeutung ist. Für Carboxylgruppen existieren Methoden wie der Toluidin Blau O (TBO)-Farbstoffadsorptionsassay, die aber aufwendig sind und nur einen Gesamtwert über alle Mikropartikel liefern. Der in Rödiger *et al.*, 2011a etablierte SYTO-62-Assay ist ein Fluoreszenzfarbstoffadsorptionsassay zur exakten Beschreibung der Mikropartikelcarboxylierung. Folgende Aussagen können damit getroffen werden: (I) Grad der Carboxylierung, (II) Homogenität der Mikropartikelcarboxylierung, (III) eine Vorhersage für den Kopplungserfolg von Biomolekülen wie DNA oder Proteine und (IV) die Analyse einzelner Mikropartikel. Im Gegensatz zu anderen Methoden werden nur geringe Mikropartikelmengen benötigt, so dass Probenmaterial eingespart wird. Es bestand eine starke lineare Korrelation nach Pearson ( $r = 0,93$ ,  $p < 0,05$ ) zum TBO-Farbstoffadsorptionsassay. Die Messgeräteunabhängigkeit des SYTO-62-Assays konnte im Vergleich des VideoScan-Systems mit einem Durchflusszytometer ( $r = 0,974$ ,  $p < 0,05$ ) nachgewiesen werden. Mit dem SYTO-62-Assays konnten optimal carboxylierte Mikropartikelpopulation identifiziert werden, so dass nur wenige Mikropartikel in den Assays nötig waren (siehe Kapitel 6.4).

#### **6.4. Kopplungsmethoden von Fängersonden**

Die Fängersonden mussten irreversibel und thermostabil an der Mikropartikeloberfläche immobilisiert sein und hohe Hybridisierungseffizienzen gewährleisten. Es wurden die kovalente Kopplung von aminomodifizierten Fängersonden an carboxylierte Mikropartikel sowie die Kopplung von biotinylierten Fängersonden an streptavidinbeschichteten Mikropartikeln in MeIm- und MES- Puffersystemen mit dem Crosslinker EDC evaluiert (Rödiger *et al.*, 2008a, Rödiger *et al.*, 2011a, Rödiger *et al.*, 2012b). Kovalente Kopplungen in MeIm-Puffer, resultierten in höheren Signalen und Hybridisierungseffizienzen als Kopplungen im MES-Puffer und wurden daher für die direkte Hybridisierung verwendet (Rödiger *et al.*, 2012b). Oligonukleotide, die über Biotin-Streptavidinbindung an Mikropartikel gekoppelt wurden, hatten im Vergleich zu den kovalenten Kopplungsmethoden niedrigere Signale (Rödiger *et al.*, 2011a; Rödiger *et al.*, 2012b), jedoch die höchsten Hybridisierungseffizienzen. In Rödiger *et al.*, 2011a Abb. 2 & 4 konnte der relevante Mikropartikelcarboxylierungsgrad zwischen  $0,25 - 1,5 \text{ nmol}_{\text{COOH}} \text{ mm}^{-2}$  eingegrenzt und in Rödiger *et al.*, 2012b Kapitel 3.4 bestätigt werden. Der refMFI-Wert hat eine

sehr gute lineare Korrelation zu Durchflusszytometermesswerten und ist somit plattformunabhängig. Für einen Dynamikbereich von sieben Dekaden konnte dies für die Kopplung von Streptavidin ( $r = 0,948$ ,  $p < 0,05$ ) und aminomodifizierte Oligonukleotide ( $r = 0,921$ ,  $p < 0,05$ ) gezeigt werden (Rödiger *et al.*, 2011a Abb. 5B). In Rödiger *et al.*, 2012b wurde die optimale Mikropartikelanzahl (*Number of microbeads per well*) auf 20 – 50 Mikropartikel geschätzt und systematisch in allen Assays verwendet.

## 6.5. Eigenschaften von Sondensystemen

Die DNA-Sonden sind ein zentrales Element der Assays. Sie wurden nach gebräuchlichen Richtlinien entwickelt (Rödiger *et al.*, 2008a; Rödiger *et al.*, 2012). In den Arbeiten wurden verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe (z. B. Cy5, Atto 647N, AF750) und Quencher (z. B. BHQ2, BBQ) zur Markierung der Biomoleküle getestet. Für Echtzeitmessungen war die Kombination Atto 647N und BHQ2 aufgrund der Photobleachingstabilität am besten geeignet. Die genspezifische Hybridisierungsregion (15 – 35 nt) der Fängersonde wurde so gewählt, dass die theoretische Schmelztemperatur 10 – 15 °C über der Annealingtemperatur lag. Die Nachweissonde ist komplementär zur Fängersonde (Abb. 6.1). Der Schmelzpunkt ( $T_M$ ) sollte höher als 65 °C sein, damit in PCRs die Annealing- und Elongationsphase zur Hybridisierung genutzt werden kann. Vor der genspezifischen Hybridisierungsregion lag eine Poly(dT)<sub>10-20</sub>-Region, die als *Spacer* und Targetsequenz fungierte. Zwecks Beladungskontrolle wurde jeweils eine Atto 647N-markierte Fängersonde mit AF750-markierten Poly(dA)<sub>n</sub>-Nachweissonde in der Poly(dT)<sub>n</sub>-Region hybridisiert und die refMFI beider Fluoreszenzkanäle korreliert (Rödiger *et al.*, 2012b Kapitel 3.2 & Abb. 8). Dabei zeigte sich eine starke lineare Korrelation (*aCS-cap*:  $R^2 \sim 0,99$ ,  $r \sim 0,94$ ,  $p < 0,05$ ; *MLC-2v-cap*:  $R^2 \sim 0,99$ ,  $r < 0,96$ ,  $p < 0,05$ ), unabhängig vom Oligonukleotid und der Mikropartikelpopulation ( $n = 18$ ). Somit konnte die Menge nichtfluoreszenzmarkierter Fängersonden quantifiziert werden, ein zentraler Schritt in der Funktionskontrolle von Mikropartikeln. In Rödiger *et al.*, 2008a wurden *Spacer* (Hexaethylenglykol, C6) zwischen Kopplungsgruppe und Fängersondenregion diskutiert. Für Echtzeitmessungen in Rödiger *et al.*, 2012b wurde der Hexaethylenglykol-Spacer favorisiert. Es wurden primär zwei Modi für die Fängersonden realisiert. Für FRET-basierte Assays ist die Fängersonde 3' mit dem Fluorophor Atto 647N markiert und im Standardassay ist sie unmarkiert. In FRET-basierten Assays wurde sie 5' mit einem Quencher (BHQ2 oder BBQ650) markiert und im Standardassay 5' mit dem Fluorophor Atto 647N. In FRET-basierten Assays sind die Fluoreszenzfarbstoffe am Mikropartikel lokalisiert, so dass die Hintergrundfluoreszenz praktisch Null ist. Die Kombination beider Modi wurde in Rödiger *et al.*, 2012b Abb. 8 während der

Multiplexhybridisierung an 18 Mikropartikelpopulationen für *MLC-2v-cap* bzw. *aCS-cap* (FRET-basierter Assay) und der Poly(dT)<sub>20</sub>-Region (Standardassay) gezeigt. Pro Fängersonde können zwei spezifische Schmelzpunkte bestimmt werden (Rödiger *et al.*, 2012b Abb. 20; Rödiger *et al.*, submitted). Neben dem FRET-basiertem und dem Standardassay wurde noch der *microbead hybridization probe assay* für quantitative Messungen und Schmelzkurvenanalysen entwickelt (siehe Kapitel 6.7).

## 6.6. Echtzeitmessung der Fängersondenhybridisierung

Die Hybridisierungsreaktion wird von der Temperatur und der Sondenkonzentration in Lösung gesteuert. Diese Parameter ändern sich bei einer PCR, so dass die Reproduzierbarkeit der Signaländerungen gewährleistet werden muss. Die Bestimmung der optimalen Hybridisierungstemperatur wurde in Rödiger *et al.*, 2012b Kapitel 6.4 vorgestellt. Die Hybridisierungstemperatur lag zwischen 55 °C und 65 °C und entsprach somit den PCR-Bedingungen, die in der Annealingphase vorherrschten (Rödiger *et al.*, 2012b Kapitel 6.1).

