
**Ein schnelles Bead-basiertes und
bildgebendes Verfahren zur
Quantifizierung von Nukleinsäuren
für die Integration in
Lab-on-a-Chip-basierten
Point-of-Care-Testing-Systemen**

Dissertation

vorgelegt von

Tobias Klamp

geboren in Bielefeld

Bielefeld, August 2013

Dissertation

**A Rapid Bead-based Nucleic Acid
Imaging Assay for Integration in
Lab-on-a-Chip based
Point-of-Care-Testing Devices**

Tobias Klamp

August 2013

APPLIED LASER PHYSICS & LASER SPECTROSCOPY
DEPARTMENT OF PHYSICS
BIELEFELD UNIVERSITY

Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier °° ISO 9706

GUTACHTER:
Prof. Dr. Markus Sauer
Prof. Dr. Thomas R. Huser

Zusammenfassung

Die Identifizierung von Erregern ambulant erworbener Infektionen des unteren Respirationstrakts (CA-LRTI) ist von bedeutsamer Wichtigkeit für die Initiierung einer wirksamen medizinischen Behandlung. Da diese Art der Infektionen eine der Hauptgründe für infektionsbedingte Sterbefälle darstellt, ist eine unverzügliche ärztliche Behandlung sehr wichtig. Aufgrund der hohen Sterberate, insbesondere unter Kleinkindern, alten und geschwächten Personen, und wegen der Schwierigkeit einer Früherkennung der verantwortlichen Erreger wird zumeist aus Präventionszwecken eine Antibiotikabehandlung eingeleitet. Viele der Antibiotika-Medikationen erfolgen dabei vorschnell und sind überflüssig. Ein vermehrtes Auftreten von Antibiotikaresistenzen wie beispielsweise MRSA (Methicillin-resistent *Staphylococcus aureus*) ist die Folge.

Da die Differenzierung der verantwortlichen Erreger anhand der Symptomatik fast unmöglich und eine Bestimmung mittels Zellkultur kompliziert und zeitaufwändig ist, besteht ein hoher Bedarf an schnell durchführbaren analytischen Methoden. Besonders die ambulante Identifikation der Erreger in Praxen niedergelassener Ärzte ist in diesem Sinne sehr wichtig, da ein Großteil der Antibiotika außerhalb der Krankenhäuser appliziert wird. Für diese Art der Vor-Ort-Identifikation eignen sich insbesondere Point-of-Care-Testing (POCT)-Geräte, da sie leicht zu bedienen sind und schnell zu quantitativen Aussagen führen. In Verbindung mit einer Probenvorbereitung in mikrofluidischen Testchips (Lab-on-a-Chip, LOC) lassen sich innerhalb kürzester Zeit DNA- und RNA-Fragmente aus Proben der Atemwegsschleimhaut extrahieren und analysieren.

Die vorliegende Arbeit zeigt, wie eine quantitative Nachweisprozedur für diese Art realistischer DNA-Proben (5 kbp dsDNA) realisiert werden kann. Es wird verdeutlicht, wie mittels fluoreszenzmikroskopischer Bildgebung eine Methode entsteht, die geeignet ist, in POCT-Geräten Anwendung zu finden. Durch Verwendung magnetischer Beads als Mittel zur Analyt-Akkumulation und verschiedenster Optimierungen einer hybridisierungsbasierten Quantifizierungsprozedur können somit für die Detektion eines entsprechenden Fragments des Organismus *M. luteus* Empfindlichkeiten erlangt werden, die eine Identifikation von CA-LRTI Erregern in Proben relevanter Konzentration (ca. $5 \text{ pM} \hat{=} 0,1$

- 0,2 fmol bzw. $7,8 \log_{10}$ Moleküle) zulassen. Beachtenswert ist hier, wie dies ohne eine Vervielfältigung der DNA-Fragmente (z.B. durch PCR) oder Signalamplifikation ermöglicht werden kann. Dies wird anhand eines bead-basierten Sandwich-Assays ausgearbeitet. Die magnetischen Mikropartikel dienen dabei als mobile Phase des Nachweisverfahrens und sind mit Fänger-Fragmenten beschichtet; unter Bindung der Ziel-DNA kann mit einem fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid die Anwesenheit der spezifischen Ziel-Sequenz in 20 μ L Proben nachgewiesen werden.

In diesem Zusammenhang erfolgt eine Charakterisierung der erforderlichen Beschaffenheit der benutzten Oligonukleotide und deren Zusammensetzung. Diese legt dar, dass optimale Resultate mit kurzen, 25 Nukleotide langen Fänger- und Reporteroligonukleotiden erzielt werden können, wenn diese in einer kontinuierlichen Abfolge auf dem Ziel-Fragment positioniert werden. Es wird herausgestellt, wie punktuelle Modifikationen der Fänger-Fragmente mittels LNA-Substitution einzelner Nukleotide zusätzlich zur Verbesserung der Hybridisierungseffizienz beitragen. Im Zusammenhang der Detektion doppelsträngiger Ziel-Fragment-DNA wird demonstriert, wie kurze Hilfsoligonukleotide dazu geeignet sind, nach erfolgter Doppelstrangdenaturierung eine Rehybridisierung des nativen Komplements zu verhindern. Weiter wird im Verlauf dieser Arbeit gezeigt, wie durch Gebrauch magnetischer Beads die Bindungsreaktion beschleunigt und die Ausbeute der Bindungen durch aktive Bewegung verbessert werden kann.

Durch Miniaturisierung eines fluoreszenzmikroskopischen Aufbaus können Bedingungen geschaffen werden, wie sie in Detektions-Modulen von POCT-Geräten integriert sind, um unter realistischen Bedingungen die Nachweisprozedur anpassen und weiter optimieren zu können. Es wird eine neu entwickelte Methode zur Prozessierung fluoreszenzmikroskopische Bilder etabliert, die es dem Anwender ermöglicht quantitative Aussagen aus der Fluoreszenzintensität ziehen zu können. Darüber hinaus wird ein Screening der gängigen Fluoreszenzlabel durchgeführt und unter Gesichtspunkten des beadbasierten Verfahrens bewertet. Das Ergebnis zeigt, dass sich Cyanin-Farbstoffe besonders zur Markierung eignen.

Summary

Being the main reason for infectious disease deaths the identification of CA-LRTI pathogens is of utmost importance to initiate instant appropriate medication. In this concern the differentiation between etiological factors is exceedingly complicated. As mortality rate is increased for children, elderly, chronically ill or persons with weakened immune system, antibiotic treatment is initiated when first symptoms occur. In most cases antibiotic therapy is inappropriate and prematurely applied. Consequently, antibiotic resistant strains, e.g., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) appear.

Distinction of involved pathogens only on the basis of clinical signs and symptoms is almost impossible and cultivation of strains is a difficult and very time consuming process. Therefore, there is urgent need for highly rapid analytical methods. Especially the diagnosis on-site at resident physicians' offices is of crucial importance as the bulk of antibiotics is not applied in hospitals. Here, point-of-care (POCT) devices are of particular relevance due to intuitive and simple handling and rapid delivery of quantitative results. In combination with lab-on-a-chip (LOC) based systems extracting DNA and RNA fragments from specimens of sputum, it is possible to analyze pathogenic levels within few minutes.

In this work the realization of a DNA quantification assay is demonstrated, detecting 5 kbp dsDNA fragments as extractable from real-world patient specimens. It is shown that an efficient procedure can be realized when combined with fluorescence microscopy as appropriate tool for being integrated in POCT devices. Magnetic beads are used for accumulation process of target molecules resulting in sensitivities of 5 pM for *M. luteus* fragments (i.e., 0.1 - 0.2 fmol or $7.8 \log_{10}$ copies). Through further optimizations of the hybridization based assay format it is possible to achieve detection sensitivities that are suited for identifying CA-LRTI pathogens. Remarkably, this can be accomplished without any amplification of DNA fragments (e.g., by PCR) or signal (e.g., enzyme chain reactions). This is elaborated on the basis of a DNA-sandwich assay by means of magnetic microparticles coated with capturing probes and serving as mobile solid phase. Upon binding, the target sequence can be subsequently identified through fluorescently labeled detection probe specific hybridization. This stra-

tegy enables the detection of target fragments in sample volumes of 20 μL .

In this regard, the present work offers a description of several characterizations concerning the required composition and configuration of used oligonucleotides. As a result, optimal hybridization efficiencies can be obtained when capturing and detection probes are composed of 25 nucleotides each and when positioned adjacently along the target strand sequence. It is further highlighted that discrete modifications of capturing probes with single LNA nucleotides lead to an increased hybridization efficiency. For DNA duplex detection, it is demonstrated that short blocking oligonucleotides are feasible to prevent re-hybridization of the native target strand complement after denaturation. Moreover, this work presents a strategy to increase binding rate and yield of the target capturing process by inducing an alternating magnetic field thus leading to an active movement of particles.

It is described how the assay procedure can be optimized and aligned to specific conditions given by the potential integration in POCT devices. In this regard, a miniaturized fluorescence microscopic system was constructed enabling the evaluation of potential consequences for assay sensitivity. In addition, a new image processing method is introduced for general quantification issues using wide-field fluorescence microscopy. Last but not least, this work reviews commonly used fluorescent labels and evaluates their feasibility in the light of bead-based quantification methods. The result highlights cyanine dyes to be the best choice in this concern.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	ix
Summary	xi
Abkürzungsverzeichnis	xi
1 Einleitung	1
1.1 Diagnostik von CA-LRTI Pathogenen, Stand der Technik	2
1.2 Point-Of-Care-Testing (POCT)	3
1.3 Detektion und Identifikation von Nukleinsäuren	4
1.4 Zielsetzung	6
2 Theoretische Grundlagen	7
2.1 Prinzipien der Fluoreszenzspektroskopie	7
2.1.1 Absorption und Emission von Licht	7
2.1.2 Fluoreszenzmikroskopie	11
2.2 Nukleinsäuren	12
2.2.1 Natürliche Nukleinsäuren	12
2.2.2 Spezielle Formen und Strukturen	14
3 Material und Methoden	21
3.1 Ensemble Spektroskopie	21
3.1.1 Absorptionsspektroskopie	21
3.1.2 Emissionsspektroskopie	21
3.2 Fluoreszenz Mikroskopie	21
3.2.1 Das wissenschaftliche Fluoreszenzmikroskop	21
3.2.2 Das miniaturisierte Fluoreszenzmikroskop	22
3.3 Datenanalyse	23
3.3.1 Datenaufnahme	23
3.3.2 Bildverarbeitung	24
3.3.3 Darstellung der Daten	28
3.4 Benutzte Fragmente	29

3.5	Probenzubereitung	32
3.5.1	Allgemeiner Teil	32
3.5.2	Einzelne Experimente	35
3.6	Bestimmung des SCRs bei Zweifarbedetektion (Multiplexing) .	39
3.7	Berechnung der Verluste durch Austausch des Objektivs	41
4	Ergebnisse und Diskussion	43
4.1	Das Bead-basierte Quantifizierungsverfahren	43
4.1.1	Datenverarbeitung	44
4.1.2	Möglichkeiten des Nachweisverfahrens	49
4.1.3	Limitierungen des Nachweisverfahrens	51
4.2	Der Hybridisierungsprozess	56
4.2.1	Optimierung der Beschichtungsdichte	56
4.2.2	Variation der Länge der capDNA Fragmente	57
4.2.3	Einfluss der Binderegionen von detDNA und capDNA . .	59
4.2.4	Erhöhung der Affinität durch Modifikation der capDNA	60
4.2.5	Einzelsträngige und doppelsträngige Ziel-Fragmente . . .	62
4.3	Der Markierungsprozess (Das Reportersystem)	65
4.3.1	Geeignete Fluoreszenzlabel	65
4.3.2	Einfluss der Reporterkonzentration	72
4.4	Implementierung der Anforderungen für die Integration des Ver- fahrens in LOC-basierten POCT Systemen	74
4.4.1	Die integrierte LOC-Prozedur	74
4.4.2	Prämissen für POCT-basierte Anwendungen	79
4.4.3	Zusätzliche Optimierungen	82
4.4.4	Bewertung der elementaren Parameter	86
4.4.5	Detektionslimit	87
4.5	Multiplexing	89
5	Fazit und Ausblick	95
	Literaturverzeichnis	101
	Publikationen	114
	Danksagung	115

Abkürzungsverzeichnis

AF	engl.: Autofluorescence
API	engl.: Application programming interface
a.u.	engl.: Arbitrary units
BgNA	engl.: Background nucleic acid. Nukleinsäuren der Probelösung, die keine Ziel-Fragmente sind.
CA-LRTI	engl.: Community-acquired lower respiratory tract infection
capDNA	engl.: Capture DNA: Fängeroligonukleotid
CCD	engl.: Charge-coupled device
CAMRSA	engl.: Community-acquired methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
CAP	engl.: Community-acquired <i>pneumonia</i>
DNA	engl.: 2-desoxy- β -D-ribonucleic acid
detDNA	engl.: Detection DNA: Reporter Oligonukleotid
dsDNA	engl.: Double-stranded-DNA
EMCCD	engl.: Electron multiplying charge-coupled device
FOE	engl.: Field of excitation
FOV	engl.: Field of view
HP	engl.: Hairpin
IVD	engl.: In vitro diagnostic
LNA	engl.: Locked nucleic acid
LOC	engl.: Lab-on-a-chip
LRTI	engl.: Lower respiratory tract infection
MRSA	engl.: Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
NA	engl.: Numerical aperture
NSH	Nicht-spezifisches Hintergrundsignal
PBS	engl.: Phosphat buffered saline
PCR	engl.: Polymerase chain reaction
PNA	engl.: Peptide nucleic acid
POCT	engl.: Point-of-Care Testing
QE	engl.: Quantum efficiency
qPCR	engl.: Quantitative PCR

qRT PCR	engl.: Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
RNA	engl.: β -D-ribonucleic acid
SCR	engl.: Signal to crosstalk ratio
SEM	engl.: Standard error of mean
ssDNA	engl.: Single-stranded-DNA
STR	engl.: Short tandem repeat
tDNA	engl.: Target DNA

