

1. Einleitung

Eines der größten Projekte in der Biochemie, war die Sequenzierung des humanen Genoms. Die Grundlage für dieses Vorhaben, war die durch Fred Sanger entwickelte Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977). Über einen Zeitraum von mehreren Jahren arbeitete ein multinationales Team an der Entschlüsselung des humanen Genoms. Hiervon versprach man sich ein genaueres Wissen über die Vorgänge im menschlichen Organismus. Es bestand die Hoffnung durch ein besseres Verständnis von den biochemischen Reaktionen im Körper, zu einer frühen Identifizierung von verschiedenen erblich bedingten Krankheiten zu kommen. Durch eine frühe Diagnose erhoffte man sich eine bessere Heilungschance.

Eine zentrale These vor der Sequenzierung war, dass ein Gen eine Funktion bedingt. Hierbei wird von der „ein Gen ein Protein Hypothese“ gesprochen. Diese besagt, dass ein Gen zu einem Protein umgeschrieben wird und das gebildete Protein genau eine Funktion übernimmt.

Die Übersetzung der genetischen Information eines DNA-Abschnitts in eine mRNA-Sequenz wird als Transkription bezeichnet. In der darauffolgenden Reaktion wird die mRNA durch Beteiligung der Ribosomen und weiteren Komponenten in ein Protein umgewandelt. Das gebildete Protein kann dann seine vorgesehene Aufgabe übernehmen oder muss bis zur vollständigen Funktionsfähigkeit noch weiter prozessiert werden. Bedingt durch die „ein Gen ein Protein Hypothese“ wurde die Anzahl der Gene auch auf mehr als 100000 geschätzt.

Durch den Beginn der Auswertung der gesammelten Daten aus dem Humanen Genom Projekt wurde ersichtlich, dass wesentlich weniger Gene existieren. Die Anzahl der Gene wird zur Zeit mit etwa 22 000 (consortium, 2004) angenommen. Hierbei ist ein Vergleich der Anzahl der Gene zwischen einem Einzeller wie *E.coli* und dem Menschen sehr interessant. *E.coli* besitzt mit seinen $4,6 \times 10^6$ Basenpaaren des Genoms etwa 5000 Gene. Der menschliche Organismus weist etwa 3×10^9 Basenpaare auf. Der Mensch ist mit seinen 10- 100 Billionen (10^{13} - 10^{14}) Zellen wesentlich komplexer aufgebaut als ein einzelliger Organismus. Die Anzahl der Gene spiegelt dieses Verhältnis jedoch nicht wieder. Die Komplexität des menschlichen Körpers muss daher auf andere Weise zustande kommen. Hierbei spielt die Regulation der einzelnen Gene offenbar eine entscheidende Rolle. Von einem genauen Verständnis der Regulation ist man zum heutigen Zeitpunkt noch weit entfernt.

Der Abschluss des Humanen Genom Projektes hat eine Reihe von Fragen aufgeworfen, die in den folgenden Jahren näher untersucht werden müssen. Diese Periode wird daher auch als post Genom Zeitraum (*post genomics era*) bezeichnet. Die Aufgaben in der Forschung der folgenden

1. Einleitung

Jahre bestehen unter anderem in der Untersuchung der Regulation der Gene. Bei solchen Analysen sind die Funktionen der einzelnen Gene, der gebildeten Proteine sowie der eventuell vorhandenen Wechselwirkungen zwischen den beteiligten Komponenten von entscheidender Bedeutung. Da es sich bei diesem Bereich der Forschung vor allem um die Funktion der einzelnen Komponenten handelt, wird sie auch als funktionelle Genomanalyse (functional genomics) bezeichnet.

Bei der funktionellen Genomanalyse werden neben der Funktion eines Gens oder eines Proteins vor allem die Wechselwirkungen zwischen Proteinen untersucht. Diese Wechselwirkungen können zu veränderten Funktionen der Proteine führen. Es wurde gezeigt, dass sich Proteine gegenseitig beeinflussen können. Dadurch werden ganze Netzwerke der Regulation ausgebildet. Zur Darstellung eines solchen Netzwerkes wird an dieser Stelle auf die Arbeit von Rhodes (Rhodes *et al.*, 2005) verwiesen. In der Arbeit von Rhodes wird deutlich, dass es eine Vielzahl von Interaktionen zwischen verschiedenen Proteinen geben kann. Er spricht von mehr als 40000 Protein-Protein Interaktionen. Die Zahlen, die in der Arbeit von Rhodes genannt werden, beziehen sich auf ein Modell und können eventuell noch wesentlich höher sein. Die Interaktionen, die möglicherweise zwischen Proteinen und Nukleinsäuren auftreten, werden dabei noch nicht berücksichtigt. Des Weiteren sind die Interaktionen von Proteinen zu anderen Makromolekülen in Betracht zu ziehen.