## 6.7. Schmelzkurvenanalyse von DNA-Sonden

Idealerweise sind der Schmelzpunkt eines Oligonukleotidduplexes an der Oberfläche und in der Lösung identisch. Die Schmelzkurvenanalyse ergab identische Temperaturen an Oberflächen verschiedener Mikropartikelpopulationen, mit Biotin-Streptavidin-gekoppelten Fängersonden, die vergleichbar zu den in Lösung waren. Die Schmelzkurvenpeaks zeichneten sich durch eine schmale Kurvenbreite und eine große Signalstärke aus (Rödiger *et al.*, submitted). Bei der kovalenten Kopplung wurde festgestellt, dass die Kopplungsmethode einen Einfluss auf das Schmelzverhalten hat (Rödiger *et al.*, 2012b Kapitel 6.3). Für die Analyse der kovalent gekoppelten Fängersonde (EDC/MES- beziehungsweise MeIm/EDC-Methode) wurde die Schmelztemperatur von Biotin-Streptavidin-gekoppelten Fängersonden und der Sondenduplex in Lösung als Vergleichswert herangezogen. Die kovalenten Immobilisierungen führten zu einer veränderten Schmelztemperatur und Verbreiterung der Schmelzkurve. Dass die kovalente Fängersondenkopplung eine Verringerung der Schmelztemperatur verursachte, hatte Konsequenzen für die Hybridisierungsassays. Zwar kann diese Methode für die direkte Hybridisierung verwendet werden (z. B. Rödiger *et al.*, 2012b Kapitel 6.4), jedoch ist mit breiteren Schmelzkurven zu rechnen und somit die Auflösung zur Identifikation von DNA-Fragmenten verringert. Außerdem wäre aufgrund der niedrigen Hybridisierungstemperaturen eine zusätzliche Hybridisierungsreaktion für die Detektion am Mikropartikel in das PCR-Protokoll einzuführen gewesen. Als optimale Hybridisierungstemperatur von *MLC-2v-cap* wurde 50 °C (Rödiger *et al.*, 2012b Abb. 21 b) und

eine Schmelztemperatur von 72,5 °C (Rödiger *et al.*, 2012b Abb. 20) bestimmt. Mit der Biotin-Streptavidin-Kopplung wurde eine deutlich höhere Hybridisierungstemperatur von 65 °C (nicht dargestellt) und eine Schmelztemperatur von 76 °C (Rödiger *et al.*, submitted) bestimmt. Aufgrund der höheren Temperaturen konnte eine höhere Stringenz mit kürzeren Reaktionszeiten erreicht werden. Die Hybridisierungseffizienz, die Hybridisierungsgeschwindigkeit und die Sondenduplexschmelztemperatur waren entscheidend für die Assays. Die Biotin-Streptavidin-Kopplung war für Real-Time-Assays am besten geeignet, sodass diese Methode vorrangig bei Kinetikmessungen verwendet wurde. Da die Schmelztemperatur von Biotin-Streptavidin-gekoppelten Fängersonden nicht beeinträchtigt war, konnte sie für die Detektion von einem Basenaustausch genutzt werden. In Rödiger *et al.*, submitted wurde gezeigt, dass ein Basenaustausch von C → T im 60 bp *VIM 1*-Fragment (Rödiger *et al.*, 2012b Tabelle 7) an der Position 41 detektiert werden kann. Dafür wurde der *microbead hybridization probe assay* aus Rödiger *et al.*, 2012b (Abb. 16 und Abb. 17) modifiziert, indem der Assays aus dem 1 µl-Bereich der Advalytix®-Slides (Rödiger *et al.*, 2012b Kapitel 5.2) auf eine Kavität (20 µl) übertragen wurde. Entsprechend der Theorie (Rödiger *et al.*, 2008a Kapitel 3.5) war die Schmelztemperatur des „mutierten“ *VIM 1*-Fragmentes um circa 1,62 °C verringert (Rödiger *et al.*, submitted) und der Basenaustausch konnte somit eindeutig nachgewiesen werden.

## 6.8. Wahl von Amplifikations- und Nachweisverfahren

In Rödiger *et al.*, 2008a und Rödiger *et al.*, 2011b wurden Verfahren zum Nachweis und zur Amplifikation von DNA diskutiert. Aus diesen Arbeiten wurden folgende Aspekte abgeleitet. Die enzymatische Amplifikation (z. B. PCR, HDA) ist der Signalverstärkung (z. B. 3DNA-Dendrimere, Rödiger *et al.*, 2008a Kapitel 5.3) vorzuziehen, da keine zusätzlichen Hybridisierungs- und Waschschrte nötig sind, unspezifische Reaktionen reduziert werden und somit homogene Assays leichter realisierbar sind. Bei enzymatischer Amplifikation kann man auf isotherme (konstante Temperatur) oder polyzyklische (dynamische Temperaturänderungen) Verfahren zurückgreifen. Isothermale Verfahren haben gerätetechnisch einen geringen Anspruch und sind deshalb bei *point-of-care* Entwicklungen in den Fokus gerückt (Rödiger *et al.*, 2011b). Mit der VideoScan-HCU können Temperaturregime beliebig programmiert werden (Rödiger *et al.*, 2012b Kapitel 6.1), so dass kein Verfahren bevorzugt werden musste. Isothermale Verfahren wie die HDA (*Helicase Dependent Amplification*, weitere siehe Rödiger *et al.*, 2011b) laufen kontinuierlich ab, sobald alle Reagenzien zusammengeführt sind. Eine Startpunktdefinition, temperaturabhängige Steuerung und hohe Stringenz ist nur begrenzt möglich. Die komplexen Reaktionsmechanismen, Empfindlichkeit der Chemikalien sowie weitere Beschränkungen, die

sich an das Amplifikat richten (z. B. GC-Gehalt, Produktgröße, Primerwahl, *amplification bias*) können ein hohes Fehlerpotential bedeuten. Daher haben sich nur wenige isothermale Verfahren in der Multiparameterdiagnostik durchgesetzt. Der Fokus wurde deshalb auf polyzyklische Verfahren, wie PCR und LCR (*Ligase Chain Reaction*), gerichtet. Bei diesen können durch Temperaturoptimierung Sekundärstrukturen minimiert, die Stringenz erhöht und nicht-spezifische Hybridisierungen reduziert werden. Die LCR ist für Punktmutationsanalysen prädestiniert und setzt initial meist eine PCR voraus, so dass diese Methode nicht geeignet war. Die PCR hat optimale Voraussetzungen bezüglich der Reagenzienverfügbarkeit, Robustheit und Entwicklungszeiten. Es gibt praktisch keine Beschränkungen der Amplifikation. Es wurden hochoptimierte mPCRs, mit bis zu 45 PCR-Produkten (45-plex), beschrieben wobei in der Routine 3-10-plex-PCRs gängig sind (Rödiger *et al.*, 2008a Kapitel 5; Rödiger *et al.*, 2011b). Als praktische Konsequenz wurden für Rödiger *et al.*, 2012b Kapitel 6.1 eine Duplex-*TaqMan*-qPCR und zwei mPCRs (5-plex) etabliert, die zum Nachweis von kardialen Markern und Rezeptoren geeignet sind. Als Bezugspunkt wird dabei mindestens ein internes Referenzgen (*GAPDH*, *HPRT1*) für die mPCRs eingeführt (Rödiger *et al.*, 2012b), da diese unter verschiedenen Bedingungen eine konstante Genexpression zeigen sollten.