1 Einleitung

Infektionen des unteren Respirationstrakts (LRTI¹) sind die Hauptursache der meisten Sterbefälle unter den infektionsbedingten Erkrankungen. Im Jahr 2002 starben weltweit ca. 3,9 Millionen Menschen an Folgen dieser Infektionen, das macht ungefähr 6,9 % der gesamten Todesursachen dieses Jahres aus [WHO, 2004]. Unter den ambulant erworbenen Infektionen (CA-LRTI²) können sowohl virale als auch bakterielle Kolonisationen der Auslöser sein. 50 % davon entstehen dabei durch Viren, repräsentiert durch hauptsächlich Influenza A & B, Parainfluenzavirus 1 - 3 oder das Metapneumovirus. Bakterielle Infektionen werden in den meisten Fällen durch *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma pneumoniae* und vor allem *Streptococcus pneumoniae* hervorgerufen. Dabei ist besonders der Erreger *S. pneumoniae* ätiologisch für schwere Infektionen wie beispielsweise bakterielle Meningitis oder Lungenentzündung. Jährlich sterben etwa zwei Millionen Menschen an einer durch Pneumokokken verursachten Infektion, wobei besonders ältere Menschen und Kinder betroffen sind [Bjerre et al., 2009]. Bei Kindern unter fünf Jahren gehört die Lungenentzündung zu den größten Todesursachen [Kabra et al., 2010]. Die meisten aller Todesfälle treten dabei innerhalb der ersten 48 Stunden ein.

Da eine Differenzierung zwischen bakteriellen und viralen Infektionen allein durch symptomatische Diagnostik nahezu ausgeschlossen ist, ist die präventive Verabreichung von Antibiotika gängige Praxis. Wie aus aktuellen Studien hervorgeht wird der Großteil der konsumierten Antibiotika aufgrund von LRTI verschrieben [Greene et al., 2011]. Weiter wird die Kritik geübt, dass viele dieser Verabreichungen den Patienten dabei nicht nutzen, sondern vielmehr zu der Entstehung von Antibiotikaresistenzen beitragen [Greene et al., 2011]. Allein in Europa werden 90 - 95 % der Antibiotika außerhalb von Krankenhäusern appliziert, in erster Linie infolge von Infektionen des unteren Respirationstrakts [Vander Stichele et al., 2006]. Obwohl einigen Patienten ein Vorteil aus einem frühen Eingriff durch Behandlung mit Antibiotika entsteht, gibt es keine etablierten Methoden, diese Vorteile zu bewerten [Stanton et al., 2010]. Besonders alarmierend ist in diesem Zusammenhang das in letzter Zeit verstärkte

¹engl.: Lower Respiratory Tract Infection

²engl.: Community-Acquired Lower Respiratory Tract Infection

Aufkommen von ambulant erworbenen Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* Stämmen (CAMRSA³), die bei Infektion äußerst schwere (ambulant erworbene) Lungenentzündungen (CAP⁴) mit nekrotisierenden Eigenschaften verursachen.

1.1 Diagnostik von CA-LRTI Pathogenen, Stand der Technik

Für diagnostische Laboranalysen wird bevorzugt eine Probe der Atemwegschleimhaut (Sputum) entnommen [Gnarpe et al., 1997; Waring et al., 2001; Ellis, 1998], um invasive Eingriffe zu vermeiden. Die Identifikation von CA-LRTI Pathogenen erfolgt hauptsächlich über Kultivierung der aus dem Hals- oder Nasenrachenraum entnommenen und somit nicht-sterilen Abstriche. Mit dieser Methode ist besonders für die Bestimmung von viralen Pathogenen ein hoher Zeitaufwand verbunden. Der Zeitraum kann zwar von 4 - 7 Tagen auf zwei Tage verkürzt werden, benötigt dafür allerdings spezielle und komplizierte Verfahren [Mahony, 2008]. Auch für die Identifizierung von *M. pneumoniae* ist die Analytik mittels Kultivierung ungeeignet, da dieses Bakterium *in vitro* nur sehr langsam wächst und u.U. zwei bis fünf Wochen benötigen kann, um sichtbare Kolonien auszuformen [Loens et al., 2003]. Ein weiteres Problem besteht in dem Transport vom Ort der Probenentnahme ins mikrobiologische Labor. Proben des Sputums, die für einen längeren Zeitraum als zwei bis fünf Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt werden, weisen eine Verminderung der bakteriellen Erreger und eine Vermehrung der Kontaminationen auf. Die Proben sollten daher möglichst innerhalb von zwei Stunden verarbeitet und nicht länger als 24 Stunden gekühlt gelagert werden [Saubolle and McKellar, 2001]. Proben viraler Erreger sollten ebenso unverzüglich unter Kühlung auf 4 °C zum Labor überführt werden [Mandell, 2000].

Auf Grund dieser Schwierigkeiten der gängigen Technik besteht ein sehr hoher Bedarf bezüglich neuartiger Verfahren zur Frühdiagnose von CA-LRTI. Zwar bieten PCR basierte Detektionsverfahren für Nukleinsäuren einen vielversprechenden Ansatz, doch unterliegen sie gewissen Einschränkungen. Die meisten Systeme benötigen nach wie vor eine zu lange Prozessierungsdauer, sind zu teuer, begrenzt bezüglich der möglichen Ziel-Pathogene und zu kompliziert [Loens et al., 2003].

³engl.: Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

⁴engl.: Community-Acquired *pneumonia*

1.2 Point-Of-Care-Testing (POCT)

Im Fall von Infektionen, deren Diagnose sehr zeitkritisch ist, bietet die patientennahe Diagnostik direkt am Ort der Behandlung (POCT⁵) eine äußerst wichtige Lösung [Junker et al., 2010]. Dafür bedarf es kleiner mobiler Analysegeräte, die direkt auf der Krankenstation oder sogar in der Praxis eines niedergelassenen Arztes ihren Einsatz finden. Die Identifikation der Erreger kann somit unabhängig eines Zentrallabors *in vitro* erfolgen (IVD⁶). Dies führt neben einer Zeitersparnis auch zur Vermeidung des kritischen Transportwegs der entnommenen Proben. Da die Durchführung derartiger Analysetests meist durch medizinisches Assistenzpersonal durchgeführt werden muss, ist die Bedienung von POCT-Geräten ohne medizinisch-technischer Vorbildung Voraussetzung. Dafür ist es erforderlich, dass der gesamte Analyseprozess ohne vorhergehende Zu- oder Aufbereitung der Proben vollzogen werden kann. Eine oft genutzte Lösung bieten in diesem Sinne miniaturisierte Formate, basierend auf mikrofluidischen Strukturen zur Probenverarbeitung (LOC⁷). In Form von Kassetten oder kleinen Chips, auf denen alle benötigten Reagenzien in Reservoirs vorgelegt sind, kann durch einmaliges Injizieren der Patientenprobe der vollständige Analyseprozess initiiert werden [Roeser et al., 2011]. Das ideale POC-Nachweisverfahren liefert dabei innerhalb von ca. 30 Minuten das Ergebnis der Untersuchung; dadurch wird das unmittelbare Einleiten von therapeutischen Konsequenzen vor Ort ermöglicht. Besonders das Problem der Bildung von MRSA-Stämmen, hervorgerufen durch vorschnelle und fahrlässige antimikrobielle Antibiotika-Behandlungen, kann durch solche Maßnahmen zur Früherkennung eingegrenzt werden [Micek et al., 2011]. Eine frühzeitig erfolgte medizinisch-adäquate Behandlung trägt dabei zur Verbesserung der Heilungschancen bei [Kumar et al., 2006] und mindert somit entstehende Folgekosten [Mauldin et al., 2010; Nicolau, 2011].

Durch Einsatz von LOC-Verfahren in POCT-Systemen entstehen sehr spezifische Anforderungen an die Prozedur des molekularen Nachweisverfahrens. Um eine einfache, aber dennoch schnelle und zuverlässige Methode zu gewährleisten, muss die Technik der Erreger-Identifizierung sehr simpel gestaltet sein, also auf möglichst wenigen fehleranfälligen Prozessschritten beruhen. Es existiert zwar eine Vielzahl an PCR-basierten Methoden, jedoch ist deren Verwendung zum POCT-Nachweis von CA-LRTI bezüglich der Dauer sowie der Kapazität des simultanen Nachweises unterschiedlicher Erreger (Multiplexing) eingeschränkt.

⁵engl.: Point-Of-Care Testing

⁶engl.: In Vitro Diagnostic

⁷engl.: Lab-On-a-Chip

So können infolge von Dimerbildung der Primer und dem Auftreten von Artefakten maximal 10 - 20 Analyte parallel detektiert werden [Broude et al., 2001; Syvanen, 2005; Fredriksson et al., 2007]. Auch benötigt der Prozess der Vervielfältigung von Nukleinsäuren zusätzlich 10 bis 20 Minuten gegenüber amplifizierungsfreien Methoden. Im Fall von bestimmten viralen Infektionen besteht ferner die Erfordernis einer Umschreibung der RNA in DNA durch Anwendung der Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR). Während die Minimierung der Zeitdauer zwischen Probenentnahme und Erhalt der Ergebnisse sehr kritisch für den klinischen Nutzen ist [Bissonnette and Bergeron, 2012], zieht dies wiederum eine Verlängerung der Prozedur mit sich.

1.3 Detektion und Identifikation von Nukleinsäuren

Seit Anfang der 70er Jahre ist es durch Entwicklung der verschiedensten Methoden der Sequenzierung gelungen spezifische Gensequenzen zu analysieren. Somit wurde es möglich nicht nur einzelne Gene zu isolieren und deren Funktionen zu bestimmen, sondern auch ganze Genome unterschiedlicher Organismen zu entschlüsseln. Die Identifikation komplexer Basenpaar-Muster eröffnete neben der Möglichkeit zur Feststellung phylogenetischer Verwandtschaftsgrade ebenso die Erstellung einzigartiger DNA-Profile einzelner Individuen. So können durch Analyse und Vergleich spezifischer DNA-Sequenzen neben systematischen auch individuelle Abstammungsgutachten erstellt werden. Der gemeinhin bekannte Vaterschaftstest beruht beispielsweise auf der Methode eines solchen Vergleiches repetitiver DNA-Elemente (STR⁸). Mit Hilfe der Analyse von STR-Abschnitten lässt sich weiter der genetische Fingerabdruck identifizieren. Mit einer durchschnittlichen Präzision von $1:10^{11}$ können neue kommerziell erhältliche STR-Analysesysteme DNA-Muster zweier nicht-verwandter Personen voneinander diskriminieren. Auf diese Möglichkeit der Identifikation und Zuordnung einer DNA-Probe stützt sich ebenso das Feld der forensischen Analytik. Auch viele Gebiete der molekularen Forschung basieren auf der spezifischen Identifikation und Detektion von Nukleinsäuren. Dabei erstreckt sich der Schwerpunkt über die Untersuchung von Grundlagen der Vererbungsmechanismen bzw. der höchst speziellen Epi-Genetik bis zur Bestimmung von Genexpressions-Leveln. Darüber hinaus ist die Diagnose von genetischen Krankheiten oder akuten Infektionen auf Methoden der molekularen Nukleinsäure-Analytik angewiesen.

⁸engl.: Short Tandem Repeat

Grundlage für viele Arten der eingesetzten Verfahren bildet die 1983 von KARY MULLIS entwickelte Polymerase-Kettenreaktion (PCR⁹) zur Vervielfältigung von DNA. Durch dieser Methode ist es möglich kleinste Mengen an DNA um das 10^6 - 10^7 -fache zu amplifizieren. Dabei wird der natürliche Prozess der spezifischen Replikation durch Polymerisation einzelner Nukleotide mit Hilfe der DNA-Polymerase *in vitro* ausgenutzt. Unter vielen verschiedenen Formen der PCR ist besonders die Echtzeit-PCR (qPCR¹⁰) als Grundlage für die Analyse sehr geringer DNA-Konzentrationen geeignet. Da bei dieser Variante schon während der Kettenreaktion ein Fluoreszenzfarbstoff bzw. ein Markermolekül beigelegt wird, kann in Verbindung mit einer geeigneten Detektionsmethode nach relativ kurzer Zeit eine Identifikation der DNA erfolgen. Über die klassische Gel-Elektrophorese hinaus bieten sich zahlreiche neuartige Ansätze dafür an.