Für umfassende Analysen von solchen komplexen Netzwerken werden neuartige Methoden benötigt. Diese sollten eine Vielzahl von Proben analysieren können. Nur durch die Verwendung von Hochdurchsatzverfahren ist es möglich komplexe Wechselwirkungsnetzwerke zeitnah zu analysieren.

In diesem Zusammenhang findet man häufig die Begriffe der Miniaturisierung und der Parallelisierung. Eine massive Erhöhung des Probendurchsatzes im Vergleich zu den konventionellen Methoden war von Nöten, um Wechselwirkungen in einem Umfang wie sie Rhodes beschreibt aufdecken zu können.

1.1 Vorteile der Parallelisierung und Miniaturisierung

Die Miniaturisierung zeichnet sich durch die Verringerung des Probenvolumens aus. Mit der Verringerung des Probenvolumens sinken auch die Kosten für das benötigte Probenmaterial pro Reaktion. Darüber hinaus ist es möglich, durch die Verringerung der Größe der Reaktionsräume eine Parallelisierung zu realisieren. Unter der Parallelisierung ist zu verstehen, dass eine Vielzahl an Reaktionen zur gleichen Zeit stattfinden können. Als eines der ersten Beispiele der Miniaturisierung und der Parallelisierung ist die Einführung von Mikrotiterplatten zu nennen. In der einfachsten Form werden Mikrotiterplatten mit 96 Reaktionsräumen angeboten. Durch eine weitere Verkleinerung des Reaktionsraumes konnten auch Platten entwickelt werden, in denen 384 Proben gleichzeitig analysiert werden können. In Laboren, die sich auf das Auffinden neuer Wirkstoffkandidaten in der pharmazeutischen Industrie spezialisiert haben, werden heute Platten mit 1536 Reaktionsräumen eingesetzt. In diesen Platten laufen biochemische Reaktionen in einem Volumen von weniger als 10 μL ab. Gerade bei Hochdurchsatzverfahren, bei denen viele Tausend Wirkstoffkandidaten mit einem bestimmten Protein untersucht werden, kann das zu einer beträchtlichen Einsparung an Kosten führen.

Darüber hinaus kann das geringere Volumen bei thermischen Reaktionen zu einem wichtigen Vorteil werden. Die Zeit die benötigt wird, um ein kleines Volumen auf eine bestimmte Temperatur zu bringen, ist wesentlich kürzer als bei größeren Volumina. Es wird von der Verringerung der thermischen Masse gesprochen. Dadurch können Reaktionsgefäße entstehen, bei denen eine sehr kurze Reaktionszeit realisiert werden kann.

Ein weiterer Vorteil ist, dass bei einer Verkleinerung des Volumens und einer konstanten Zahl an Molekülen es zu einer deutlichen Erhöhung der Konzentration kommt. Hierdurch kann die Nachweisgrenze von bestimmten Testsystemen weiter herab gesetzt werden (Lagally und Mathies, 2004). Ein gutes Beispiel für die Detektion von geringsten Probenmengen ist durch die Einzelmolekül-Polymerasekettenreaktion gezeigt worden (Lagally *et al.*, 2001b).

Die Verringerung des Volumens ermöglicht auch die Kombination von bestimmten Analysenmethoden. Hierbei sei zum Beispiel eine Kopplung von einer Polymerasekettenreaktion (PCR) und einer Elektrophorese auf einem Biochip erwähnt (Lagally *et al.*, 2001a). Der Vorteil einer solchen Kombination ist, dass das Risiko von Kontaminationen stark reduziert wird. Dies ist dadurch zu erklären, dass keine Eingriffe von außen notwendig sind, um eine vollständige Analyse durchführen zu können. Mit jedem Manipulationsschritt, wie dem Überführen der Proben einer PCR in eine weitere Reaktion, steigt das Kontaminationsrisiko. Durch eine

1. Einleitung

Miniaturisierung und Parallelisierung, sowie einer Kombination von mehreren Reaktionen fallen viele dieser Manipulationsschritte weg. Hierbei wird von integrierten Systemen gesprochen. Eine Vision von integrierten Mikrosystemen beinhaltet die Kopplung von allen benötigten Analysemethoden für eine genetische Untersuchung auf einem einzigen Objektträger. Dieses System wird in der Literatur als „*micro total analytic system*“ (μ TAS) (Manz *et al.*, 1990) bezeichnet.