## 6.9. Real-Time-PCR mit Mikropartikeln

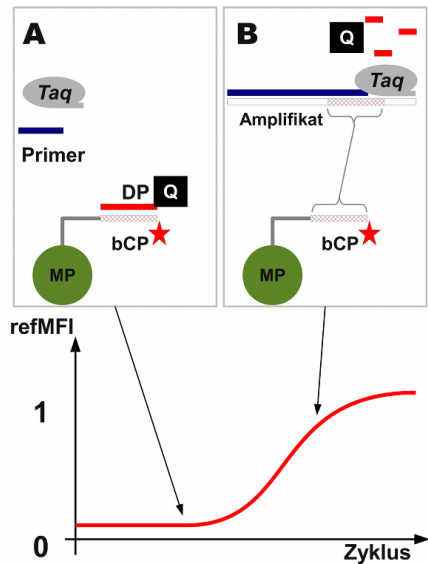
Wie in Rödiger *et al.*, 2011b im Absatz „Kombinierte Technologien“ beschrieben, kann die mPCR in andere Technologien integriert werden, um den Probandendurchsatz zu steigern. Die direkte Hybridisierung (Rödiger *et al.*, 2008a Kapitel 3.5 Abb. 3) ist eine der klassischen heterogenen Nachweisreaktionen von PCR-Produkten. Sie wurde an das VideoScan-System adaptiert und zum Nachweis von bakteriellen Genen ausgebaut (Rödiger *et al.*, 2008b; Frömmel *et al.*, 2011; Rödiger *et al.*, 2012b). Als Alternative zur direkten Hybridisierung, wurde in Rödiger *et al.*, 2012b der homogene quantitative *microbead hybridization probe assay* erstmalig vorgestellt. Aus diesen Arbeiten und anhand von Literaturdaten (Rödiger *et al.*, 2008a) wurde jedoch ersichtlich, dass die Konzentration und sterische Effekte der PCR-Produkte, sowie die Position der Fängersondenhybridisierungsregion zu niedrigen Hybridisierungsraten und -effizienzen führen, was nachteilig für die Echtzeitmessung am Mikropartikel ist. Daher wurde vorgeschlagen das mikropartikelbasierte VideoScan-System für mqPCRs nutzbar zu machen, indem die Amplifikationsreaktion in der Lösung von der Hybridisierungsreaktion am Mikropartikel entkoppelt wird (Lehmann *et al.*, 2008). Die Evaluation verschiedener SONDENSYSTEME ergab, dass Hydrolysesonden (*TaqMan*-Hydrolysesonde) einen Ansatz als Reportermolekül bieten. In der Pionierarbeit von P.M. Holland und Kollegen (1991) wurden



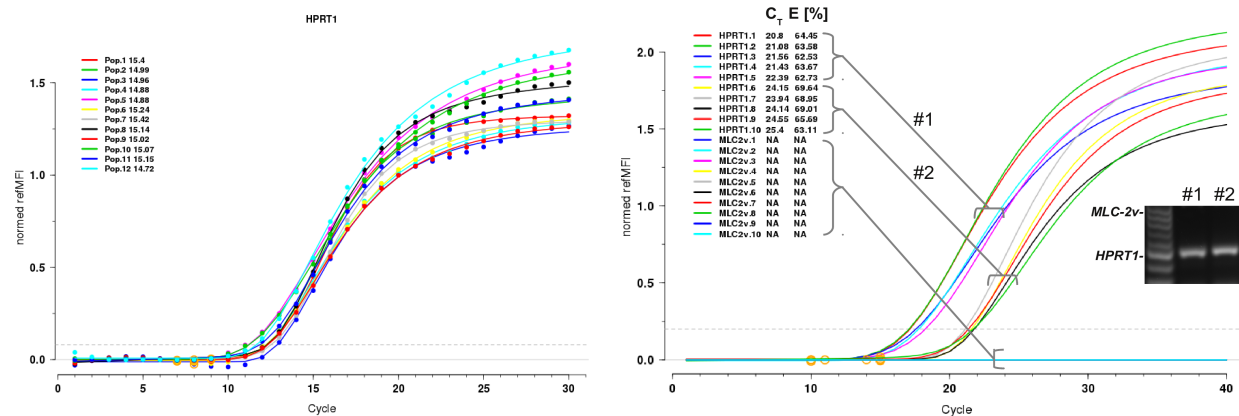
Hydrolysesonden erstmalig beschrieben (Bustin, 2004). Zur Amplifikation wird dabei ein sequenzspezifisches Primerpaar und eine sequenzspezifische Hydrolysesonde eingesetzt. Hydrolysesonden sind kurze (15 – 35 mer) einzelsträngige Fluorophor-Quencher-markierte Oligonukleotide. Während der Annealing/Elongationsphase werden diese durch die 5' → 3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase hydrolysiert, so dass die räumliche Nähe vom Reporterfluorophor und Quencher aufgelöst wird. Die Änderung des Fluoreszenzsignals ist proportional zur Produktmenge. Die zuvor etablierten Nachweissonden entsprachen strukturell den Hydrolysesonden. Wie bereits dargelegt, lösen Mikropartikel das Kodierungsproblem von konventionellen Multiplex-qPCRs und Hydrolysesonden-PCRs sind im VideoScan-System möglich. Aufgrund aller zuvor erarbeiteten Voraussetzungen konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig ein mikropartikelbasiertes mqPCR-System in Form des Funktionsschemas Abb. 6.1 theoretisch abgeleitet und real umgesetzt werden. Die Amplifikation wird nicht durch die Sondenhydrolyse in Lösung, sondern anhand der Hybridisierungsreaktion am Mikropartikel verfolgt. Die Annealing- und Elongationsphase wird dabei für die Hybridisierung der Nachweissonden mit Mikropartikel-gekoppelten Fängersonden genutzt. In der Literatur gibt es bisher keine Referenz für ein derartiges System.

**Anwendung des Mikropartikelhydrolysesondenassays (MHA):** Folgend wird die Funktionalität des MHA demonstriert. Die Publikation ist noch in Vorbereitung. Mit der VideoScan-HCU war im Entwicklungsstand von Rödiger *et al.*, 2012b nur eine beheizbare Kavität verfügbar. Da sich keine großen Probendurchsätze realisieren ließen, wurden die Experimente als „Proof-of Concept“ für MHA konzipiert. Die PCR-Bedingungen entsprachen Rödiger *et al.*, 2012b Kapitel 6.1, wobei fängersondenbeladene Mikropartikel (~ 30 pro Population) (Rödiger *et al.*, 2012b Tabelle 8) und Nachweissonden (10 – 15 nM) zum Nachweis von *HPRT1*, *MLC-2v* beigefügt wurden. Anhand von zwölf Mikropartikelpopulationen (12-plex), die mit der *HPRT1*-Fängersonde beladen wurden, konnte gezeigt werden, dass alle Mikropartikelpopulationen vergleichbare  $C_T$ -Werte und Amplifikationseffizienzen haben (Abb. 6.2 A). Für mqPCR in Lösung ist derzeit keine Realisierung für einen derart hohen Multiplexgrad bekannt. Das VideoScan-System ist damit konventionellen qPCR-Thermocyclern deutlich überlegen.

Der Einfluss der Templatkonzentration wurde untersucht, indem Proben mit *HPRT1* dekadisch (1:100, 1:1000) verdünnt wurden (Abb. 6.2 B). Der MHA wurde mit jeweils sechs Mikropartikelpopulation für *HPRT1* und *MLC-2v* getestet. Als Kontrolle wurde der MHA ohne Primer für *MLC-2v* durchgeführt, so dass nur *HPRT1* amplifiziert wurde. Da kein Signalanstieg



**Abb. 6.1: Prinzip des Mikropartikelhydrolysesondenassays (MHA).** Im Gegensatz zur Hydrolysesonden-PCR wird die Amplifikation nicht anhand der Signaländerung in Lösung gemessen, sondern durch die Signaländerung infolge der Hybridisierung der Hydrolysesonde (DP, *detection probe*) an der Fängersonde (bCP, *bead bound capture probe*) des Mikropartikels (MP). A) Für die Markierung der DP wird im Gegensatz zur klassischen *TaqMan*-Hydrolysesonde nur ein Label benötigt. An der Oberfläche von Mikropartikeln (MP) einer Population sind spezifische bCPs für ein spezifisches Gen immobilisiert (Rödiger *et al.*, 2012b Fig. 7; Rödiger *et al.*, submitted Fig. 2). B) Sobald die *Taq*-Polymerase (*Taq*) ein PCR-Produkt in Lösung amplifiziert, wird die quenchermarkierte DP durch die Exonukleaseaktivität hydrolysiert. In den folgenden Zyklen ist weniger DP verfügbar, so dass die Fluoreszenz (refMFI) am Mikropartikel steigt. Die Signaländerung ist also abhängig von der Amplifikation des PCR-Produktes, dem Abbau der DP in Lösung, und Hybridisierung der DP an der bCP auf der Mikropartikeloberfläche. Übertragen auf eine qPCR in Lösung entspräche dies einer Singleplex-qPCR für einen Fluoreszenzkanal.