In jüngster Zeit wurden große Fortschritte bezüglich der Steigerung von Spezifität und Sensitivität direkter Detektionstechniken von Nukleinsäuren gemacht und viele neue Methoden wurden vorgestellt. Diese basieren dabei sowohl auf konfokaler [Zhang and Johnson, 2006; Li et al., 2003; Yahiatène et al., 2012] oder Weitfeld [Lehr et al., 2003; Klamp et al., 2013] Fluoreszenzmikroskopie als auch auf elektrochemischen [Kavanagh and Leech, 2006; Kukol et al., 2008] oder physikalischen Techniken [Nie et al., 2007; Cao et al., 2002; Merkoçi et al., 2005; Liu et al., 2006]. Trotz beeindruckenden Fortschritten im Hinblick auf ultrasensitive DNA-Detektion, beispielsweise auf Einzelmolekülebene [Li et al., 2003; Yahiatène et al., 2012; Nam et al., 2004; Hill et al., 2007], besteht nach wie vor Bedarf an der Entwicklung und Verbesserung von Methoden, die in der Lage sind, eine hohe Detektionsempfindlichkeit und -sensitivität mit der benötigten Prozessionsgeschwindigkeit zu vereinbaren, um damit Anwendbarkeit für den Gebrauch als zuverlässiges Werkzeug in miniaturisierten In-vitro-Diagnostik (IVD) -Systemen zu finden.

So zeigt die kritische Evaluation verschiedenster hochempfindlicher Methoden die offensichtlichen Nachteile für eine erfolgreiche Integration in LOC¹¹-basierten Geräten auf. Neben umständlichen Prozeduren und einer langen Verarbeitungsdauer benötigen viele Methoden hochkomplexe oder teure Aufbauten, die nur bedingt in miniaturisierter Form realisierbar sind. Auch wird die hohe Empfindlichkeit der unterschiedlichen Techniken oftmals an sehr kurzen (50-500 Nukleotide) und einzelsträngigen DNA-Fragmenten demonstriert. Die Umsetzung unter POCT-Bedingungen ist damit unpraktikabel, da realistische Zielmolekü-

⁹engl.: Polymerase Chain Reaction

¹⁰engl.: Quantitative PCR

¹¹engl.: Lab-On-a-Chip

le echter Patientenproben z.T. viele tausend Nukleotide lang sind und stets im Doppelstrang vorliegen.

1.4 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war es auf Grundlage der Fluoreszenzmikroskopie ein effizientes Quantifizierungsverfahren zum Nachweis von CA-LRTI Erregern für den Einsatz in POCT Geräten zu entwickeln. Die Arbeit repräsentiert dabei einen grundlegenden Teil der Ergebnisse des EU-Projekts TheraEDGE¹². Im Rahmen dieses Projekts wurde in Zusammenarbeit mit Partnern eines internationalen Konsortiums, zusammengesetzt aus Ärzten, Mikrobiologen, Mikrostruktur-Technikern, Informatikern, Ökonomen u.a., unter Verwendung interdisziplinärer Methoden ein System zur Weiterentwicklung des Stands der Technik bezüglich diagnostischer POCT- und IVD-Instrumente elaboriert.

Die vorliegende Arbeit stellte in diesem Sinne die Grundlage für die Entwicklung einer Strategie zur hochsensitiven Detektion von Nukleinsäuren unter spezifischen Anforderungen dar. Der Schwerpunkt bestand dabei insbesondere in der Erarbeitung der Assay-Prozedur sowie in der Konzeption und Optimierung der fluoreszenzmikroskopischen Detektionseinheit des Systems.

¹²Vertragsnummer 216027; <https://www.theraedge.org/>, Stand: 08/2013

2 Theoretische Grundlagen

Zum besseren Verständnis der Arbeit werden im Folgenden die Mechanismen der Fluoreszenz (Kapitel 2.1) sowie Eigenschaften und Strukturen der Nukleinsäuren (Kapitel 2.2) grundlegend skizziert.

2.1 Prinzipien der Fluoreszenzspektroskopie

2.1.1 Absorption und Emission von Licht

Absorption

Atome und Moleküle sind in der Lage Licht zu absorbieren. Unter dem Vorgang der Absorption versteht man im allgemeinen die Übertragung der Energie eines Photons auf ein Molekül oder ein Atom. Die übertragene Energie ist gequantelt und abhängig von der Frequenz bzw. der Wellenlänge des absorbierten Lichtes. Die Energie E eines Photons ist dabei nach der EINSTEIN'schen Lichtquantenhypothese durch den Zusammenhang

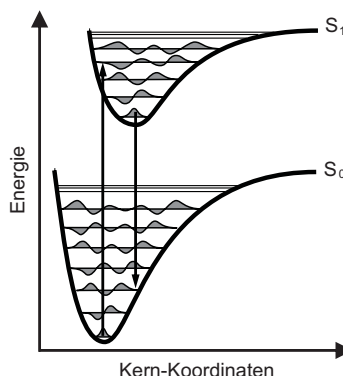
$$E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda} \quad (2.1)$$

gegeben. Dabei ist h das PLANCK'sche Wirkungsquantum, c die Lichtgeschwindigkeit, ν die Frequenz und λ die Wellenlänge des Photons. Durch den Übertrag der Energie auf ein Atom erfolgt eine Anregung der Valenzelektronen vom energetischen Grundzustand S_0 in einen energetisch höheren, angeregten Zustand S_1 . Bei Molekülen kann diese Energieaufnahme durch Anregung der Elektronen in höhere Rotations- oder Schwingungsniveaus erfolgen. Diese sind gemäß dem Prinzip der Energieerhaltung

$$\Delta E = E_{S_1} - E_{S_0} = h \cdot \Delta\nu \quad (2.2)$$

nur dann möglich, wenn die Energie des absorbierten Photons ausreichend hoch ist. Mit der Anregung eines Elektrons in einen höherenergetischen Zustand geht

Abbildung 2.1: Elektronenübergänge nach dem Franck-Condon-Prinzip. Darstellung der elektronischen Übergänge zwischen Grundzustand (S_0) und erstem angeregten Zustand (S_1) mit den beteiligten Vibrationsniveaus.



nun auch eine Änderung des Vibrationsniveaus des Elektrons einher. Dies lässt sich nach dem FRANCK-CONDON-Prinzip (Abbildung 2.1) erklären und beruht auf der größeren Trägheit der Atomkerne. Auf Grund der vergleichbar geringen Masse eines Elektrons erfolgt ein Elektronensprung mit 10^{-15} s wesentlich schneller als eine molekulare Schwingung des Kerns mit 10^{-12} s. Nach der BORN-OPPENHEIMER-Näherung sind daher nur solche Übergänge wahrscheinlich, bei denen sich die Lage zum Atomkern nicht wesentlich ändert. Bezogen auf Abbildung 2.1 erfolgen energetische Übergänge also nur in vertikaler Richtung mit einhergehender Änderung des Vibrationsniveaus.

Emission

Geht ein angeregtes Elektron eines Moleküls in seinen Grundzustand bzw. niederenergetischen Zustand über, so spricht man von Rekombination. Dieser Vorgang kann mit der Emission eines Photons einhergehen und wird dann allgemein als Lumineszenz bezeichnet. Erfolgt der Übergang strahlungslos, so nennt man dies Relaxation. Dabei kann die Energie einerseits über Schwingungsrelaxation und andererseits durch stoßbedingte Vibrationsrelaxation abgegeben werden (IC¹).

Die Schwingungsrelaxation kann dabei in das unterste Niveau des angeregten Zustands S_n oder in den untersten elektronisch angeregten Zustand S_1 innerhalb einiger Pikosekunden erfolgen. Die Abgabe der verbleibenden Energie des S_1 Zustandes kann anschließend durch spontane Emission eines Photons erfolgen und heißt Fluoreszenz. Abbildung 2.2 zeigt die Zusammenhänge dieser Vorgänge auf. Da dem Vorgang der Emission meist die Relaxation vorangeht, ein Teil der Energie des Elektrons also bereits durch innere Umwandlung (VR)

¹engl.: Internal Conversation

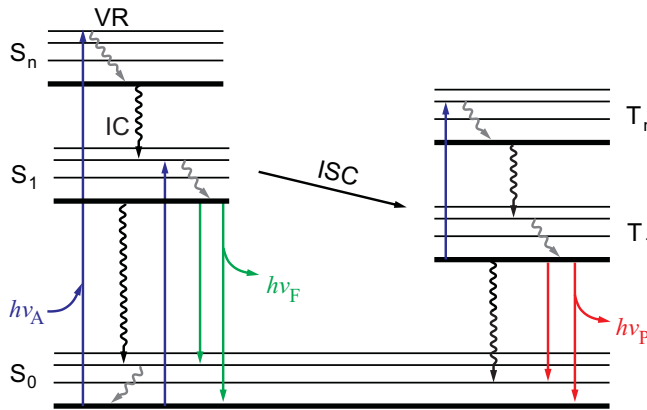


Abbildung 2.2: Jablonski-Diagramm. $S_{0/1/n}$: energetische Zustände des Singulettsystems (Grundzustand/erster/ n -ter Anregungszustand). $T_{1/n}$: energetische Zustände des Triplettsystems (erster/ n -ter Anregungszustand). A: Absorption, F: Fluoreszenz, P: Phosphoreszenz, IC: Internal Conversion, ISC Intersystem Crossing, VR: vibrational relaxation

abgegeben wurde, wird bei diesem Vorgang auch die energetische Differenz des angeregten Zustandes S_n zum Grundzustand S_0 geringer. Das hat nach dem Prinzip der Energieerhaltung wiederum zur Folge, dass die Energie bzw. die Frequenz des abgestrahlten Photons geringer ist, als die des absorbierten (Abb. 2.2). Damit geht also eine spektrale Verschiebung der Wellenlänge des emittierten Photons λ_{em} in längerwellige Bereiche gegenüber der Wellenlänge des absorbierten Photons λ_{abs} einher. Dieser Effekt wird als STOKES-Verschiebung bezeichnet. Somit gilt:

$$\Delta\lambda = |\lambda_{abs} - \lambda_{em}| \quad . \quad (2.3)$$

In dem speziellen Fall, dass der Emission keine strahlungslosen Übergänge vorangehen, ist $\Delta\lambda$ gleich 0. Dieser Prozess wird als Resonanzfluoreszenz bezeichnet und geschieht folglich ohne der Auswirkung einer STOKES-Verschiebung. Die vorangegangene Ausführung ist allerdings nur eine vereinfachte Darstellung der Vorgänge von Elektronenübergängen und bezieht sich lediglich auf Prozesse innerhalb des Singulettsystems. In diesem werden lediglich Elektronen unterschiedlicher Orbitale mit antiparallelem Spin betrachtet. Weist nun das Valenzelektron des angeregten Zustandes dem Elektron des Grundzustandes gegenüber einen gleichgerichteten, parallelen Spin auf, so erweitert sich die Multiplizität M des Mehrelektronensystems. Diese wird durch die Formel

$$M = 2S + 1 \quad (2.4)$$

berechnet. S stellt dabei den Gesamtspin der Elektronen dar. Da ein einzelnes Elektron bezüglich der Orientierung des Drehimpulses eine Spinquantenzahl $s = +\frac{1}{2}$ oder $s = -\frac{1}{2}$ annehmen kann, ergeben sich für den Gesamtdrehimpuls lediglich zwei unterschiedliche Wertigkeiten. So kann dieser entweder

$S = 1$ bei paralleler Ausrichtung der Elektronen, oder $S = 0$ bei antiparalleler Ausrichtung der Elektronen zueinander betragen. Aus der Multiplizität eines Mehrelektronensystems ergibt sich somit aus einem Gesamtspin von $S = 1$ ein Singulettssystem und aus einem Gesamtspin von $S = 3$ ein Triplettssystem (siehe Abb. 2.2). Durch Umkehr der Spin-Orientierung kann ein Übergang eines Elektrons zwischen dem Singulettssystem und dem Triplettssystem erfolgen (ISC²). Da diese Spinumkehr allerdings mit einer Änderung des Gesamtdrehimpulses verbunden ist, gilt ein solcher Übergang unter quantenmechanischen Gesichtspunkten als verboten. Dies bedeutet, dass ein Umklappen des Elektronenspins sehr unwahrscheinlich ist und somit nur sehr selten vorkommt. Dies drückt sich in der Übergangswahrscheinlichkeit und somit in der Dauer des Übergangs aus. So liegt die Dauer der Relaxation aus dem T_1 Zustand in den S_0 Zustand im Mikrosekunden-Bereich. Geschieht dieser Übergang unter Emission eines Photons, so wird dies als Phosphoreszenz bezeichnet. Zusammenfassend ergeben sich also zwei mögliche Wege des Elektronenübergangs in den Grundzustand. Zum einen kann dies strahlungslos durch Relaxation oder zum anderen unter Emission von Photonen erfolgen. Das Verhältnis dieser beiden Vorgänge zueinander beschreibt somit das Verhältnis der absorbierten Photonen zu den emittierten Photonen und wird daher Quantenausbeute Φ genannt:

$$\Phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (2.5)$$

k_r ist dabei die Rate der radiativen und k_{nr} die Rate der nicht-radiativen Prozesse. Betrachtet man allerdings nur die Quantenausbeute der Fluoreszenz, so wird der Vorgang der Phosphoreszenz in Formel 2.5 rein formal den nicht-radiativen Prozessen k_{nr} zugeordnet. Die Quantenausbeute kann Werte zwischen null und eins annehmen, wobei eins eine Ausbeute von 100 % darstellt. Die durchschnittliche Dauer des angeregten Zustands eines Moleküls, also die gemittelte Zeitspanne, die ein angeregtes Molekül benötigt um seine Anregungsenergie abzugeben, wird Fluoreszenzlebensdauer genannt. Der Zusammenhang ist dabei folgender:

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (2.6)$$

Der Verlauf der Fluoreszenz wird dabei als mono-exponentielle Kinetik durch

$$I(t) = I_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (2.7)$$

²engl.: Inter System Crossing

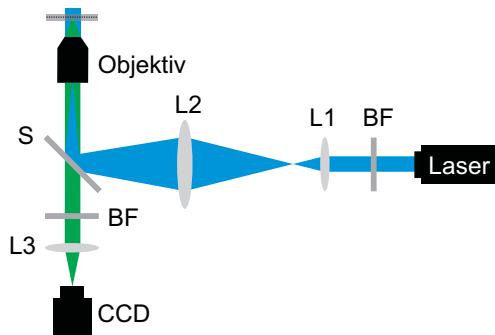


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des Strahlengangs eines fluoreszenzmikroskopischen Aufbaus mit Weitfeld-Ausleuchtung. BF: Bandpassfilter. L1, L2 & L3: Linsen. S: Dichroitischer Strahlteiler. CCD: CCD-Kamera.

beschrieben. $I(t)$ ist die Intensität der Fluoreszenz zum Zeitpunkt t , I_0 die Intensität zum Zeitpunkt $t = 0$ und τ die Fluoreszenzlebensdauer.