Darüber hinaus ist eine Automatisierung von Mikrosystemen möglich. Durch die Automatisierung kann es zu einer weiteren Reduktion von Kosten und Zeit kommen. Des Weiteren kann durch die Automatisierung eine Reduktion von Fehlern erreicht werden. Dieser Vorteil wurde schon bei den integrierten Systemen angesprochen.

In dem vorangegangenen Abschnitt wurde dargestellt, dass die Überführung von biochemischen Reaktionen in den Mikromaßstab zu einer einfachen Parallelisierung führen kann. Die Parallelisierung hat, wie oben gezeigt, einige bedeutende Vorteile. Es wurde dargestellt, dass Reaktionen heute parallel in Platten mit bis zu 1536 Reaktionsräumen ablaufen können. Bei einer weiteren Steigerung des Probendurchsatzes wird von Biochips gesprochen (Lander, 1999). Biochips werden schon seit einigen Jahren entwickelt und wurden in verschiedenen Arbeiten im Hochdurchsatzverfahren eingesetzt (Gunderson *et al.*, 2005, Duggan *et al.*, 1999, Gresham *et al.*, 2006).

Der Begriff der Biochips wird allerdings nicht einheitlich verwendet und man findet darunter eine Anzahl von verschiedenen Reaktionssystemen. Diese sollen im folgenden etwas näher erläutert werden. Es ist möglich die Biochips in mehrere Gruppen zu unterteilen. Als eine grobe Unterteilung bietet sich die folgende Klassifizierung an:

- DNA Chips
- Protein Chips und
- Laborchip (Lab on Chip)

In den nachfolgenden Abschnitten werden die einzelnen Klassen der Biochips genauer dargestellt.

1.2 Die DNA Chip

Der Ursprung der DNA Chips liegt wahrscheinlich in der Entwicklung von Schena (Schena *et al.*, 1995). Das steigende Interesse an den DNA Chips spiegelt sich auch in der Anzahl der zu findenden Publikationen wider, was in Abbildung 1 dargestellt ist.

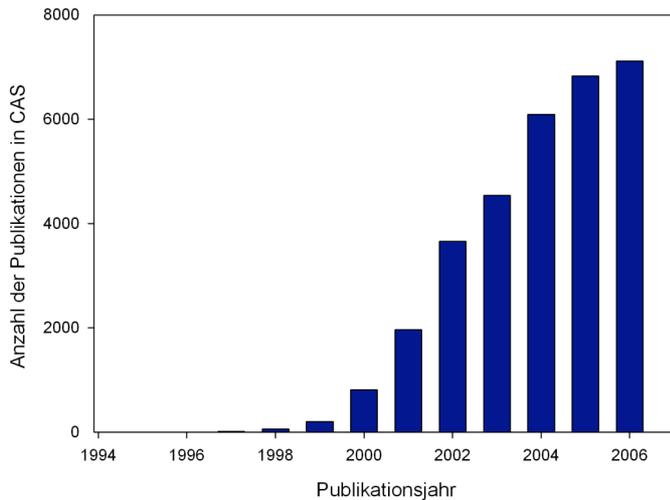


Abbildung 1: Anzahl der Publikation zum Thema DNA-Chip in Chemical Abstracts Service (CAS)

Auch bei den DNA Chips handelt es sich nicht um einen einheitlich verwendeten Begriff. Darunter versteht man Oberflächen, auf denen Nukleinsäuren auf verschiedene Arten aufgebracht wurden. Aus diesem Grund ist eine weitere Unterteilung nach dem Herstellungsverfahren sinnvoll. An dieser Stelle sind zwei völlig verschiedene Methoden zu erwähnen. Zum einen werden Nukleinsäuren direkt auf der Oberfläche eines Chips hergestellt, wobei man von einem fotolithografischen Verfahren spricht. Die zweite Methode beruht darauf, dass zuvor synthetisierte DNA an eine Oberfläche chemisch gebunden wird. Für die Bindung von Nukleinsäuren an Oberflächen stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Dabei ist zu unterscheiden ob es sich um lange oder um kurze Nukleinsäuremoleküle handelt.