A)

**Abb. 6.2: Anwendung des Mikropartikelhydrolysesondenassays.** A) Simultane Amplifikation von *HPRT1* und Detektion an zwölf Mikropartikelpopulationen. Die Analyse erfolgte mit dem **RKward**-qPCR-Plugin. Punkte, geglättete Messdaten; durchgängige Linie, angepasste (5- oder 6-Parameter) Funktion. Die Hydrolysesonde von *HPRT1* wurde bei einer Konzentration von 12,5 nM eingesetzt (Amplifikationsbedingungen entsprechend Rödiger *et al.*, 2012b). Der mittlere  $C_T$ -Wert von *HPRT1* betrug  $15,07 \pm 0,2$  mit einer Amplifikationseffizienz (AE) von  $77,33 \pm 5,0\%$  und nahezu identisch zwischen allen Mikropartikelpopulationen. B) Duplex-PCR von *HPRT1* und *MLC-2v*. Als Negativkontrolle war nur die *MLC-2v*-Hydrolysesonde ohne die Primer enthalten. Es wurden zwei Templatkonzentrationen (#1, 1:100; #2, 1:1000) von *HPRT1* eingesetzt und nacheinander mit der VideoScan-HCU amplifiziert. In beiden Verdünnungsstufen wurde *HPRT1* amplifiziert (Gelbild), was auch am Mikropartikel nachverfolgt werden konnte. Die Hydrolysesonde von *MLC-2v* wurde nicht hydrolysiert, so dass es zu keiner Signaländerung kam. In der 1:100 verdünnten Probe wurde ein  $C_T$ -Wert von  $21,45 \pm 0,60$  mit einer AE von  $63,39 \pm 0,78\%$  bestimmt, bei 1:1000 verschob sich der  $C_T$ -Wert auf  $24,44 \pm 0,58$  mit einer AE von  $67,28 \pm 2,80\%$ .

vorlag, konnte die Spezifität des Nachweissondenabbaus untermauert werden. Die  $C_T$ -Wertsverschiebung von *HPRT1* lag im Erwartungsbereich von circa 3,3 Zyklen, womit die Funktionsfähigkeit des MHA für quantitative Multiplexassays bestätigt wurde.

## 7. Diskussion und Schlussfolgerung

Die vorliegende kumulative Dissertation stellt Technologien vor, mit denen Fragen der modernen Labordiagnostik beantwortet werden können. Die zentrale technische Grundlage ist das VideoScan-System, welches eine vielseitige Plattform für die Analyse von Biomolekülen ist. Um es zur Genexpressionsanalyse bei Kardiomyozyten einsetzen zu können, wurden technologische und methodische Verfahren erarbeitet, die zur Entwicklung von DNA-Nachweisassays nutzbar sind. Wichtige Punkte waren (I) die Charakterisierung des VideoScan-Systems für Kinetikmessungen, (II) die Charakterisierung der Mikropartikel, (III) die Wahl eines geeigneten Amplifikationsverfahrens, (IV) die Entwicklung eines geeigneten Nachweissystems, (V) die Etablierung von Single- und mPCRs für die Amplifikation von herzspezifischen Markern, und (VI) die Programmierung einer leistungsstarken und nutzerfreundlichen Auswertungssoftware.

Es wurden homogene mikropartikelbasierte Assays entwickelt, die auch im Real-Time-Format funktionieren, so dass ein neues Werkzeug für die Genexpressionsanalyse zur Verfügung steht. Neben den technologischen Aspekten wurden Primer für die Multiplex-PCR von Rezeptoren, kardialen Markern und Referenzgenen für die Genexpressionsanalyse von humanen Kardiomyozyten zusammengestellt. Deren eingehende Evaluierung mit einem größeren Umfang an Probenmaterial und die für die routinemäßige Anwendung für Genexpressionsanalysen steht noch aus. Ein Aspekt für Real-Time-PCR-Anwendungen ist zunächst noch die Erweiterung der HCU-Modulanzahl um mehr Proben abarbeiten zu können. Nach Abschluss der Arbeit war bereits eine 8-Kavitäten-VideoScan-HCU (8HCU) verfügbar, die eine vergleichbare Performance wie die einfache HCU zeigte. Zudem wurde in Rödiger *et al.*, 2012b Kapitel 5.2 Messungen im 1 µl-Volumen auf einer Fläche von circa 1 mm<sup>2</sup> (Advalytix®-Slides) realisiert. Durch eine Segmentierung der existierenden Kavitäten könnte eine höhere Probenanzahl prozessiert werden. Die Fläche der Kavitäten beträgt circa 7 mm<sup>2</sup>. Eine Halbierung der Kavität würde folglich eine Verdoppelung der Probenanzahl zur Folge haben, ohne Änderungen an der Hardware vornehmen zu müssen.

In verschiedenen Arbeitsteilen wurden die methodischen Grundlagen für die Charakterisierung und Entwicklung neuartiger Assays geschaffen. Mit dem SYTO-62-Assay wurde in Rödiger *et al.*, 2011a ein neuartiger Fluoreszenzfarbstoffadsorptionsassay beschrieben, der für die Qualitätskontrolle von Mikropartikeln und zur Quantifizierung von Carboxylgruppen bei einem hohen Probendurchsatz geeignet ist. Der SYTO-62-Assay ein relevanter Beitrag zur Mikropartikelanalytik. Mit ihm kann die Oberflächenmodifikation der Mikropartikel exakt

charakterisiert werden, damit eine optimale Kopplung von Biomolekülen, wie Fängersonden, möglich ist. Die Eingrenzung des Carboxylierungsgrades von Mikropartikeln war wichtig, da die Hybridisierungsreaktion von der Fängersondendichte (Fängersonden/Fläche) beeinflusst werden kann. Wenn die Mikropartikeloberfläche überkonjugiert ist, folgt daraus eine Abnahme der Hybridisierungseffizienz (Gao *et al.*, 2006; Peterson *et al.*, 2001; Rödiger *et al.*, 2012b; Shchepinov *et al.*, 1997).

Es konnte gezeigt werden, dass mittels der VideoScan-HCU und Plugin-Eigenentwicklungen für die Statistiksoftware **RKWord** alle Daten (z. B. qPCR-Daten) des VideoScan-Systems prozessierbar sind und für eine einfache Interpretation aufgearbeitet werden können. Im Rahmen der Dissertation konnte das VideoScan-System derart ausgebaut werden, dass es nicht mehr ausschließlich für Endpunktbestimmungen (Vergl. Rödiger *et al.*, 2008b; Rödiger *et al.*, 2011a; Rödiger *et al.*, 2012b), sondern auch für multiplexe Kinetikmessungen (z. B. Schmelzkurvenanalysen, qPCRs) nutzbar ist. Der Aufbau der mikropartikelgekoppelten Sonden und die Charakterisierung mittels Hybridisierungs- und Schmelzkurvenanalysen waren primär für die Realisierung der neuen mikropartikelbasierten Real-Time-PCR entscheidend. Die Multiplex-Schmelzkurvenanalyse steht aber auch unabhängig als Technologie zur Verfügung. Eine Unterscheidung von Einzelnukleotidmutationen oder zweier distinkter Schmelzpunkte pro Mikropartikelpopulation konnte gezeigt werden. Daraus ergibt sich die Möglichkeit verschiedene Parameter an einer Mikropartikelpopulation zu bestimmen, was eine Kostenreduktion und höheren Multiplexgrad zur Folge hat. Die Analyse von Schmelzpunkten stellt einen interessanten Ansatz für die Detektion von SNPs dar. Diese wurden beispielsweise für die idiopathische DCM, anhand von Variationen des *ADRB*-Rezeptors und  *$\beta$ -myosin heavy chain* beschrieben (Rödiger *et al.*, 2008a; Rödiger *et al.*, submitted).