2.1.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die einfachste Form der Fluoreszenzmikroskopie ist die Weitfeld-Mikroskopie. Das namensgebende Charakteristikum dieser epi-mikroskopischen Technik ist die Ausleuchtung eines großen Teils des Volumens der Probe (Abb.: 2.3). Dazu wird der Laserstrahl durch ein Linsensystem aufgeweitet, um einen möglichst kleinen Fokus auf der hinteren Fokalebene des Objektivs zu erzeugen. Der Strahl wird dadurch im Objektiv kollimiert, wobei das Ausmaß der vorhergehenden Aufweitung u.a. die Breite des austretenden Anregungslichts bestimmt. Dadurch ermöglicht die Anwendung dieser Methode die Bestrahlung des gesamten Probenvolumens im Sichtfeld (FOV³). Nach Durchquerung des Objektivs wird das Fluoreszenzlicht mittels eines dichroitischen Strahlteilers von dem Anregungslicht separiert und mit Hilfe einer Tubuslinse auf den lichtsensitiven Teil des CCD-Chips der Kamera fokussiert.

Ein Nachteil der Weitfeld-Mikroskopie gegenüber anderen mikroskopischen Methoden, wie beispielsweise der konfokalen Mikroskopie, ist ein geringes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis (SNR⁴). Durch Bestrahlung eines großen Probenvolumens ist eine große Zahl von Molekülen im Anregungsvolumen gegeben; der Beitrag der Störquellen zum Signal ist also recht hoch [Tinnefeld and Sauer, 2005]. Diese treten in Form von Rayleigh- und Raman-Streuung an den Molekülen des Anregungsvolumens auf. Durch den Einsatz von Bandpassfiltern zwischen Kamera und Strahlteiler kann Rayleigh-Streuung vom Emissionslicht separiert

³engl.: Field-of-View

⁴engl.: Signal-to-Noise-Ratio

werden, während Raman-Streuung aufgrund der spektralen Ähnlichkeit zum Fluoreszenzsignal meist zu einem Verlust des SNR führt.

2.2 Nukleinsäuren

2.2.1 Natürliche Nukleinsäuren

Als Grundbaustein des Lebens finden sich Nukleinsäuren (NA⁵) in allen Organismen wieder und bilden zusammen mit Proteinen, Kohlenhydraten und Lipiden die größte Gruppe der biologischen Makromoleküle. Der Name leitet sich aus dem lateinischen Wort *nucleus* (Kern) ab, da sie durch den Mediziner FRIEDRICH MIESCHER im Jahr 1869 erstmals in den Zellkernen von Leukozyten lokalisiert wurden. Der Physiologe und Mediziner ALBRECHT KOSSEL identifizierte diese Substanz mit hohem Phosphatanteil später als Polymer, bestehend aus vier Bestandteilen und einem Zuckeranteil. Erst ein viertel Jahrhundert später lieferte OSWALD AVERY in Zusammenarbeit mit seinen Kollegen COLIN MACLEOD und MACLYN MCCARTY entgegen der damals vorherrschenden Meinung das erste nachhaltige Indiz, dass diese hochpolymere organische Verbindung der Träger der genetischen Information sei [Avery et al., 1944]. Auf Grundlage der Arbeiten von PHOEBUS LEVENE, der am Beispiel der Desoxyribonukleinsäure (DNA) die vier zuvor entdeckten Bestandteile der NA als organische Basen und den Zuckerteil als Desoxyribose ausmachte, konnte 1953 durch JAMES D. WATSON und FRANCIS CRICK der grundlegende Aufbau der DNA identifiziert werden. Anhand der röntgenspektrographischen Beugungsmuster einer DNA-Helixstruktur der Biochemikerin ROSALIND FRANKLIN [Franklin and Gosling, 1953] und der Kenntnis der Paarung von Purin- und Pyrimidin-Basen gelang es ihnen, das erste vollständige Modell der Molekularstruktur der DNA zu entwickeln [Watson et al., 1953]. Dabei setzten sie zunächst, analog zu der fehlerhaften Darstellung der α -Helices von Polypeptiden durch LINUS PAULING, der DNA-Helix eine Dreistrang-Struktur voraus. Mittels des von FRANKLIN determinierten Durchmessers der Helixstruktur gelang es ihnen jedoch ihr unzutreffendes Dreistrangmodell der DNA-Helix durch das Modell der Doppelhelix (Abb. 2.4) zu ersetzen.

Das von WATSON und CRICK entworfene Modell hat bis heute nicht an Gültigkeit verloren. Demzufolge besteht die Doppelhelix aus zwei zueinander komplementären Einzelsträngen, die durch Basenpaarung unter Ausbildung von Was-

⁵eng.: Nucleic Acid

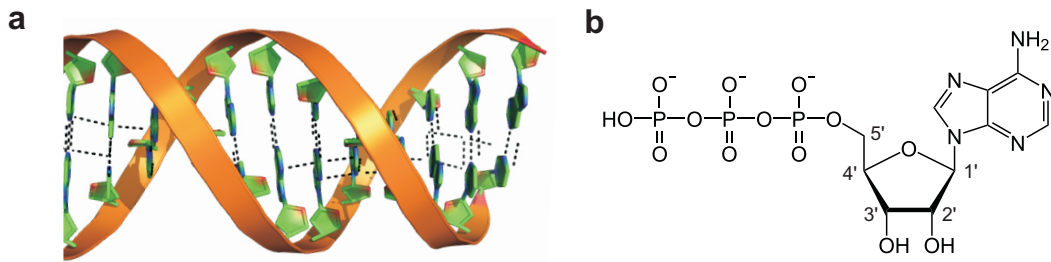


Abbildung 2.4: Aufbau der DNA-Doppelhelix. (a) Ausbildung von Wasserstoffbrücken (gestrichelte Linien) zwischen beiden antiparallel hybridisierten Einzelsträngen. Simulation mittels `make na-server` und PyMOL [Schrödinger, 2010]. (b) Adenintriphosphat (ATP) als Repräsentant eines Nucleotids. Bei physiologischem pH sind die Phosphorsäurereste teilweise deprotoniert.

serstoffbrücken (Abb. 2.4a) in antiparalleler Anordnung zu einer Helix hybridisieren. Jeder Einzelstrang ist ein Polymer, das durch Polykondensation einzelner Monomere entsteht.

Diese von LEVENE benannten Nucleotide (NT) setzen sich aus drei Einheiten zusammen: i) einem Molekül Mono-, Di- oder Triphosphorsäure, ii) einem Pentose-Molekül und iii) einem Molekül einer stickstoffhaltigen, heterocyclischen Base. In den natürlich vorkommenden NAs sind die fünf Nucleobasen Guanin, Adenin, Cytosin, Thymin und Uracil vertreten, die sich unter Abspaltung von Wasser mit der Pentose des Nucleotids verbinden. Die Verknüpfung erfolgt dabei zwischen der Hydroxygruppe des Pentose-C-1-Atoms und eines Wasserstoff-Atoms der Base. Die Verbindung aus Pentose und Base heißt Nucleosid. Durch Veresterung der Hydroxygruppe des Pentose-C-5-Atoms mit einer Mono-, Di- oder Triphosphorsäure ergibt sich ein vollständiges Nucleotid (Abb. 2.4b).

Neben der von WATSON und CRICK beschriebenen DNA existiert noch eine zweite natürliche Form der Nucleinsäure, die Ribonucleinsäure (RNA). Diese unterscheidet sich sowohl strukturell als auch funktionell von ihrem bekannterem Gegenstück. Anders als DNA dient die RNA u.a. als Signalüberträger und liegt in der natürlichen Form als Einzelstrang vor. Ein markanter Unterschied ist durch die Ausprägung der Pentose der Nucleotide gegeben. Während die NT der β -D-Ribonucleinsäure die β -D-Ribose als Monosaccharid enthalten, ist die Pentose der 2-Desoxy- β -D-Ribonucleinsäure in Form der 2-Desoxy- β -D-Ribose vorliegend. Ein weiteres Unterscheidungskriterium liegt in dem Vorkommen der verschiedenen Basen der Nucleotide, da in jeder der zwei NAs nur jeweils vier der fünf Basen vertreten sind. In der DNA sind dies Guanin (G), Adenin (A), Cytosin (C) und Thymin (T); in RNA sind die vier Basen G, A, C, und Ura-

cil (U) enthalten. Im Verlauf der Hybridisierung bilden jeweils die Purinbasen durch Wasserstoffbrücken eine spezifische Paarung mit den Pyrimidinbasen, d.h. im Fall der DNA G:C und A:T, in RNA Molekülen G:C und A:U.

Über strukturelle Abweichungen hinaus besteht ein großer Unterschied zwischen beiden NAs in ihrer Funktion. Die RNA spielt hauptsächlich für die Regulation verschiedener Prozesse der Zellphysiologie eine Rolle. Weiter dient diese Form der NA als Signalüberträger bei Translation und Transkription. Dabei werden genetische Informationen von der Matrize der DNA abgelesen und für den Prozess der Proteinsynthese bereitgestellt. Der Replikationscode für die Synthese von Polypeptiden aber auch der für die Zusammensetzung der RNA ist auf der DNA in Form von Codons hinterlegt. Ein Triplet dreier aufeinanderfolgender Nukleobasen codiert in diesem Sinne eine definierte Aminosäure. Die Codierung der gesamten genetischen Information eines Lebewesens basiert also auf der individuellen Abfolge unterschiedlicher DNA-Sequenzen, bestehend aus den vier verschiedenen Nukleotid-Untereinheiten, die über Phosphodiesterbindungen linear zu einem langem Polymer verknüpft sind.

Als es 1961 dem deutschen Biochemiker HEINRICH MATTHAEI gelang die Mechanismen dieses Prinzips zu identifizieren, war der Grundstein zur Entschlüsselung des genetischen Codes gelegt. Aufgrund der Universalität des Codes eröffnete sich in den darauf folgenden Jahren das Feld der Gentechnik. Mit Hilfe der 1975 von FREDERICK SANGER entwickelten Didesoxymethode zur DNA-Sequenzierung konnten von nun an ganze Genome entschlüsselt werden [Sanger et al., 1977]. Neuste Sequenzierungsmethoden der dritten Generation ermöglichen dabei sogar die Entschlüsselung in Echtzeit, z.T. ohne vorherige Vervielfältigung der DNA mittels PCR [Liu et al., 2012]. Infolge der vielen Möglichkeiten konnten bis dato umfangreiche molekularbiologischen Datenbanken mit zahlreichen Genomen aufgebaut werden, mit deren Hilfe sich organismen-spezifische Gensequenzen identifizieren lassen.

2.2.2 Spezielle Formen und Strukturen

Neben den zwei natürlich vorkommenden NAs konnten in der Vergangenheit verschiedenste Arten von NAs künstlich hergestellt werden. Die Zahl der unterschiedlichen Formen ist recht groß, da über kleine Modifikationen hinaus alle Grundbestandteile ausgetauscht und gegen synthetische Einheiten ersetzt werden können. Die meisten Variationen bestehen in einer Veränderung des Rückgrates aber auch neuartige Nukleobasen mit veränderter Spezifität können zum Einsatz kommen. Vorteile dieser Modifikationen drücken sich z.T. durch

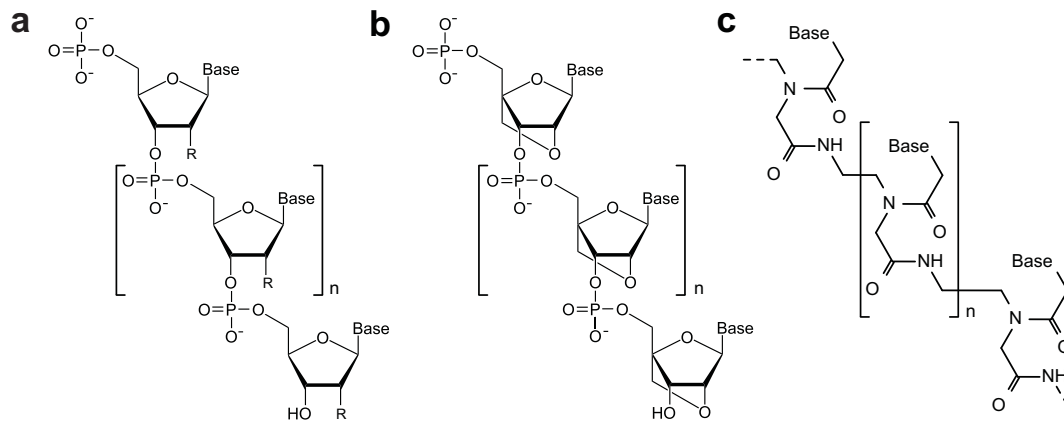


Abbildung 2.5: Zusammensetzung des Rückgrates der gängigsten Nukleinsäuren. (a) DNA/RNA, R = OH für RNA, R = H für DNA. (b) LNA, (c) PNA.