1.2.1 Fotolithografische Synthese

Bei der Synthese von DNA auf einer Oberfläche bedient man sich einer Methode, die von Fodor im Jahre 1991 (Fodor *et al.*, 1991) entwickelt wurde. Es handelt sich dabei um ein fotolithografisches Verfahren, was im folgenden etwas genauer beschrieben wird.

Für die Herstellung von Oligonukleotiden auf der Oberfläche ist es notwendig, dass eine photolabile Schutzgruppe auf die Oberfläche des Chips aufgebracht wird. Durch die Verwendung von Masken ist es möglich an verschiedenen Stellen des Chips unterschiedliche Oligos zu erzeugen. Nur an der Stelle wo das Licht durch die Maske durchdringen konnte, wird die Schutzgruppe entfernt. In nächsten Schritt wird auf den gesamten Chip ein Nukleotid, welches ebenfalls eine Schutzgruppe enthält, zur Reaktion gebracht. Die Reaktion findet nur an den zuvor entschützten Stellen statt. Diese Schritte werden mehrfach mit verschiedenen Masken wiederholt, so dass an jeder Position verschiedene Oligonukleotide entstehen können. Die Vorteile dieser Art der Herstellung liegen vor allem darin, dass eine sehr hohe Probenzahl auf einen geringen Raum untergebracht werden kann. Darüber hinaus ist auch die Sequenz der Oligonukleotide und die dazugehörige Position bekannt.

Die Nachteile der Methode sind in dem hohen Aufwand der Herstellung und der damit verbundenen Kosten zu finden. Für jeden Einzelschritt muss eine neue Maske hergestellt werden. Für die Produktion solcher Chips sind mehrere Spezialgeräte notwendig, so dass die Produktion nur in Auftrag gegeben werden kann.

Des Weiteren findet die Synthese nur in 3'-5'Richtung statt, so dass nach der Synthese das 3'Ende an die Oberfläche gebunden ist. Diese macht es unmöglich Reaktionen wie die PCR oder Primerverlängerungen, wie sie durch Erdogan (Erdogan *et al.*, 2001) gezeigt wurden, durchzuführen. Darüber hinaus handelt es sich bei der Synthese um eine Methode, die nur mit einer 90%igen Effektivität erfolgt. Dies führt dazu, dass längere Oligonukleotide nur zu einem sehr geringen Prozentsatz hergestellt werden. Es kommt zu einer klaren Begrenzung der Länge der Moleküle. DNA Fragmente von mehr als 100 bp oder gar ganze Gene sind mit dieser Methode nicht herzustellen.

1.2.2 Immobilisierung von vorgefertigten DNA Molekülen auf einem Chip

Der zweite Weg der Herstellung von DNA Chips erfolgt in zwei Schritten. Die DNA wird nicht auf dem Chip synthetisiert, sondern zuvor auf klassischen Wegen hergestellt. Hierbei kann es sich um einfache Oligonukleotide oder auch um PCR-Produkte handeln.

Bei der Verwendung von Oligonukleotiden werden diese meist an ihrem 5'Ende modifiziert, so dass diese zum Beispiel Aminogruppen tragen. Durch die Verwendung von Quervernetzern ist eine kovalente Bindung an Glasoberflächen die zuvor durch ein Silan aktiviert wurden möglich. In den vergangenen Jahren wurde eine Vielzahl von Immobilisierungen von Oligonukleotiden auf Glasoberflächen gezeigt. Hierbei ist zu erwähnen, dass mit dieser Methode auch eine 5'-3' Richtung ermöglicht wird. Durch diese ist auch eine Verlängerung von Primern durch Polymerasen möglich.

Bei der Anbringung von längeren DNA-Molekülen werden ebenfalls zwei Möglichkeiten unterschieden.

Die erste Methode beruht auf den elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen einer positiven Glasoberfläche und der DNA. Diese positive Ladung wird hierbei durch die Behandlung mit einem Silan erreicht. Eine genaue Aussage, wie die DNA an die Oberfläche gebunden ist kann allerdings nicht getroffen werden. Auch ist es sicherlich schwierig weitere Reaktionen mit einer so gebundenen DNA durchzuführen.