Die Arbeit entwickelt für mehrere fundamentale Probleme von Multiplex-qPCR und mikropartikelbasierte Assays entsprechende Lösungsansätze. Standardmäßig erfolgt der Nachweis von PCR-Produkten mittels direkter Hybridisierung. Die Hybridisierungseffizienz und -kinetik von PCR-Produkten ist vorrangig abhängig von deren Konzentration, Länge, Sequenz, Hybridisierungsregion und der Temperatur. PCR-Produkten bis circa 300 bp werden akzeptable Hybridisierungseigenschaften zugeschrieben. Unterhalb der Sättigungskonzentration des Amplifikates ist die Hybridisierung konzentrationsabhängig gesteuert und hat eine hohe Effizienz. Mit Erreichen der Sättigungskonzentration setzt jedoch eine Abnahme der Hybridisierungseffizienz, unter anderem durch kompetitive Prozesse, ein. In der Literatur ist beschrieben, dass Fängersonden mit Hybridisierungsregionen nahe 100 bp vom 5'-Ende nur

schwache oder keine Signale erzeugten, im Gegensatz zu jenen, die im Zentrum oder nahe dem 3'-Ende positioniert waren. Die Argumentation hierfür war, dass das Potential zur Sekundärstrukturausbildung nahe der Duplexformationsstelle minimiert wurde (Rödiger *et al.*, 2008b; Rödiger *et al.*, 2012b; Shchepinov *et al.*, 1997). Folglich ist die direkte Hybridisierung für eine Real-Time-Anwendung nur bedingt geeignet. Zwar ist die Hybridisierungsreaktionen in Lösung deutlich schneller (circa > 20-fach) als an Oberflächen, da sie nicht durch Massentransfer begrenzt ist (Gao *et al.*, 2006; Henry *et al.*, 1999; Sekar *et al.*, 2005; Rödiger *et al.*, 2012b), dennoch war es durch Optimierung der Reaktionen möglich, die Annealing- und Elongationsphase für die Hybridisierungsphase von Hydrolyse- und Fängersonde für Real-Time-Messungen nutzbar zu machen. Die Probleme der direkten Hybridisierung wurden in der vorliegenden Arbeit somit elegant umgangen, da kurze Nachweissonden als „Reporter“ fungierten. Die Nachweissonden sind für schnelle Hybridisierungsreaktionen auf der Mikropartikeloberfläche besser als lange Fragmente geeignet, da sterische Effekte und die Hybridisierungsregion im PCR-Produkt eine untergeordnete Rolle spielen (Rödiger *et al.*, 2012b; Peterson *et al.*, 2001; Shchepinov *et al.*, 1997). Zudem sind die Nachweissonden optimal für die *Taq*-Polymerase vermittelte Hydrolyse geeignet. Neben dem MHA sind noch Technologien, wie Festphasen- oder Emulsions-PCRs (Rödiger *et al.*, 2008a) interessant, die auf das VideoScan-System adaptiert werden könnten. Dabei erfolgt die Amplifikation und Detektion direkt an der Mikropartikeloberfläche. Die Reaktion wird somit von der Lösung entkoppelt und sich gegenseitig beeinflussende Prozesse reduziert. Solche Lösungsansätze sind prinzipiell mit dem VideoScan-System umsetzbar.

Durch die Verwendung von Mikropartikeln wurde eine deutliche Erweiterung des Multiplexgrades (12-plex) gegenüber existierenden mqPCR-Systemen in Lösung (theoretisch 7-plex) erreicht. Der Zeitbedarf für die Untersuchung einer Probe im MHA wird durch die Länge der PCR-Reaktion definiert. Dieser ist ähnlich dem einer konventionellen qPCR (z. B. iQ5-Thermocycler). Zusätzliche Wasch- und Hybridisierungsreaktionen, wie in Luminex®-Systemen, entfallen. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig ein Echtzeitverfahren umgesetzt, das die Prinzipien der Hydrolysesonden-PCR mit einem mikropartikelbasiertem Hybridisierungssassay kombiniert. Es wurde mit Mikropartikeln gearbeitet, da diesen schnellere Hybridisierungskinetiken als planaren Strukturen zugebilligt werden. Jedoch ist die Übertragung des MHA auf planare Strukturen nicht ausgeschlossen. Die Sensitivität des MHA muss in zukünftigen Studien weiter untersucht werden.

## 8. Literaturverzeichnis

- Bustin S **A-Z of quantitative PCR**. *International University Line* (2004). ISBN: 978-0963681782
- Frömmel U, Berger I, Rödiger S, Schierack P & Schröder C **Multiplex-PCR-Mikropartikel-Assay zum Nachweis bakterieller Gene**. *Pabst Science Publ* (2011). ISBN: 978-3-89967-703-4 [www.pabst-publishers.de](http://www.pabst-publishers.de)
- Gao Y, Wolf LK & Georgiadis RM **Secondary structure effects on DNA hybridization kinetics: a solution versus surface comparison**. *Nucleic Acids Res* (2006) **34**: pp. 3370-3377.
- Godin J, Chen C, Cho SH, Qiao W, Tsai F & Lo Y **Microfluidics and photonics for Bio-System-on-a-Chip: a review of advancements in technology towards a microfluidic flow cytometry chip**. *J Biophotonics* (2008) **1**: pp. 355-376.
- Jahns R, Boivin V, Hein L, Triebel S, Angermann CE, Ertl G & Lohse MJ **Direct evidence for a beta 1-adrenergic receptor-directed autoimmune attack as a cause of idiopathic dilated cardiomyopathy**. *J Clin Invest* (2004) **113**: pp. 1419-1429.
- Keith M, Geranmayegan A, Sole MJ, Kurian R, Robinson A, Omran AS & Jeejeebhoy KN **Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure**. *J Am Coll Cardiol* (1998) **31**: pp. 1352-1356.
- Maskos U & Southern EM **Parallel analysis of oligodeoxyribonucleotide (oligonucleotide) interactions. I. Analysis of factors influencing oligonucleotide duplex formation**. *Nucleic Acids Res* (1992) **20**: pp. 1675-1678.
- Muthumala A, Drenos F, Elliott PM & Humphries SE **Role of beta adrenergic receptor polymorphisms in heart failure: systematic review and meta-analysis**. *Eur J Heart Fail* (2008) **10**: pp. 3-13.
- Osterziel KJ & Perrot A **Dilated cardiomyopathy: more genes means more phenotypes**. *Eur Heart J* (2005) **26**: pp. 751-754.
- Peterson AW, Heaton RJ & Georgiadis RM **The effect of surface probe density on DNA hybridization**. *Nucleic Acids Res* (2001) **29**: pp. 5163-5168.
- Rödiger S, Schröder C, Lehmann W, *et al.* **A novel microparticle-based technology for an automated multi-parameter screening in molecular diagnostics**. *abstract in: International Journal of Medical Microbiology (IJMM; 298S2, Suppl. 45, MSP16, p. 10)* (2008b) **298**: pp. 1-118.
- Schimke I, Müller J, Priem F, *et al.* **Decreased oxidative stress in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy one year after immunoglobulin adsorption**. *J Am Coll Cardiol* (2001) **38**: pp. 178-183.
- Sekar MMA, Bloch W & St John PM **Comparative study of sequence-dependent hybridization kinetics in solution and on microspheres**. *Nucleic Acids Res* (2005) **33**: pp. 366-375.
- Shchepinov MS, Case-Green SC & Southern EM **Steric factors influencing hybridisation of nucleic acids to oligonucleotide arrays**. *Nucleic Acids Res* (1997) **25**: pp. 1155-1161.
- Taylor MR & Bristow MR **Alterations in myocardial gene expression as a basis for cardiomyopathies and heart failure**. *Novartis Found Symp* (2006) **274**: p. 73-83; discussion 83-9, 152-5, 272-6.

## 9. Ausgewählte Publikationen

Die kumulative Dissertation wurde unter der Betreuung von Prof. Dr. habil. Ingolf Schimke (Charité) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. habil. Christian Schröder (Hochschule Lausitz (FH)) und Dr. habil. Peter Schierack (Hochschule Lausitz (FH)) zwischen 2008 und 2012 durchgeführt. Als Impact Factor wurde der Wert vom Zeitpunkt der Einreichung angegeben.