Resistenzen gegenüber Nukleasen oder einem veränderten Verhalten bezüglich der Basenpaarung oder Basenstapelung aus.

Entgegen der ursprünglichen Annahme des Modells von WATSON und CRICK weiß man aus neuen Untersuchungen, dass die Art der Basenstapelung und nicht die spezifische Basenpaarung zum Großteil die Stabilität des Doppelstrangs bestimmt [Yakovchuk et al., 2006]. Durch Modifikationen des Nukleotidrückgrats lässt sich die Position der Nukleobasen zueinander und somit die Ausprägung der Helixwindung beeinflussen. Dies führt zu verstärkten Interaktionen zwischen benachbarten Nukleobasen und folglich zu einem verändertem Stapelverhalten. Mögliche Modifikationen des Rückgrats können in diesem Zusammenhang eine Manipulation der Struktur der Pentose betreffen, wie es im Fall der LNA⁶ gegeben ist, oder aber durch Substitution des vollständigen Pentose-Phosphat-Komplexes erfolgen. PNA⁷ beispielsweise besitzt ein durchgängig synthetisches Rückgrat, aufgebaut aus einzelnen Aminoethylglycin-Einheiten. Abbildung 2.5 verdeutlicht den Unterschied im Aufbau beider synthetisch erzeugten NAs zu dem der natürlichen Nukleotide.

2-Desoxy- β -D-Ribonukleinsäure (DNA)

In der natürlichen B-Form der Doppelhelix sind beide Einzelstränge polar und antiparallel ausgerichtet, während die helikale Windung einer rechtsgewand-

⁶engl.: Locked Nucleic Acid

⁷engl.: Peptide Nucleic Acid

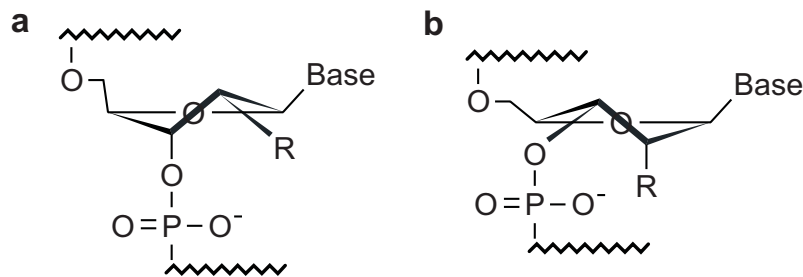


Abbildung 2.6: Konformationen der Pentose (Furanose). (a) S-Typ (C2'-endo-) Konformation wie sie in B-Helices vorliegt. (b) N-Typ (C3'-endo-) Konformation, gegeben in A-Helices. R = OH für RNA, R = O für DNA.

ten Drehung folgt. Die Nukleobasen stehen dabei planar zueinander und sind durch die C2'-endo-Konformation der Pentose annähernd senkrecht zur Achse des Doppelstrangs innenseitig angeordnet. Durch die Länge einer Helixwindung um 360° von 34 \AA mit 10 Basenpaarungen ergibt sich ein Durchmesser von 20 \AA . Auch wenn dies unter physiologischen Bedingungen die natürliche Form der Helixstruktur ist, kann es unter anderen Verhältnissen zu abweichenden Ausformungen der Doppelstrangkongformation kommen. Die A-Form beispielsweise entsteht durch Dehydrierung des DNA-Duplex und ist typisch für RNA-Doppelstränge. Durch die C3'-endo-Konformation des Zuckers (Abb. 2.6) ergibt sich eine Krümmung des Nukleotidrückgrats (Abb. 2.7a), die Basen stehen dadurch in einem 20° Winkel zur Achse des Doppelstrangs. Der größere Neigungswinkel führt zu einer leichten Stauchung der Helix, wodurch sich die große Furche etwas verengt und eine leicht schräge Oberfläche annimmt. Weiter sind ein größerer Durchmesser (ca. 23 \AA) und eine erhöhte Anzahl der Basenpaare pro Windung (im Schnitt 0,5 gegenüber der B-Form) die Folge.

Locked Nucleic Acid (LNA)

Die Struktur der LNA beruht auf einer geringfügigen Modifikation der Pentose des Nukleotidrückgrats. Durch eine zusätzliche Methylenbrücke zwischen dem 2'-Sauerstoff und dem 4'-Kohlenstoff wird das Monosaccharid in seiner C3'-endo-Konformation (N-Typ) verankert. Da sich dadurch eine Fixierung des Rückgrats des Polynukleotids ergibt, resultiert hieraus auch die Bezeichnung der NA. Grundlage für diese Art der Modifikation des Furanose-Rings schafften SINGH und OBIKA [Singh et al., 1998; Obika et al., 1998] durch erste N-Typ-Verankerungen an Ribo- und Desoxyribonukleotiden. Diese N-Typ-Konformation ermöglicht die Ausformung entropisch bevorzugter A-Helix-Geometrien mit kom-

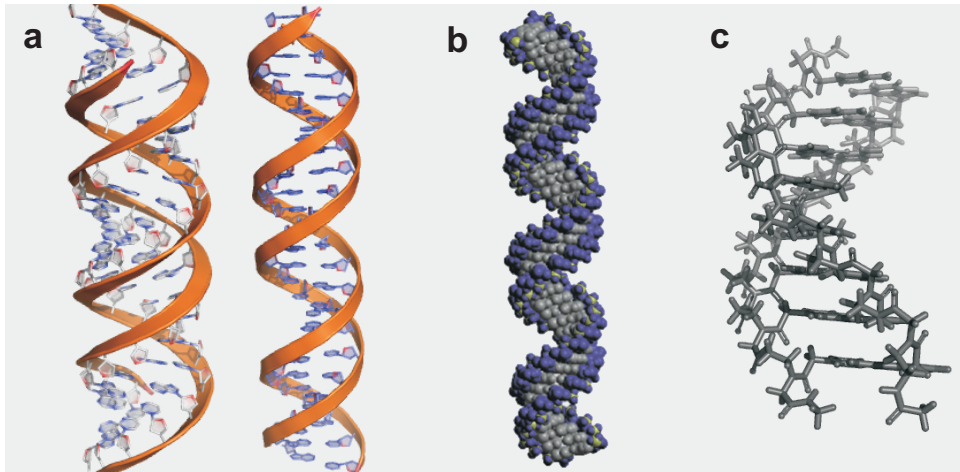
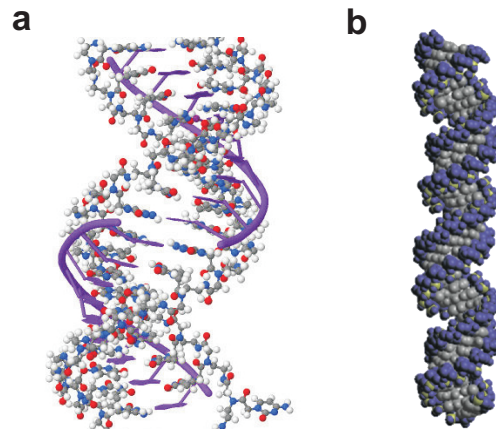


Abbildung 2.7: Helixstrukturen der gängigsten Nukleinsäuren. (a) DNA Duplex, links: A-Form, rechts: B-Form. Simulation von Fänger 6 mit der entsprechenden Sequenz der tDNA (siehe Tabelle 3.1) mittels `make na-server` und PyMOL. (b) LNA Duplex [Eichert et al., 2010]. (c) PNA Duplex, Simulation mit PyMOL (2K4G.pdb).

plementären DNA- und RNA-Fragmenten. Die Helix weist eine rechtsläufige Windung der antiparallel orientierten Einzelstränge auf, die durch WATSON-CRICK-Basenpaarung miteinander verbunden sind. Der reine LNA-Doppelstrang zeigt eine leichte Abschwächung der Helix-Windung (Abb.2.7b) bei gleichzeitiger Streckung; dies führt zu einer Anzahl von 14 Basenpaaren je Windung und einer vergleichend zu RNA verbreiterten zentralen Lücke zwischen beiden Strängen. Diese beträgt 39 Å für $(\text{LNA})_2$ - und 29 Å für $(\text{RNA})_2$ -Komplexe. Eine weitere Folge ist die Vergrößerung der großen Furche auf 24 - 25 Å und einer Verkleinerung der kleinen Furche auf 15 Å [Eichert et al., 2010]. Die Struktur solcher LNA:LNA-Duplices lässt sich somit weder der A- noch der B-Form der natürlichen Helices zuordnen. Im Vergleich dazu besitzen A-Form-Doppelstränge der RNA einen Durchmesser von 16 Å für die große und 19 Å für den der kleinen Furche. Chimären aus LNA und RNA zeigen eine Zwischenform aus reiner B-Form und der des LNA:LNA-Doppelstrangs (Abb. 2.8b). In den meisten Anwendungen werden allerdings DNA-Oligonukleotide mit vereinzelt LNA-Modifikationen benutzt. Dazu werden einzelne Nukleoside mit LNA-Nukleosiden substituiert. In einer solchen Konfiguration beeinflussen LNA-NT benachbarte DNA-NT, die dadurch ebenfalls eine N-Typ-Konformation annehmen [Petersen et al., 2000]. Die so gearteten Chimären weisen eine stark erhöhte Stabilität gegenüber reinen DNA:DNA-Doppelsträngen auf [McTigue et al., 2004].

Abbildung 2.8: NA-Chimären. (a) DNA:(PNA)₂-Triplex (1PNN.pdb). Die DNA:PNA-Doppelhelix, bestehend aus einem DNA-Polypurinstrang und einem PNA-Polypyrimidinstrang, zeigt eine Mischung aus A- und B-Helix. In der großen Furche der Doppelhelix lagert sich der zweite PNA-Strang durch HOOGSTEEEN-Paarung an. (b) RNA:LNA-Duplex (46 bp, abgewandelt von 1H0Q.pdb) [Eichert et al., 2010].



Peptid-Nukleinsäure (PNA)

PNA [Nielsen et al., 1991] ist eine künstliche Nachbildung einer NA, deren Rückgrat durch Polymerisation von Pseudopeptiden mittels Amidbindung aufgebaut wird. Der Name dieser synthetischen Form der NA ist ein wenig irreführend, da die einzelnen PNA-Moleküle im chemischen Sinne weder aus Säuren noch aus natürlichen Peptiden bestehen. Zutreffender für diese Chimäre aus Nucleobasen und Pseudopeptiden ist daher die Bezeichnung Polyamid-Nukleinsäure-Analogon⁸ [Nielsen et al., 1994]. Die Nucleotide bestehen dabei aus N-(2-Aminoethyl)glycin-Bausteinen, deren Stickstoff des Glycins durch eine Methylene-Carboxyl-Verbindung mit den Nucleobasen verknüpft ist (Abb. 2.5c).

Die Doppelhelix eines PNA-Duplex' besteht aus 18 Basenpaaren je Windung und ist damit vergleichend zur A- oder B-Form der natürlichen NAs stark gestaucht, ausgedrückt in einem relativ großen Durchmesser von 28 Å. Durch spezifische WATSON-CRICK-Basenpaarung bildet PNA Doppelhelices mit DNA- und RNA-Oligomeren aus. Aufgrund der Achiralität der PNA können dabei DNA- und RNA-Einzelstränge sowohl in paralleler als auch in antiparalleler Ausrichtung hybridisieren. Bei paralleler Anordnung der Komplemente ist die thermische Stabilität des Duplex' vergleichbar zu der des entsprechenden DNA:DNA- bzw. RNA:RNA-Konstrukts, bei antiparalleler Orientierung ist die Schmelztemperatur stark erhöht [Egholm et al., 1993]. Aufgrund der enormen Abweichung der natürlichen PNA-Duplexstruktur von der A-Form der DNA ist die NIELSEN-PNA allerdings trotz der effizienten DNA- und RNA-Bindung nicht für diese Art der Duplex-Bildung optimiert [Nielsen and Haai-

⁸engl.: polyamide nucleic acid analogue

ma, 1997]. Eine besondere Eigenschaft der PNA ist die Möglichkeit zur Bildung von $(\text{PNA})_2\text{:DNA}$ -Triplexen. Ursprünglich zu diesem Zweck entwickelt [Nielsen et al., 1994], ist PNA in der Lage durch HOOGSTEEEN-Basenpaarung in der großen Furche eines Doppelstrangs eine Dreifach-Helix auszubilden (Abb. 2.8a).