Bei der zweiten Methode verwendet man einen Chip, an dem Oligonukleotide gebunden sind. Diese Oligonukleotide dienen als Startpunkte für eine Polymerasekettenreaktion, wodurch die Produkte dieser Reaktion ebenfalls fest an die Oberfläche gebunden sind (von Nickisch-Rosenegk *et al.*, 2005).

Die Methode, bei der Oligonukleotide gerichtet an die Oberfläche gebunden werden, wird auch kommerziell eingesetzt und entsprechende Chips verkauft. Im Vergleich zu den fotolithografischen Chips ist die Herstellung deutlich einfacher und dadurch günstiger. Die Anzahl der Proben ist bei diesen Chips geringer, was durch das Verfahren der Aufbringung der Oligonukleotide zu erklären ist. Zurzeit ist es technisch nicht möglich einen bestimmten Durchmesser der Tropfen auf dem Chip (Spot) zu unterschreiten. Zur Zeit werden Chips eingesetzt, welche Spots mit einem Durchmesser zwischen 75 µm und 500 µm aufweisen (Pirrung, 2000). Darüber hinaus wird mit der Verkleinerung des Durchmessers auf der Oberfläche auch das zu detektierende Signal immer schwächer. Eine Möglichkeit dieses Signal zu verstärken wurde durch die Einführung der dritten Dimension erreicht. Hierbei hatte die Firma

1. Einleitung

Gene Logic (Cheek *et al.*, 2001) einen Durchflusship entwickelt (Flow-thru Chip). Die Besonderheit an diesem Chip sollte die gesteigerte Sensitivität sein. In der Literatur wird beschrieben, dass dieser Chip in der Lage ist Proben mit einer Konzentration von 250 aM zu bestimmen. Mit diesem Chip konnte die Typisierung von Influenza gezeigt werden (Kessler *et al.*, 2004). Dieser Chip stellt momentan noch eine Besonderheit dar und findet noch keine weite Verbreitung.

Neben den Problemen der Detektion gibt es noch weitere Nachteile solcher Chips, so ist die Herstellung der Chips recht zeitaufwendig. Von dem Aufbringen der Proben mit einfachen Pipetten (Guo *et al.*, 1994) ist man durch die Verwendung von Robotern weit entfernt, doch auch diese benötigen einige Zeit für die Herstellung. Die benötigte Zeit zur Herstellung solcher Chips wird mit steigender Probenzahl immer größer. Darüber hinaus ist die Anschaffung solcher Roboter mit erheblichen Kosten verbunden.

Neben den DNA Chips werden auch immer mehr Proteinchips auf den Markt gebracht.

1.3 Proteinchips

Die Proteinchips sind im Gegensatz zu den DNA Chips noch relativ jung. Der Hintergrund besteht darin, dass man an eine bestimmte Stelle eines Glasträgers, ein definiertes Protein in der nativen Konformation binden möchte. Mit einem solchen Chip sollen Interaktionen entweder mit anderen Proteinen oder anderen Molekülen untersucht werden. Solche Chips sind für die Auffindung von neuen Wirkstoffkandidaten in der pharmazeutischen Forschung sehr hilfreich (Khandurina und Guttman, 2002)

Im Gegensatz zu den sehr stabilen Nukleinsäuren, die aufgrund ihres einheitlichen Aufbaus sehr ähnliche Eigenschaften aufweisen, sind die Proteine wesentlich komplexer. Schon durch den Aufbau aus 20 verschiedenen Bausteinen, den Aminosäuren, sind deutlich komplexere Strukturen möglich. Dies spiegelt sich in den unterschiedlichen Eigenschaften der Proteine wider. So gibt es Proteine, die hydrophob oder hydrophil sind, die sich in der Ladung auf der Oberfläche deutlich voneinander unterscheiden und die alle unterschiedliche Stabilitätskriterien aufweisen. Daraus ergibt sich auch das Problem, dass eine einheitliche Immobilisierung von Proteinen auf der Oberfläche nicht immer möglich ist.