Rödiger *et al.*, 2012b: **Rödiger S**, Schierack P, Böhm A, Nitschke J, Berger I, Frömmel U, Schmidt C, Ruhland M, Schimke I, Roggenbuck D, Lehmann W & Schröder C **A Highly Versatile Microscope Imaging Technology Platform for the Multiplex Real-Time Detection of Biomolecules and Autoimmune Antibodies**. *Advances in Biochemical Bioengineering/Biotechnology* (2012) Mar 23 ISSN 1616-8542

65 Prozent, Impact Factor: 4,165 (2011)

Rödiger *et al.*, 2012a: **Rödiger S**, Friedrichsmeier T, Kapat P & Michalke M **RKward - A Comprehensive Graphical User Interface and Integrated Development Environment for Statistical Analysis with R**. *Journal of Statistical Software* (2012) **49(9)**: pp. 1-23.

40 Prozent, Impact Factor: 2,647 (2010)

Rödiger *et al.*, 2011a: **Rödiger S**, Ruhland M, Schmidt C, Schröder C, Grossmann K, Böhm A, Nitschke J, Berger I, Schimke I & Schierack P **Fluorescence dye adsorption assay to quantify carboxyl groups on the surface of poly(methyl methacrylate) microbeads**. *Analytical Chemistry* (2011) **83**: pp. 3379-3385.

80 Prozent, Impact Factor: 5,874 (2010)

Rödiger *et al.*, submitted: **Rödiger S**, Böhm A & Schimke I **Surface Melting Curve Analysis with R**. *The R Journal* (submitted)

90 Prozent

Rödiger *et al.*, 2011b: **Rödiger S**, Schmidt C, George S, Frömmel U, Ruhland M, Schimke I, Schierack P & Schröder C **Alternative Nukleinsäureamplifikationsverfahren für die Multiparameteranalytik**. *Pabst Science Publishers* (2011). ISBN: 978-3-89967-703-4 [www.pabst-publishers.de](http://www.pabst-publishers.de)

80 Prozent

Rödiger *et al.*, 2008a: **Rödiger S**, Schierack P & Schröder C **Multiplex-DNA-Mikropartikeltechnologien und deren Anwendungen**. *Pabst Science Publishers* (2008). ISBN: 978-3-89967-461-3 [www.pabst-publishers.de](http://www.pabst-publishers.de)

90 Prozent

Lehmann *et al.*, 2008: Lehmann W, Böhm A, Grossmann K, Hiemann R, Nitschke J & **Rödiger S** **Method for carrying out and evaluating mix & measure assays for the measurement of reaction kinetics, concentrations and affinities of analytes in multiplex format**. (2008) Patent: *Publication number: US 2010/0203572 A1* <http://ip.com/patapp/US20100203572>

5 Prozent

Druckexemplare der ausgewählten Publikationen oder elektronische Verweise

**9.1. Rödiger *et al.*, 2012b**

**Rödiger S**, Schierack P, Böhm A, Nitschke J, Berger I, Frömmel U, Schmidt C, Ruhland M, Schimke I, Roggenbuck D, Lehmann W & Schröder C **A Highly Versatile Microscope Imaging Technology Platform for the Multiplex Real-Time Detection of Biomolecules and Autoimmune Antibodies.** *Advances in Biochemical Bioengineering/Biotechnology* (2012) Mar 23 ISSN 1616-8542

doi: 10.1007/10\_2011\_132

(Die Seiten 22 - 61 sind im Druckexemplar enthalten oder online erhältlich.)



**9.2. Rödiger *et al.*, 2012a**

**Rödiger S**, Friedrichsmeier T, Kapat P & Michalke M **RKward - A Comprehensive Graphical User Interface and Integrated Development Environment for Statistical Analysis with R**. *Journal of Statistical Software* (2012) **49(9)**: pp. 1-23.

doi:

URL: <http://www.jstatsoft.org/v49/i09>

(Die Seiten 62 - 95 sind im Druckexemplar enthalten oder online erhältlich.)

**9.3. Rödiger *et al.*, 2011a**

**Rödiger S**, Ruhland M, Schmidt C, Schröder C, Grossmann K, Böhm A, Nitschke J, Berger I, Schimke I & Schierack P **Fluorescence dye adsorption assay to quantify carboxyl groups on the surface of poly(methyl methacrylate) microbeads**. *Analytical Chemistry* (2011) **83**: pp. 3379-3385.

doi: 10.1021/ac103277s

(Die Seiten 96 - 112 sind im Druckexemplar enthalten oder online erhältlich.)

**9.4. Rödiger *et al.*, submitted**

**Rödiger S**, Böhm A & Schimke I **Surface Melting Curve Analysis with R**. *The R Journal*  
(submitted)

doi:

URL: <http://journal.r-project.org>

(Die Seiten 113- 123 sind im Druckexemplar enthalten oder online erhältlich.)

**9.5. Rödiger *et al.*, 2011b**

**Rödiger S**, Schmidt C, George S, Frömmel U, Ruhland M, Schimke I, Schierack P & Schröder C **Alternative Nukleinsäureamplifikationsverfahren für die Multiparameteranalytik**. *Pabst Science Publishers* (2011). ISBN: 978-3-89967-703-4  
*www.pabst-publishers.de*

doi:

URL: [www.pabst-publishers.de](http://www.pabst-publishers.de) | <http://d-nb.info/1010685961/04>

(Die Seiten 124 - 138 sind im Druckexemplar enthalten oder online erhältlich.)

**9.6. Rödiger *et al.*, 2008a**

**Rödiger S**, Schierack P & Schröder C **Multiplex-DNA-Mikropartikeltechnologien und deren Anwendungen**. *Pabst Science Publishers* (2008). ISBN: 978-3-89967-461-3  
[www.pabst-publishers.de](http://www.pabst-publishers.de)

doi:

URL: [www.pabst-publishers.de](http://www.pabst-publishers.de) | <http://d-nb.info/988349205/04>

(Die Seiten 139 - 168 sind im Druckexemplar enthalten oder online erhältlich.)

**9.7. Lehmann et al., 2008**

Lehmann W, Böhm A, Grossmann K, Hiemann R, Nitschke J & **Rödiger S** **Method for carrying out and evaluating mix & measure assays for the measurement of reaction kinetics, concentrations and affinities of analytes in multiplex format.** (2008) Patent: *Publication number: US 2010/0203572 A1* <http://ip.com/patapp/US20100203572>

doi:

URL: <http://ip.com/patapp/US20100203572>

(Die Seiten 169 - 187 sind im Druckexemplar enthalten oder online erhältlich.)

## 10. Anteilsklärung an den erfolgten Publikationen

Stefan Rödiger hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: **Rödiger S**, Schierack P, Böhm A, Nitschke J, Berger I, Frömmel U, Schmidt C, Ruhland M, Schimke I, Roggenbuck D, Lehmann W & Schröder C **A Highly Versatile Microscope Imaging Technology Platform for the Multiplex Real-Time Detection of Biomolecules and Autoimmune Antibodies**, *Advances in Biochemical Bioengineering/Biotechnology*, 2012

60 Prozent, Impact Factor: 4,165 (2011)

Beitrag im Einzelnen: Idee und Studiendesign, Experimentelle Arbeiten und Methodenentwicklung, Dateneingabe sowie statistische Auswertung und Darstellung der Daten, Manuskriptanfertigung

Publikation 2: **Rödiger S\***, Friedrichsmeier T\*, Kapat P & Michalke M **A Comprehensive Graphical User Interface and Integrated Development Environment for Statistical Analysis with R**, *Journal of Statistical Software*, 2012

30 Prozent, Impact Factor: 2,647 (2010)

Beitrag im Einzelnen: Programmierung bzw. Erweiterung von Plugings und weiterer Infrastruktur, Konzeption und Darstellung von einem Großteil der Abbildungen, Manuskriptanfertigung

\* equal contribution, corresponding author

Publikation 3: **Rödiger S**, Ruhland M, Schmidt C, Schröder C, Grossmann K, Böhm A, Nitschke J, Berger I, Schimke I & Schierack P **Fluorescence dye adsorption assay to quantify carboxyl groups on the surface of poly(methyl methacrylate) microbeads**, *Analytical Chemistry*, 2011