3 Material und Methoden

3.1 Ensemble Spektroskopie

3.1.1 Absorptionsspektroskopie

Zur Bestimmung und Kontrolle der Konzentrationen sowie des Reinheitsgrads der Reporter-Fragmente wurden zwei Standard-UV/VIS-Photometer (Lambda 25, Perkin Elmer und V-650, Jasco) in Kombination mit 500 μ L Quarzglasküvetten (Hellma) benutzt. Mit diesen wurden ebenfalls die Absorptionsspektren der Farbstoffe und die Transmissionsspektren der Detektionsfilter und des dichroitischen Strahlteilers aufgenommen. Die Bestimmung der Konzentration des HaloTagH-tubulin G1 Vektor-Konstrukts wurde mittels eines Nanophotometers (P-300, Implen) durchgeführt.

3.1.2 Emissionsspektroskopie

Zur Charakterisierung der Bindung des Hairpins wurde eine zeitabhängige Messung der Fluoreszenz vorgenommen. Dazu wurde ein Standard-Fluoreszenzspektrometer (Cary Eclipse, Varian) benutzt.

3.2 Fluoreszenz Mikroskopie

3.2.1 Das wissenschaftliche Fluoreszenzmikroskop

Fluoreszenzmikroskopischer Aufbau (I):

Strahlengang des Anregungswegs

Das kohärente Licht (640 nm) der Anregungsquelle (Diodenlaser, Glasfasergekoppelt, 75 mW; Coherent) wurde durch Einsatz eines Z647/10 Breitbandfilters selektiert. Die Anregungsleistung wurde mittels eines kontinuierlichen

Dichtefilter-Rads (Newport) eingestellt. Zur Homogenisierung des Strahlprofils wurde eine Glasfaser (Thorlabs) benutzt. Der Laserstrahl wurde in epimikroskopischer Anordnung auf die hintere Fokalebene des Objektivs fokussiert, um eine möglichst parallele Weitfeld-Ausleuchtung zu erzeugen.

Das Mikroskop

Zur Fixierung und Bestrahlung der Beadproben wurde ein inverses Mikroskop (Olympus IX70), ausgestattet mit einem Öl-Immersionsobjektiv hoher Numerischer Apertur (Olympus Plan Apo N) benutzt. Die Einkopplung des Anregungslichts erfolgte über einen Dualband-Strahlteiler (Semrock Brightline, FF 497/661-Di01-25x36).

Strahlengang des Detektionswegs

Das Fluoreszenzlicht wurde mit dem obigen Objektiv aufgefangen und mittels des dichroitischen Strahlteilers vom Anregungslicht separiert. Über eine Kombination zweier Detektionsfilter (ET 700/75 M, 647 Razor Edge Langpassfilter) erfolgte die spektrale Selektion des Emissionslichts vor Fokussierung auf der CCD Kamera (CoolSnap HQ, Roper Scientific).

3.2.2 Das miniaturisierte Fluoreszenzmikroskop

Fluoreszenzmikroskopischer Aufbau (II):

Strahlengang

Das kohärente Licht (640 nm) der Anregungsquelle (Diodenlaser Glasfasergekoppelt, 75 mW, Coherent) wurde durch Einsatz eines Kollimators (MB04 Focusing Collimator, Qioptiq) aufgeweitet und kollimiert (Abb.: 3.1). Ein Z647/10 Breitbandfilter diente der Selektion der Wellenlänge. Der Laserstrahl wurde über einen Dualband-Strahlteiler (560/659, AHF) in epimikroskopischer Anordnung auf die hintere Fokalebene des Luft-Objektives (Tubuslänge ∞ -korrigiert, 40x; Olympus) fokussiert. Nach Aufsammeln des Fluoreszenzlichts mittels des Objektivs und Transmission durch den dichroitischen Strahlteiler wurde die Detektionswellenlänge durch einen Bandpass-Filter (700/75, AHF) selektiert und auf die CCD Kamera (Pixelfly VGA, PCO) fokussiert.

Erweiterung des Aufbaus zur Zweifarbanddetektion

Die Laserlinie der grünen Anregungsquelle (DPSS Laser, 532 nm, 80 mW; Laserworld) wurde durch einen Anregungsfilter (ZET532/10, AHF) spektral aufgereinigt, über einen dichroitischen Strahlteiler (LaserMUX 514-543R, AHF) in den Strahlengang eingekoppelt und mit der roten Anregungslinie überlagert. Zur Selektion der Emissionswellenlänge wurde ein zusätzlicher Bandpass-Filter (HC 582/75 BrightLine, AHF) in das System verbaut.

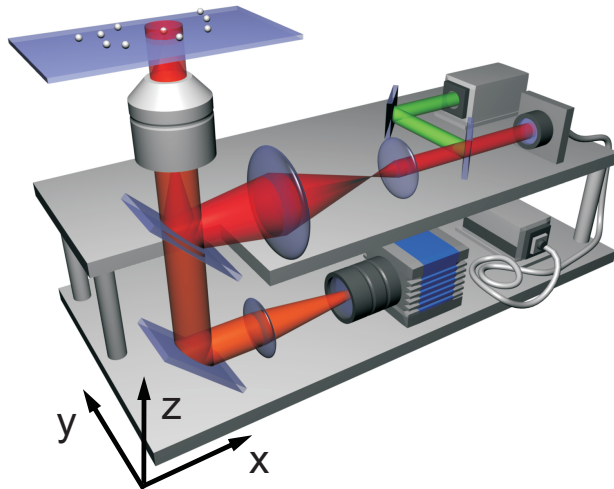


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Strahlengangs des miniaturisierten Aufbaus (II). Der Funktions-Prototypen der fluoreszenzmikroskopischen Einheit des POCT-Geräts konnte mit den Außenmaßen von $x=50$ cm, $y=30$ cm und $z=35$ cm realisiert werden. Die Miniaturisierung des wissenschaftlichen Aufbaus (I) führt zu einer Kostenersparnis von ca. 65 - 70 k Euro gegenüber dem High-End-Gerät.

3.3 Datenanalyse

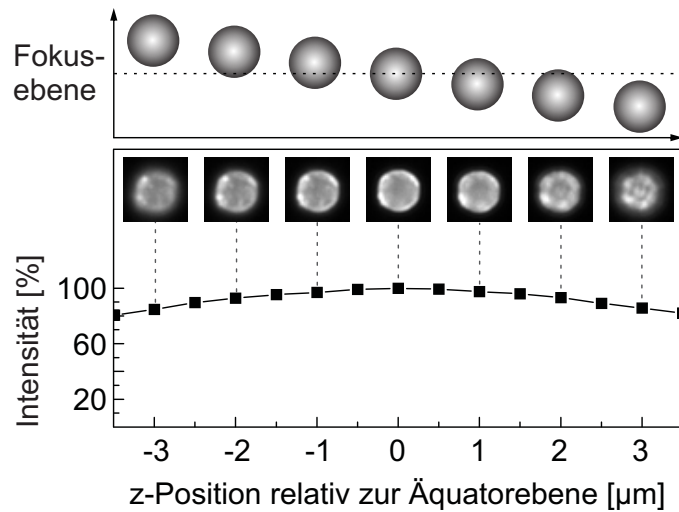
3.3.1 Datenaufnahme

Nach erfolgter Durchführung der Waschprozedur der Mikropartikel wurden die Probelösungen zu jeweils 10 μL in 1536 Well-Plates (Greiner bio-one, cat.-no. 783856) überführt und auf dem entsprechenden fluoreszenzbasierten Detektionssystem bei einer Anregungswellenlänge von 640 nm vermessen. Die Verwendung der Art des fluoreszenzmikroskopischen Systems sowie Details zu den Parametern des Bildgebungsprozesses sind in Tabelle 3.4 für jedes Experiment einzeln aufgelistet.

Einfluss der Fokus-Position auf den Intensitätsmittelwert

Da die Bestimmung der Abbildungsebene der Proben (Beads) auf dem fluoreszenzmikroskopischen Aufbau (I) sowie bei dem miniaturisierten Funktions-Prototypen (II) nicht automatisiert implementiert ist, wurde das Scharfstellen des Beadäquators per Hand durchgeführt. Die Genauigkeit dieser manuellen Methode ist dabei nicht gleichsam präzise wie beispielsweise die Anwendung eines Schrittmotors, verbunden mit dem axialen Trieb des Probenstisches. Um für diesen Prozess die Auswirkungen geringfügiger Änderungen der Position des Objektivs auf den Intensitätsmittelwert zu evaluieren, wurde eine Analyse des Zusammenhangs der Position der Abbildungsebene und der Beadintensitäten untersucht. Abbildung 3.2 verdeutlicht, dass sich durch relevante Variationen

Abbildung 3.2: Abhängigkeit der mittleren Fluoreszenzintensität von Variationen der Fokustiefe. 4,8 μm Beads (Varian) wurden homogen mit dem Fluorophor ATTO 647N beschichtet und in 500 nm Schritten axialer Richtung auf dem fluoreszenzmikroskopischen Aufbau (II) abgebildet.



der Fokalebene nur geringe Auswirkungen auf die mittlere Fluoreszenzintensität der Beads ergeben. So führt eine Veränderung zwischen 0 und $\Delta 3 \mu\text{m}$ zu einer Abnahme von nur 15 %. Viel ausschlaggebender ist allerdings die Variation zwischen 0 und $\Delta 1 \mu\text{m}$: Die in Abbildung 3.2 eingefügten Fluoreszenzbilder eines Beads an der entsprechenden Position zeigen die Veränderung der Kontrastschärfe an der Außenkante der Beads. Hier ist bereits mit bloßem Auge erkennbar, dass diese sich für Abweichungen von $\Delta 1 \mu\text{m}$ verändert. Auch der Durchmesser des Abbilds eines Beads ändert sich oberhalb beziehungsweise unterhalb der beschriebenen Abweichung. Da die Größe eines der Hauptkriterien während der Selektion geeigneter Beads im Rahmen der Bildverarbeitung ist, führt dies dazu, dass alle Beads in Abweichung von mehr als einem Mikrometer von der Abbildungsebene des Objektivs verworfen und nicht zur Bildung des Mittelwerts herangezogen werden. Die Betrachtung der Intensitätsvariation des Mittelwerts zwischen einer z-Position von 0 und $\Delta 1 \mu\text{m}$ zeigt eine Abnahme von nur 3 % der Maximalintensität ($0 \mu\text{m}$) auf; der Einfluss der Fokus-Position des Objektivs ist somit vernachlässigbar.

3.3.2 Bildverarbeitung

Zur Automatisierung des Bildverarbeitungsprozesses nach individuellen Kriterien wurde ein Java-basiertes Fiji-Makro entwickelt. Fiji ist eine Paketsammlung basierend auf dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ [Abràmoff et al., 2004; Collins et al., 2007; Schneider et al., 2012]. Dieses Makro kann unter jedem Betriebssystem verwendet werden und ist durch seine hohe Modularität

aufgrund des Pluginkonzepts beliebig erweiterbar; durch die offene Programmierschnittstelle (API¹) von **ImageJ** ist die Einbindung vorhandener Prozesse der Bildverarbeitung ohne großen Aufwand durchführbar. Der Prozess der Bildverarbeitung besteht aus vier grundlegenden Hauptroutinen, die im Folgenden erläutert werden.

Bestimmung des Maximums des Anregungsprofils

Die Grundlage zur Identifikation der Koordinaten des Maximums des Anregungsprofils innerhalb des abgebildeten Bildausschnitts (FOV²) ist ein Fluoreszenzbild einer homogenen Farbstofflösung. Ein solches dient der Kalibrierung des Vorgangs der Bildverarbeitung und ist vor Aufnahme der Beads aufzunehmen. Nach Konvertierung in 8-bit Graustufen wird dieses Bild durch Angleichung eines jeden Bildpunktes an den Durchschnittswert der 3×3 Nachbarpixel geglättet. Durch Setzen eines Grenzwerts³ für die Darstellung der Graustufen-skalierung auf 240 bis 255 (für [ATTO 647N] = 1 nM) kann der Bereich des Maximums eingegrenzt werden. Die Funktion „Particle-Finder“ (Parametrisierung: Size = 100-infinity, Circularity = 0,3-1) liefert die genauen Koordinaten des Zentrums.

Extraktion der Beadkoordinaten und Berechnung des Vektors

Die unterschiedlichen Fluoreszenzbilder der Beadproben werden in einem Batch-Prozess nacheinander geladen und einzeln prozessiert. Nach Konvertierung in 8-bit Graustufen und einer Weichzeichnung wird wiederum die Funktion „Particle-Finder“ aufgerufen. Die Parametrisierung zur Identifikation der Beads erfolgt dabei abhängig von der Größe der Mikropartikel. Die unterschiedlichen Parameter können im Header des Makros initiiert werden und sind typischerweise abhängig von der Pixelgröße der Aufnahme (hier ca. 216 nm/Pixel). M-280: Size = 100-500 Pixel, Circularity 0,9-1; Varian: Size = 300-700, Circularity 0,7-1; CM01N: Size = 900-1500, Circularity 0,7-1. Die Vorgabe einer Größe selektiert an dieser Stelle auswertbare Beads durch Unterscheidung von möglichen Artefakten oder Bead-Aggregaten in den Bildern. Als zusätzliches Unterscheidungskriterium dient die Zirkularität für den seltenen Fall einer identischen Artefaktgröße. Eine Zirkularität $> 0,7$ sorgt weiter für die Auswahl von Beads

¹engl.: Application Programming Interface

²engl.: Field of View

³engl.: Threshold

die keine Verwischungen zeigen, da diese keine repräsentativen Intensitäten aufweisen (siehe Abb. 4.4, Seite 47).