Auch der Begriff Proteinchips wird nicht einheitlich verwendet. Auf der einen Seite versteht man darunter das Aufbringen von vielen verschiedenen Proteinen auf eine zweidimensionale Oberfläche ähnlich dem des DNA Chips. Auf der anderen Seite wird auch ein völlig anderes System mit dem gleichen Namen bezeichnet. Das momentan sehr häufig verwendete System zur

1. Einleitung

Messung von Protein Ligand Wechselwirkung ist das Biacore System. Die Grundlage bildet die Oberflächenplasmonresonanz. Das Kernstück eines solchen Gerätes ist ebenfalls ein Proteinchip, der allerdings nicht mit verschiedenen Proteinen, sondern nur mit einem Protein beschichtet ist. Bei solchen Chips geht es dann nicht um Hochdurchsatzverfahren sondern nur um die Bestimmung von Wechselwirkungen.

Eine völlig anderen Methode der Herstellung von Proteinchips ist die Synthese von Proteinen, die einen Aufreinigungs-Tag enthalten. Dieses wurde durch die Synthese von Proteinen mit einem His-Tag gezeigt. Die Oberfläche des Glases ist dabei mit Nickel beschichtet, welches an eine Nitrilotriessigsäure (NTA) gebunden ist. Schon während der Synthese wird das gebildete Protein an die Oberfläche gebunden. Diese Methode wird als Protein in situ Chip (PISA protein in situ array) (He und Taussig, 2001) bezeichnet.

Neben diesen Chip, bei denen das Protein an die Oberfläche gebunden ist, ist noch eine weitere Art von Chips zu finden, bei der keine kovalente Bindung mit der Oberfläche hergestellt wird. Die Proteine wurden über die Methode der zellfreien Proteinsynthese hergestellt (Angenendt *et al.*, 2004). Hierzu bediente man sich der Möglichkeit den Mix, der für die zellfreie Proteinsynthese benötigt wird, mit Robotern auf die Glasoberfläche aufzubringen. Die Reaktion der zellfreien Proteinsynthese erfolgte dann auf der Glasoberfläche.

Die hier vorgestellten Chips sind noch nicht für die Hochdurchsatzanalyse für komplexe Wechselwirkungen, wie sie von Rhodes beschrieben wurden, geeignet. Neben den DNA und den Protein Chips gibt es noch einen dritten Begriff, der in der Literatur mehrfach auftaucht, das Labor auf dem Chip (Lab on Chip).

1.4 Lab on Chip

Bei dieser Art von Chips wird versucht verschiedenste biochemische Reaktionen in einer miniaturisierte Form zu realisieren. Hierbei liegt ein Schwerpunkt dieser Systeme in dem Bereich der Amplifikation und der Auftrennung nach der Größe von Nukleinsäuren.

Eine der ersten Anwendungen, die in einem solchen Lab on Chip gezeigt werden konnte, ist die Kapillarelektrophorese (Harrison *et al.*, 1992).

Darüber hinaus wurden eine Amplifikationen auf einem solchen Chip gezeigt, auf die im Folgenden etwas genauer eingegangen werden soll. Des Weiteren wurden auch eine Aufreinigungen von Nukleinsäuren auf einem Chip realisiert (Hong *et al.*, 2004 Apr).

1. Einleitung

In dem Aufbau ähneln sich die Chips vor allem in einem System aus kleinsten Kapillaren auf einer Oberfläche. Für die Herstellung der Chips wird häufig Polydimethylsiloxan (PDMS) (Jia *et al.*, 2005), Glas (Easley *et al.*, 2006, Legendre *et al.*, 2006) oder Silizium (Zou *et al.*, 2005, Matsubara *et al.*, 2005) verwendet. Als Beispiel für die Herstellung solcher Systeme wird die Verwendung von fotosensitivem Glas beschrieben. Hierbei wird eine Maske auf das Glas aufgelegt, auf welcher die gewünschte Struktur vorhanden ist. Anschließend wird das Glas, auf dem sich die Maske befindet, mit UV Licht bestrahlt. Dadurch kommt es zur Veränderung in der Glasstruktur an den belichteten Stellen. Das Glas wird höheren Temperaturen ausgesetzt und kristallisiert an den belichteten Stellen aus. Es entsteht eine Glaskeramik, die man leicht mit Flusssäure herausätzen kann. Dies ist eine Möglichkeit der Mikrostrukturierbarkeit. Unter mikrostrukturierbar wird die Eigenschaft eines Materials verstanden, dieses so fein bearbeiten zu können, dass kleinste Strukturen realisiert werden können.