70 Prozent, Impact Factor: 5,874 (2010)

Beitrag im Einzelnen: Experimentelle Arbeiten, Studiendesign, Methodenentwicklung, Dateneingabe sowie statistische Auswertung und Darstellung der Daten, Manuskriptanfertigung

Publikation 4: **Rödiger S**, Böhm A & Schimke I **Surface Melting Curve Analysis with R**, *The R Journal*, submitted

85 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Idee und Studiendesign, Methodenentwicklung, Experimentelle Datenerhebung sowie statistische Auswertung und Darstellung der Daten, Manuskriptanfertigung, Programmierung der Software

Darüber hinaus bezieht sich die vorliegende Dissertation auf Ergebnisse, die in Buchform präsentiert wurden:

Publikation 1: **Rödiger S**, Schierack P & Schröder C, **Multiplex-DNA-Mikropartikeltechnologien und deren Anwendungen**, *Pabst Science Publ* ISBN: 978-3-89967-461-3, 2008  
85 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Komplette Literaturlaufarbeitung, Konzeption, Informationsaufarbeitung, Anfertigung der Grafiken und Manuskriptanfertigung

Publikation 2: **Rödiger S**, Schmidt C, George S, Frömmel U, Ruhland M, Schimke I, Schierack P & Schröder C, **Alternative Nukleinsäureamplifikationsverfahren für die Multiparameteranalytik**, *Pabst Science Publ* ISBN: 978-3-89967-703-4, 2011  
75 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Komplette Literaturlaufarbeitung, Konzeption, Informationsaufarbeitung, Anfertigung bzw. Überarbeitung der Grafiken und Manuskriptanfertigung

Darüber hinaus bezieht sich die vorliegende Dissertation auf Ergebnisse, die in einer Patentschrift präsentiert wurden:

Publikation 1: Lehmann W, Böhm A, Grossmann K, Hiemann R, Nitschke J & **Rödiger S** **Method for carrying out and evaluating mix & measure assays for the measurement of reaction kinetics, concentrations and affinities of analytes in multiplex format.** (2008)  
Patent: *Publication number: US 2010/0203572 A1* <http://ip.com/patapp/US20100203572>  
5 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Inhaltliche Erweiterungen für Anwendung im Bereich der Real-Time PCR, Diskussion, Patentrecherche, Redaktion

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

---



## **11. Lebenslauf**

---

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

---

Stefan Rödiger

## 12. Publikationsliste

### Akzeptierte Publikationen in Peer-Review Journalen

- **Rödiger S**, Friedrichsmeier T, Kapat P & Michalke M **RKward - A Comprehensive Graphical User Interface and Integrated Development Environment for Statistical Analysis with R**. *Journal of Statistical Software* (2012) 49(9): pp. 1-23.
- **Rödiger S**, Schierack P, Böhm A, Nitschke J, Berger I, Frömmel U, Schmidt C, Ruhland M, Schimke I, Roggenbuck D, Lehmann W & Schröder C **A Highly Versatile Microscope Imaging Technology Platform for the Multiplex Real-Time Detection of Biomolecules and Autoimmune Antibodies**. *Advances in Biochemical Bioengineering/Biotechnology* (2012) Mar 23 ISSN 1616-8542
- **Rödiger S**, Ruhland M, Schmidt C, Schröder C, Grossmann K, Böhm A, Nitschke J, Berger I, Schimke I & Schierack P **Fluorescence dye adsorption assay to quantify carboxyl groups on the surface of poly(methyl methacrylate) microbeads**. *Analytical Chemistry* (2011) 83: pp. 3379-3385.
- Willitzki A, Hiemann R, Peters V, Sack U, Schierack P, **Rödiger S**, Anderer U, Conrad K, Bogdanos P.D, Reinhold R & Roggenbuck D **New platform technology for comprehensive serological diagnostics of autoimmune diseases**. *Clinical and Developmental Immunology* (2013)

### Eingereichte Publikationen in Peer-Review Journalen

- **Rödiger S**, Böhm A & Schimke I **Surface Melting Curve Analysis with R**. *The R Journal*. ID: 2012-34
- Schierack P, **Rödiger S**, Kuhl C, Hiemann R, Li G, Nolan LK, Römer A, Nicholson B, Weinreich J, Berger E, Frömmel U & Schröder C **Characterization of porcine *E. coli* isolates by a new screening method**. *PLoS One*. ID: PONE-D-12-23507
- Kundzer AV, Volkova MV, Bogdanos D.P, **Rödiger S**, Schierack P, Generalov I, Roggenbuck D & Nevinsky GA **Deoxyribonuclease activity of polyclonal IgGs in patients with spondyloarthritis**. *Arthritis Research and Therapy*. ID: 1202361511737441

- Frömmel U, Böhm A, Nitschke J, Weinreich J, Groß J, **Rödiger S**, Schröder C & Schierack P **Adhesion pattern of commensal and pathogenic *E. coli* from humans and wild animals on human and porcine epithelial cell lines.** *Applied and Environmental Microbiology*. ID: #AEM02884-12

### Buchartikel

- **Rödiger S**, Schierack P & Schröder C **Multiplex-DNA-Mikropartikeltechnologien und deren Anwendungen.** *Pabst Science Publishers* (2008). ISBN: 978-3-89967-461-3 www.pabst-publishers.de
- **Rödiger S**, Schmidt C, George S, Frömmel U, Ruhland M, Schimke I, Schierack P & Schröder C **Alternative Nukleinsäureamplifikationsverfahren für die Multiparameteranalytik.** *Pabst Science Publishers* (2011). ISBN: 978-3-89967-703-4 www.pabst-publishers.de
- Frömmel U, Berger I, **Rödiger S**, Schierack P & Schröder C **Multiplex-PCR-Mikropartikel-Assay zum Nachweis bakterieller Gene.** *Pabst Science Publishers* (2011). ISBN: 978-3-89967-703-4 www.pabst-publishers.de

### Vorträge

#### 2008

- **Rödiger S** **Eine neue Bead-basierte Technologie für automatisiertes Multiparameter-Screening in der molekularen Diagnostik.** University of Applied Sciences Jena, 20.10.2008.

#### 2011

- **Rödiger S**, Schierack P, Großmann K, Lehmann W, Ruhland M, Hiemann R, Böhm A, Nitschke J, Weinreich J, Berger J, Frömmel U, Roggenbuck D, Schedler U & Schröder C (2011). **Detection of antibodies and DNA by multiplex microbead arrays using the VideoScan platform technology.** 2nd ASMET - The ASM Emerging Technologies Conference. San Juan, Puerto Rico. 08.03. – 11.03.2011.

#### 2012

- **Rödiger S** **Practical introduction to Rkward - A Comprehensive Graphical User Interface and Integrated Development Environment for Statistical Analysis with R.** BioTec Dresden. 20.01.2012.

- **Rödiger S** Schierack P, Lehmann W, Böhm A, Nitschke J, Schmidt C, Schimke I & Schröder C. **Advanced methods for the real-time detection and analysis of biomolecules**. Bundesinstitut für Materialforschung. Berlin. 25.04.2012.
- **Rödiger S** A highly versatile microscope imaging technology platform for the multiplex real-time detection of biomolecules. Conference: Innovations in diagnostic and treatment of autoimmune pathology. Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education, 04.05.2012.
- **Rödiger S** Applications of the VideoScan platform the multiplex real-time detection of biomolecules. University of Applied Sciences Jena, 20.10.2012.

### Patente

- Lehmann W, Böhm A, Grossmann K, Hiemann R, Nitschke J & **Rödiger S** Method for carrying out and evaluating mix & measure assays for the measurement of reaction kinetics, concentrations and affinities of analytes in multiplex format. (2008) Patent: Publication number: US 2010/0203572 A <http://ip.com/patapp/US20100203572>

### Poster / Abstracts

#### 2008

- **Rödiger S**, Schimke I & Schröder C Das AC16-Zellkultursystem und DNA-Mikropartikelarrays. Innovationsforum Multiparameteranalytik. Senftenberg, 27. – 29.3.2008
- **Rödiger S**, Schröder C, Lehmann W, Böhm A, Nitschke J, Hiemann R, Berger I, Grossmann K, Lehmann J & Schierack P A novel microparticle-based technology for an automated multi-parameter screening in molecular diagnostics. *abstract in: International Journal of Medical Microbiology (IJMM; 298S2, Suppl. 45, MSP16, p. 10)* (2008) **298**: pp. 1-118. Poster: 60ste Tagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM). Dresden, 21. – 24.09.2008.