Die Tabelle der Koordinaten wird für jedes Bild separat mit dem Namenspräfix „Coordinates-“ als Textdatei gespeichert. Durch Kenntnis der Koordinaten des Maximums des Anregungsprofils sowie der Koordinaten der Partikel kann anschließend für jeden Bead der Betrag des Vektors von der Koordinate des Anregungsmaximums zu seiner entsprechenden Position bestimmt werden. Dieser Wert wird ebenfalls in einer Tabelle den entsprechenden Beadkoordinaten zugeordnet. Da Beads am äußeren Rand des FOV abgeschnitten sein können, ist weiter die Möglichkeit auf Festlegung einer ROT⁴ durch Initialisierung im Header gegeben. Beads außerhalb dieser Region werden für den weiteren Verarbeitungsprozess verworfen.

Bestimmung der Beadintensitäten

Auch hier werden die Bilder der Beads durch Anwendung eines Batch-Prozesses sukzessiv prozessiert. Vor der Ermittlung der Intensitätswerte wird von den Fluoreszenzbildern das geglättete Bild einer Dunkelaufnahme subtrahiert. Dies geschieht, um eventuelle Abhängigkeiten vom Raumlicht, hervorgerufen durch unzureichende Abdunklung des Detektionsstrahlengangs des Fluoreszenzmikroskops, auszuschließen. Durch Abrufen der Koordinaten der einzelnen Beads aus der zuvor hinterlegten Tabelle kann nun mittels des „ROI⁵-Managers“ eine Auswahl um die Partikel gelegt und die mittlere Intensität der Mikropartikel bestimmt werden. Die Werte werden ebenfalls in der bild-spezifischen Tabelle aufgenommen und den Vektoren der entsprechenden Beads zugeordnet. Das Bild mit den Auswahlen der durchnummerierten Partikel wird zur Möglichkeit einer manuellen Sichtkontrolle im Tiff-Format gespeichert.

Korrektur der Beadintensitäten

Die unkorrigierten Beadintensitäten können als Funktion des Betrags des Vektors in ein Koordinatensystem übertragen werden. Wegen der exakten Symmetrie des Anregungsprofils infolge der Benutzung einer Glasfaser zur Laserauskopplung besteht die Möglichkeit, die Verteilung der Beadintensitäten mittels eines halbseitigen zweidimensionalen Gauß-Modells zu approximieren (siehe

⁴engl.: Region of Trust

⁵engl.: Region of Interest

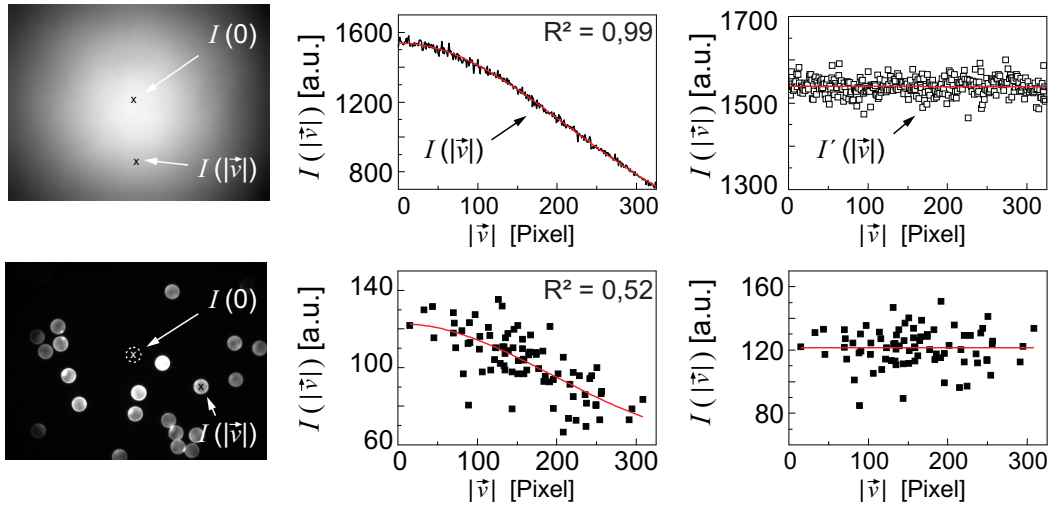


Abbildung 3.3: Prozess der Profilkorrektur. (**Oben**) homogene Farbstofflösung, (**unten**) Beadprobe, (**links**) Fluoreszenzbilder, (**mitte**) Approximation der Intensitäten durch die Rodbard-Funktion, (**rechts**) normierte Intensitäten. Das R^2 von 0,99 (mitte oben) verdeutlicht die Eignung der Rodbard-Funktion zur Beschreibung des Systems. Durch die breite Verteilung der Beadintensitäten, beispielsweise infolge von Variationen der Bindung mit DNA, ergibt sich ein typisches R^2 von 0,52 für die Werte einer Beadprobe (mitte unten).

Abb.3.3). Dazu wurde zur Vereinfachung die Rodbard-Funktion als Modell eines sigmoidalen Kurvenverlaufs herangezogen:

$$I(|\vec{v}|) = a + (b - a) \cdot e^{-\frac{(x-x_c)^2}{2 \cdot c^2}} \quad (3.1)$$

Das Zentrum der Funktion (x_c) muss dabei gleich 0 gesetzt werden, da sich an dem Punkt das Zentrum des Anregungsprofils $I(0)$ befindet. Anhand dieses Modells kann der Verlauf des Intensitätsabfalls vom Zentrum zu den Außenbereichen eines Fluoreszenzbildes identifiziert werden, ohne dafür ein Bild des Anregungsprofils heranziehen zu müssen. Dadurch lässt sich das Verhältnis der Beadintensität (I) am Maximum des Anregungsprofils $I(0)$ zu der Intensität eines Mikropartikels an der Stelle $I(|\vec{v}|)$ bestimmen. Der reziproke Wert des resultierenden Korrekturfaktors c_f beschreibt den Intensitätsverlust der mittleren Beadintensität, hervorgerufen durch eine dem Anregungsprofil entsprechende Verminderung der Anregungsleistung an der Position des Beads. Es gilt:

$$c_f = \frac{I(0)}{I(|\vec{v}|)} \quad (3.2)$$

Die unkorrigierte Intensität eines Beads kann somit durch diesen Faktor angepasst und auf die extrapolierte Beadintensität im Zentrum des Anregungsprofils normalisiert werden. Der korrigierte Wert der Beadintensität an der Stelle ($|\vec{r}|$) ist folglich durch

$$I'(|\vec{r}|) = I(|\vec{r}|) \cdot c_f \quad (3.3)$$

gegeben.

Verwerfung von Ausreißern

Die Intensitätswerte der Beadfluoreszenz können in Extremfällen stark abweichen. Ist beispielsweise die Funktionalisierung der Beschichtung beschädigt, können keine Ziel-Fragmente auf der Oberfläche binden; die Konsequenz ist eine drastische Verringerung der Intensität des Fluoreszenzsignals. Im umgekehrten Fall kann es zum Teil auch zu Aggregaten von Reporterfragmenten auf den Beads kommen. In beiden Fällen ist mit einer großen Abweichung vom repräsentativen Intensitätsmittelwert zu rechnen. Beads mit Abweichungen um mehr als $2,58 \sigma$ ($\cong 1 \%$ der Verteilung) werden als Ausreißer deklariert und nicht für die Darstellung der Daten herangezogen.

3.3.3 Darstellung der Daten

Für jedes Experiment werden die korrigierten Intensitätsmittelwerte der Beads der unterschiedlichen Fluoreszenzbilder zu einer Stichprobe zusammengefügt. Das entspricht für Stichprobenumfänge von $n > 50$ Beads fünf bis zehn Bildern. Anschließend werden die Werte des arithmetischen Mittels der Stichproben in Abhängigkeit der Ziel-DNA-Konzentration aufgetragen, das Level der nicht-spezifischen Beadfluoreszenz der Blindprobe determiniert dabei die Nachweisgrenze und ist in den entsprechenden Abbildungen als gestrichelte Linie vermerkt. Bei unterschiedlichen Experiment-Komplexen unterliegt die Komposition der eingesetzten Assay-Oligonukleotide entsprechenden Abweichungen. So führt beispielsweise ein Wechsel des Farbstoffsystems zu einer Veränderung des nicht-spezifischen Signals. Die Zusammensetzung des Gesamtsignals der Beadfluoreszenz aus spezifischen und nicht-spezifischen Signal unterliegt folglich erheblichen Variationen mit der Folge einer Verschiebung der Intensitätsmittelwerte.

Wegen der Schwierigkeit, Einflüsse einer variierenden Probenpräparation auf die Sensitivität des Quantifizierungsverfahrens graphisch darzustellen, wurde das Verhältnis des spezifischen Fluoreszenzsignals (I_{spec}) zum unspezifischen Anteil (I_{unspec}) der Beadfluoreszenz als Parameter herangezogen. Da für das Gesamtsignal $I_{total} = I_{spec} + I_{unspec}$ gilt, ist die Detektionseffizienz γ demnach durch

$$\gamma = \frac{I_{total}}{I_{unspec}} = 1 + \frac{I_{spec}}{I_{unspec}} \quad (3.4)$$

definiert. Die Detektionseffizienz beschreibt also Bindungsvorgänge, die über dem Niveau des nicht-spezifischen Hintergrund detektiert werden und führt zu γ -Werten >1 für positive Ergebnisse. Dieser Wert wurde in graphischer Form als Funktion der Konzentration der Ziel-Fragmente aufgetragen und ermöglicht die Vergleichbarkeit unterschiedlicher Messreihen.

3.4 Benutzte Fragmente

Eine Übersicht aller in dieser Arbeit verwendeten DNA-Fragmente ist der Tabelle 3.1 zu entnehmen.

Assay Oligonukleotide

Alle Fänger- und Reporteroligonukleotide sowie die Hilfsfragmente wurden vom Hersteller IBA GmbH (Göttingen) synthetisiert und HPLC aufgereinigt. LNA modifizierte Fänger-Fragmente wurden von ATDBio (School of Chemistry, University of Southampton, Highfield Southampton, United Kingdom SO17 1BJ) bezogen und sind ebenfalls mittels HPLC gereinigt.

Ziel-Fragmente

Als Ziel-DNA wurden zwei unterschiedliche Fraktionen von Fragmenten ausgewählt. Zum einen wurden für erste Versuche zwei synthetische, einzelsträngige (ssDNA) Fragmente im Bereich von 119 bis 151 Nukleotiden (NT) zur Untersuchung der grundlegenden Zusammenhänge des bead-basierten Nachweisverfahrens benutzt. Andererseits wurde für die Prüfung der Möglichkeiten des Verfahrens unter realistischen Bedingungen der patientennahen Diagnostik (POCT⁶)

⁶Point-of-Care-Testing

ein praxistaugliches, 5 kbp langes doppelsträngiges (dsDNA) Modellfragment herangezogen. An diesem wurde das Verfahren im weiteren Verlauf optimiert.

Ziel-Fragment 1 (151 NT, ss- & dsDNA):

Dieses synthetische Fragment wurde kommerziell bezogen (IBA GmbH, Göttingen). Es beinhaltet eine kurze Sequenz des Glyoxalase/Bleomycin Resistenz-Gens des Organismus *Micrococcus luteus* und wurde vom Hersteller mittels HPLC aufgereinigt.

Ziel-Fragment 2 (119 NT, ssDNA):

Auch dieses synthetische Fragment wurde kommerziell bezogen (IBA GmbH, Göttingen). Es beinhaltet einen Teil der Penicillin bindenden Region des Proteins PBP 1a des Organismus *Streptococcus pneumoniae* und wurde um 19 NT verlängert. Diese Sequenz dient als Binderegion für das Fänger-Fragment in den ersten Versuchen.

Ziel-Fragment 3 (5 kbp, dsDNA):

Bei diesem Fragment handelt es sich um einen rekombinanten Plasmiden, der das vollständige Glyoxalase/Bleomycin Resistenz-Gen des Organismus *M. luteus* (GenBank: CP001628.1) enthält. Details zu der Vervielfältigung des Plasmiden in [Klamp et al., 2013].

Hintergrund-Nukleinsäuren (BgNA)

Bei BgNAs⁷ handelt es sich um 7,5 kbp lange, nicht-spezifische Hintergrund-Nukleinsäuren der Probe, die zum Test der Spezifität eingesetzt wurden. Diese sind gegeben durch ein HaloTagH-tubulin G1 Vektor-Konstrukt, das durch Anwendung einer Miniprep (NucleoSpinH Plasmid, Macherey-Nagel) aus *E. coli* extrahiert und mittels des Restriktionsenzym EcoRV (Thermo Scientific) linearisiert wurde. Anschließend konnten die Fragmente mit Hilfe des Gel-Extraktions-Kits QIAEX II (Qiagen) vom Verdauungspuffer aufgereinigt und deren Konzentration durch Adsorptionsspektroskopie (NanoPhotometer P-300, Implen) bestimmt werden.