Das Resultat einer Mikrostrukturierung kann ein System mit feinsten Kanälen sein. Ein solches System wird auch als mikrofluidisches System bezeichnet. Die gebildeten Kanäle können noch durch die Verwendung von thermischen Elementen (Dodge *et al.*, 2004), Ventilen (Hong *et al.*, 2004 Apr) und Detektoren (Du *et al.*, 2005) erweitert werden.

Bei den PCR-Systemen, die auf der Grundlage eines mikrofluidischen Systems funktionieren, wird die Probe mit allen benötigten Substanzen für eine Polymerasekettenreaktion über unterschiedlich temperierte Zonen geleitet. Die Kanäle verlaufen dazu in Serpentinaen um möglichst wenig Platz zu verbrauchen (Kopp *et al.*, 1998). Mit diesem System gelang es Kopp eine PCR mit 20 Zyklen in einer Zeit von 1,5 Minuten zu realisieren.

Die Grundlage für die Entwicklung dieses Systems bildete die Arbeit von Nakano (Nakano *et al.*, 1994). Er leitete eine Kapillare durch drei Ölbäder mit unterschiedlichen Temperaturen. Dabei nutzte er die Länge der Kapillare in einem Ölbad für unterschiedliche Verweilzeiten bei einer bestimmten Temperatur.

Dieses Konzept wurde in mehreren weiteren Arbeiten verwendet (Kim *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2006a).

Weitere Entwicklungen auf diesem Gebiet führten dazu, dass nicht nur eine PCR sondern auch andere Reaktionen wie die Reverse Transkription (Obeid *et al.*, 2003) in einem mikrofluidischen System realisiert wurden.

Allerdings ist bei dem Konzept der mikrofluidischen Systeme eine Parallelisierung mit mehreren Tausend Reaktionen auf einem Chip bis lang nicht realisiert. Solche Hochdurchsatzchips werden

1. Einleitung

für die Untersuchung von komplexen Netzwerken der funktionellen Genomuntersuchung benötigt.

Eines haben die beschriebenen Chips aus den vorangegangenen Abschnitten alle gemeinsam. Es wird bei allen hier vorgestellten Chips eine Miniaturisierung vollzogen, die einige Vorteile hat.

1.5. Aufgabenstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Entwicklung eines neuartigen Biochips, der für künftige Analyse von komplexen genomischen Netzwerken eingesetzt werden kann.

Wie aus der Einleitung hervorgegangen ist, besteht für künftige Untersuchungen an komplex regulierten Netzwerken die Notwendigkeit neue Methoden zu entwickeln. Bei diesen Methoden ist ein hoher Grad an Parallellisierung notwendig. Damit geht zwangsläufig eine Miniaturisierung einher.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines Kapillarchips, der dazu in der Lage ist Flüssigkeiten eigenständig aufzusaugen und damit eine schnelle Art der Befüllung zu etablieren.

Darüber hinaus sollte in diesem Chip eine Möglichkeit der Amplifikation von Nukleinsäuren entwickelt werden. Für die Durchführung von biochemischen Reaktionen musste eine Methode der Abdichtung entwickelt werden, die reversibel ist und nach der Reaktion wieder entfernt werden kann, ohne dass es einer Durchmischung der einzelnen Proben kommt.

Für den Nachweis der Amplifikation war es notwendig die Proben aus dem Chip zurückzugewinnen und diese für schon bestehende Analysemethoden zu untersuchen.

Es war nötig, eine geeignete Methode für den Nachweis der Amplifikation von Einzelmolekülen zu entwickeln. Im Anschluss sollte die Amplifikation von Einzelmolekülen in den Chip nachgewiesen werden.

Neben der Amplifikation in Lösung sollte überprüft werden, ob es möglich ist diese auch in der festen Phase zu erreichen. Daher müssen Oligonukleotide an die Wand der Kapillare zu immobilisiert werden. Dadurch sollte ein geeignetes Verfahren der Immobilisierung gefunden werden und die Bindung an die Oberfläche der Kapillare nachgewiesen werden.

Als abschließende Aufgabe stand die Überprüfung der Möglichkeit zur Miniaturisierung der zellfreien Proteinsynthese an. Es war zu untersuchen, ob es möglich ist in einem geringen Volumen im unteren Nanaoliterbereich eine zellfreie Proteinsynthese durchführen zu können.