#### 2009

- **Rödiger S**, Weinreich J, Böhm A, Nitschke J, Berger I, Schröder C & Schierack P Simultaneous detection of *E. coli* genes after a multiplex PCR by the VideoScan platform. 61ste Tagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM). Göttingen, 20. – 23.09.2009.
- **Rödiger S**, Lehmann J, Böhm A, Nitschke J, Berger I, Schröder C & Schierack P Simultaneous detection of *E. coli* genes after a multiplex PCR using the VideoScan

**platform**. 1. Potsdamer Bioanalytik Kolloquium, 10. November 2009, Fraunhofer IBMT, Potsdam-Golm

## 2010

- **Rödiger S**, Ruhland M, Schmidt C & Schierack P **Application of the VideoScan platform - A simple and fast fluorescence dye adsorption assay to quantify carboxyl groups on the surfaces of PMMA microbeads**. (1) DNA-Based MicroNano Integration 2010 International Symposium, IPHT Jena, 27. – 29.5.2010 (2) iPOC Statusseminar. Fraunhofer IBMT, Potsdam 02.06.2010.
- Frömmel U, Schröder C, **Rödiger S**, Weinreich J, Böhm A, Nitschke J & Schierack P **Detektion bakterieller Gene mittels Multiplex-Mikropartikelarray unter Einsatz der VideoScan-Technologie**. 2. Potsdamer Bioanalytik Kolloquium, Auf dem Weg zu autonomen Biosensoren – Die nächste Generation der Bioanalytik. Potsdam, 10.11.2010.

## 2011

- Ruhland M, **Rödiger S**, Schmidt C, Sowa M, Krause A, Schröder C & Schierack P **Optimierungsstrategien zur Immobilisierung von biotinylierten Biomolekülen an streptavidinbeschichteten Mikropartikeln für Multiparameteranwendungen**. 5. Innovationsforum Multiparameteranalytik. Senftenberg, 10.03.2011.
- **Rödiger S**, Deutschmann C, Schröder C, Schimke I & Schierack P **Proof of Concept eines mikropartikelbasierten Hydrolysesonden-Assays für die Genexpressionsanalyse von herzspezifischen Marker-, Ionenkanal- und Rezeptorgen humaner Kardiomyozyten**. 5. Innovationsforum Multiparameteranalytik. Senftenberg, 10.03.2011.
- Frömmel U, **Rödiger S**, Weinreich J, Schröder C, Berger I, Böhm A, Nitschke J & Schierack P **Detection of virulence-associated genes of *Escherichia coli* by Multiplex-PCR-Bead-Assay**. Federation of European Microbiology Societies (FEMS)-Leopoldina-Symposium on Emerging Topics in Microbial Pathogenesis. Würzburg, 12. – 14.04.2011.

## 2012

- **Rödiger S**, Schierack P, Lehmann W, Schimke I, Ruhland M, Böhm A, Nitschke J & Schröder C **Real-Time Applications of the VideoScan Technology for the Detection and Analysis of Heart Specific Markers**. 6. Innovationsforum Multiparameteranalytik. Senftenberg, 16.03.2012.

- **Rödiger S**, Kuhl C, Hiemann R, Li G, Weinreich J, Berger E, Nolan LK, Nicholson B, Römer A, Frömmel U, Schröder C & Schierack P. **Characterization of porcine intestinal *E. coli* isolates by a new screening method - An automatic screening method to characterize probiotic potential and adhesive abilities**. 8th Joint INRA-Rowett Symposium "Gut Microbiota: friend or foe?", Clermont-Ferrand, 17. – 21.06.2012
- Schierack P, **Rödiger S**, Hiemann R, Li G, Weinreich J, Berger E, Römer A, Frömmel U & Schröder C **Probiotic effects of porcine *Escherichia coli* isolates on EPEC infection**. Tagung der Fachgruppe "Bakteriologie und Mykologie". Leipzig, 27. – 29.06.2012.
- Schmidt C, Krause A, **Rödiger S**, Ruhland M, Schierack P & Schröder C **An efficient and low cost epitope mapping procedure using a microparticle based multiplex detection system**. Potsdam Days on Bioanalysis 2012, 07. – 08.11.2012.
- Frömmel U, **Rödiger S**, Böhm A, Nitschke J, Weinreich J, Groß J, Lehmann W, Schröder C & Schierack P **Screening of adhesion of human and animal *Escherichia coli* and their virulence-associated genes**. Potsdam Days on Bioanalysis 2012, Fraunhofer IBMT Postdam, 07. – 08.11.2012.
- **Rödiger S**, Schierack P, Schmidt C, Böhm A, Schimke I, Lehmann W & Schröder C **Nucleic Acid Melting Curve Analysis on the Surface of Microbeads**. Potsdam Days on Bioanalysis 2012, Fraunhofer IBMT Postdam, 07. – 08.11.2012.

### **13. Eidesstattliche Versicherung**

„Ich, Stefan Rödiger, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Entwicklung eines Mikropartikelhydrolysesondenassays für die Genexpressionsanalyse“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

---

Unterschrift



## 14. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Ingolf Schimke für die kontinuierliche Betreuung meiner Doktorarbeit von Seiten der Charité bedanken. Durch seine intensive Förderung, Bereitstellung von Materialien, vielen wertvollen Anregungen, stete Diskussionsbereitschaft und der Idee zur Genexpressionsanalyse an humanen Kardiomyozyten hat er maßgeblich zur erfolgreichen Beendigung dieser Arbeit beigetragen. Des Weiteren verdanke ich Prof. Dr. Schimke lehrreiche Arbeitsaufenthalte bei verschiedenen Institutionen, die es mir ermöglichten, meine methodischen und fachlichen Kenntnisse zu erweitern.

Im gleichen Maße möchte ich Prof. Dr. Christian Schröder und Dr. habil. Peter Schierack danken, die mich von Seiten der Hochschule Lausitz (FH) betreut haben. Ihre Hilfe war von unschätzbarem Wert. Insbesondere Ihre Förderung zur Teilnahme und Präsentation an Kongressen, Vergabe von Betreuungsaufgaben von Praxis-, Bachelorarbeiten und die Durchführung von Lehrveranstaltungen trug maßgeblich zu meinem wissenschaftlichen Werdegang bei.

Dr. Werner Lehmann (Attomol GmbH) gilt als geistiger Vater des VideoScan-Systems. Ohne seine Vision wäre diese Arbeit nicht entstanden. Dafür und für die anregenden Diskussionen möchte ich ihm besonders danken.

Dem **RKward** Team und vor allem dem Projektleiter Thomas Friedrichsmeier danke ich für die Möglichkeit, an **RKward** mitzuarbeiten. Im gleichen Atemzug möchte ich der **R-Gemeinschaft** danken, ohne die ein Teil meiner Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Dr. Uwe Schedler und Dr. Thomas Thiele (PolyAn GmbH) danke ich für die hilfreichen Diskussionen und Bereitstellung von Mikropartikeln.

Mein großer Dank gilt ebenfalls Alexander Böhm, Jörg Nitschke, Ingo Berger, Mirko Ruhland, Dr. Carsten Schmidt, Dr. Henning Hanschmann, Sandra George, Ulrike Frömmel, Melanie Gruner, Andrea Krause, Jörg Weinreich, Prof. Dr. Alexander Kaiser, Prof. Dr. Dirk Roggenbuck, Prof. Dr. Klaus-Peter Stahmann, Prof. Dr. Ursula Anderer und Prof. Dr. Jahn-Heiner Küpper. Besonders möchte ich mich bei Claudia Deutschmann, Katharina Metzner, Mandy Sowa, Lydia Schneider, Julia Groß und Juliane Fischer für ihre tatkräftige Unterstützung im Labor bedanken, da ohne sie diese Entwicklungen nur schwer möglich gewesen wäre.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, meinen Bruder Frank und Antje und Familie, die mir immer unterstützend zur Seite standen. Meinen Freunden danke ich ebenfalls für ihre Unterstützung während all der Jahre.