⁷engl.: Background Nucleic Acid

Tabelle 3.1: Benutzte DNA-Fragmente und deren Nukleotid-Sequenzen. Allgemeine Übersicht.

Oligo Name	Oligo Länge [Nukleotide]	Sequenz von 5' nach 3'
Fänger 1	25 + 10	GATGATCACCAAGGACGGCGCCTCC AAAAAAAAAAAA
Fänger 2	30 + 10	TACCGGATGATCACCAAGGACGGCG CCTCCAAAAAAAAAAAA
Fänger 3	35 + 10	GCCACTACCGGATGATCACCAAGGA CGGCGCCTCCAAAAAAAAAAAA
Fänger 4	25 + 10	CCGGCGAGGAGTTCGGCCACTACC GAAAAAAAAAAAA
Fänger 5	19	TAGGGGGGGGGTAGGGGGG
Fänger 6	25	CCGGCGAGGAGTTCGGCCACTACCG AAAAAAAAAAAA
Reporter 1	25	CCGGCGAGGAGTTCGGCCACTACCG
Reporter 2	25	GGACCTTCACCGACTCCGGCGAGGA
Reporter 3	25	GATGATCACCAAGGACGGCGCCTCC
Reporter 4	35	ATTAAGGACCTTCACCGACTCCGGC GAGGATTAAT
Reporter 5	23	GGTCTACAACCTGGGATAGAGACC
Reporter 6	20	TTGAGACTTTGAATAAGGTC
Reporter 7	25	AGCTCTCGCGGATGACCGGCGAGGA
Ziel-Fragment 1	151	GCGCCGCCACGGAGGCGCCGTCCT TGGTGATCATCCGGTAGTGGCCGAA CTCCTCGCCGGAGTCGGTGAAGGTC CAACCGAAAAGGGCCTCGTAGAAGG CCCGCTGGCGGGCGAAGTCGGGGGC GGTGTAGTCGATCCAGGCGGGGGAT C
Ziel-Fragment 2	119	GACCTTATTCAAAGTCTCAACGGCT GTGACATTTTCGTGATTGTTGAAGAG CATATTGCAGAGTAATATTACCGAA ATATGCTCTATCCCAGTTGTAGACA ATCCCCCCCCCATCCCCC
Hilfsfragment 1	15	GATCCCCCGCCTGGA
Hilfsfragment 2	25	TCGACTACACCGCCCCGACTTCGC
Hilfsfragment 3	25	CCGCCAGCGGGCCTTCTACGAGGCC
Hilfsfragment 4	25	CTTTTCGGTTGGACCTTCACCGACT
Hilfsfragment 5	25	GATGATCACCAAGGACGGCGCCTCC
Hilfsfragment 6	21	CGCCCCGCCCGCCGCGTGGAC

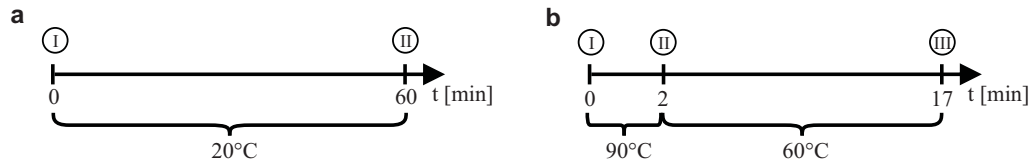


Abbildung 3.4: Grundsätzliches Schema der Probenpräparation. (a) Quantifizierung von ssDNA. I: Zugabe von Beads und detDNA, II: Waschen der Probe. (b) Quantifizierung von dsDNA. I: Zugabe von Hilfs-Fragmenten und detDNA, II: Zugabe von Beads, III: Waschen der Probe.

3.5 Probenzubereitung

3.5.1 Allgemeiner Teil

Wegen der Komplexität der Zusammenhänge des Einflusses kleiner Variationen in der Prozedur auf die Empfindlichkeit des Verfahrens wurden der Übersicht halber die Unterschiede der Zubereitung der Proben unterschiedlicher Experimente tabellarisch zusammengefasst (Tabelle 3.2 & 3.3). Folgende Basisprotokolle kamen dabei zum Einsatz:

Detektion einzelsträngiger Fragmente

$6 - 7 \times 10^3$ vorbeschichtete Beads wurden in 20 μL der Probelösung unterschiedlicher Ziel-Fragment-Konzentrationen gelöst. Als Puffer wurde PBS (1 M [NaCl], 0,05 % Tween20) benutzt. Nach Zugabe des Reporter Oligonukleotide wurden die Proben für eine Stunde unter Schütteln (700 rpm) bei 20 °C inkubiert und anschließend gewaschen. Eine Übersicht ist in Abb. 3.4 gegeben.

Detektion doppelsträngiger Fragmente

Die Probelösung (20 μL) mit Ziel-Fragmenten unterschiedlicher Konzentrationen wurde mit Hilfs-Fragmenten (10 μM) und detDNA versetzt. Nach einer Phase von zwei Minuten bei 95 °C wurden die Proben auf 60°C herabgekühlt und vorbeschichtete Beads hinzugegeben. Nach einer zweiten Inkubationsphase von 15 Minuten bei 60 °C wurden die Partikel gewaschen. Eine Übersicht ist in Abb. 3.4 gegeben.

Beschichtung der Beads mittels Biotin-Streptavidin Wechselwirkungen

$6 - 7 \times 10^5$ Streptavidin modifizierte Beads (Dynabeads M-280, Life Technologies, Kat. Nr.: 11205D) wurden in 100 μL PBS (0,05 % Tween20) gelöst. Zusammen mit biotinylierten DNA Fänger-Oligomeren (100 nM) wurden diese für 1,5 Std. bei 20 °C unter Schütteln (700 rpm) inkubiert. Anschließend wurden die Beads vier Mal mit 100 μL PBS gewaschen.

Beschichtung der Beads mittels Amidbindung

Neben der gesteigerten Haltbarkeit bezüglich der Aufbewahrung der Proben ist auch eine hohe Temperaturstabilität der Beadbeschichtung von großer Wichtigkeit. Wegen der Erhitzung der Proben auf 60 °C während Phase II (bezüglich dsDNA Detektion) sowie während des Waschvorgangs (betrifft einzelne Experimente, siehe Tabelle 3.2 & 3.3) ist die Anwendung des Streptavidin-Biotin Bindungssystems nicht möglich, da diese Bindung ab Temperaturen von 60 °C beeinträchtigt ist [Holmberg et al., 2005].

Die detaillierte Beschreibung des Protokolls zur Amidbindung der Beadbeschichtung ist in [Klamp et al., 2013] zu finden. Dabei wurde während des Beschichtungsprozesses die Dichte des Fänger-Fragments auf ca. 8×10^{12} Fragmente cm^{-2} eingestellt. Diese Dichte ist auch für andere Assay-Formate in der Literatur als optimal beschrieben [Peterson et al., 2001; Vainrub and Pettitt, 2002].

Waschen der Beads

Der Vorgang der Separation der Beads von der nicht gebundenen Fraktion der Nukleinsäuren wurde in allen Experimenten identisch durchgeführt: Die Beads wurden nach der Inkubationsphase mit einem Magneten auf dem Boden des Reaktionsgefäßes fixiert und der Überstand bis auf ein Restvolumen von 10 μL abgezogen. Anschließend wurden 100 μL PBS hinzugefügt, die Beadlösung kurz mit einer Pipette durchmischt und das Reaktionsgefäß für fünf Sekunden bei 1500 rpm geschüttelt. Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt; nach Vollendung des fünften Waschschriffs wurde der Überstand wiederholt auf 10 μL abgezogen.

3 Material und Methoden

Tabelle 3.2: Übersicht der Details der Probenpräparation. Auflistung nach der Seitenzahl der entsprechenden Abbildung. Nummerierung der Fragmente nach Tabelle 3.1. AB: Amidbindung, SA: Streptavidin, WT Temperatur des Waschpuffers. Die Inkubationszeit und -temperatur (letzte Spalte) bezieht sich auf Phase I der ssDNA- bzw. Phase II der dsDNA-Detektion. Die Konzentration des L6 Puffers beträgt jeweils 50 %.

Seite	Beads	Bead- bdg.	capDNA /tDNA	detDNA /Konz.	Label	Puffer	Ink.Zeit /Temp.	WT [°C]
48	M-280	Bio- SA	5 /ss 2	6 /0,1 µM	ATTO 647N	NaCl	60 min 20°C	20
58	M-280	Bio- SA	1, 2, 3 /ss 1	2 /1 µM	ATTO 647N	NaCl	60 min 20 °C	20
59	M-280	Bio- SA	1 /ss 1	1 & 2 /1 µM	ATTO 647N	NaCl	60 min 20 °C	20
61a1	Varian	AB	4 /ds 1	3 /1 µM	ATTO 647N	L6	15 min 60 °C	20
61a2	Varian	AB	6 /ds 1	3 /1 µM	ATTO 647N	L6	15 min 60 °C	20
63a	M-280	Bio- SA	1 /ss 1	1 /1 µM	ATTO 647N	NaCl	60 min 20 °C	20
63b	M-280	Bio- SA	5 /ss 2	6 /1 µM	ATTO 647N	NaCl	60 min 20 °C	20
65b	M280	Bio- SA	1 /ds 1	1 /1 µM	ATTO 647N	NaCl	60 min 20 °C	20
69	Varian	AB	4 /ds 3	3 & 7 /1 µM	var	L6	15 min 60 °C	60
71c1	M-280	Bio- SA	5 /ss 2	5 /1 µM	ATTO 647N	NaCl	60 min 20 °C	20
71c2	M-280	Bio- SA	5 /ss 2	6 /1 µM	ATTO 647N	NaCl	60 min 20 °C	20
75	M-280	Bio- SA	1 /ds 1	1 /1 µM	ATTO 647N	NaCl, L6	60 min 20 °C	20
76	Varian	AB	1 /ds 1	1 /1 µM	ATTO 647N	L6	60 min 20 °C	20
76	Varian	AB	1 /ds 3	1 /1 µM	ATTO 647N	L6	60 min 20 °C	20

Tabelle 3.3: Übersicht der Details der leicht modifizierten Probenpräparation. Auflistung nach der Seitenzahl der entsprechenden Abbildung. Nummerierung der Fragmente nach Tabelle 3.1. SA: Streptavidin, WT Temperatur des Waschpuffers. Die Inkubationszeit und -temperatur (letzte Spalte) bezieht sich auf Phase I der ssDNA- bzw. Phase II der dsDNA-Detektion. Die Konzentration des L6 Puffers beträgt jeweils 50 %.

Seite	Beads	Bead- bdg.	capDNA /tDNA	detDNA /Konz.	Label	Puffer	Ink.Zeit /Temp.	WT [°C]
50b	M-280	Bio- SA	5 /ss 2	6 /1 μ M	ATTO 647N	NaCl**	60 min 20 °C	20
50c	M-280	Bio- SA	1 /ds 1	1 / var	ATTO 647N	NaCl	60 min 20 °C *	20
72	M-280	Bio- SA	5 /ss 1	1 / var	ATTO 647N	NaCl	60 min 20 °C *	20

* Phase I während der Doppelstrangseparation modifiziert: Erhitzen der Probe für fünf Minuten auf 95 °C und anschließende sukzessive Kühlung auf 20 °C in Schritten von 1 °C/pro Minute.

** Erhöhte Salzkonzentration: 1M.

3.5.2 Einzelne Experimente

Verkürzung der Prozessierungsdauer

Bei diesem Experiment wurden die 151 bp langen Ziel-Fragmente wurden in 5 μ L L6 Puffer (50%) gelöst und auf 95 °C erhitzt. Parallel wurden 5 μ L Hilfsfragmenten (100 μ M), 5 μ L Reporter 3 (100 μ M), 0,5 μ L Tween20 (10%) und 1 μ L Varian ($3,5 \times 10^3/\mu$ L) auf 60 °C erhitzt. Nach fünf Minuten wurden beide Ansätze vermischt und für 30 Minuten bei 60 °C unter Schütteln (700 rpm) inkubiert. Eine identisch zubereitete Probe wurde für 30 Minuten bei 60 °C unter Schütteln (700 rpm) inkubiert. Anschließend wurden die Proben gewaschen und mit einer Belichtungszeit von 100ms bei einer Anregungsleistung von 56 W/cm² auf dem Fluoreszenzmikroskop (II) vermessen.

Erhöhung des Reaktionsradius

Zur Maximierung des Reaktionsradius der Beads wurde eine Konstruktion bestehend aus einer Drehscheibe und einer Magnethalterung entworfen. Abbildung 3.5 zeigt, wie die Anwendung dieses Aufbaus während der Phase II des Quantifizierungsverfahrens eine Bewegung der magnetischen Mikropartikel durch das

3 Material und Methoden

Tabelle 3.4: Übersicht der Details der Akquisition der Fluoreszenzbilder. Auflistung nach der Seitenzahl der entsprechenden Abbildung.

Seite	Belichtungszeit [ms]	Laserleistung [W/cm ²]	Fluoreszenzmikros- kopischer Aufbau
48	100	114	I
50b	2000	114	I
58	100	96	I
59	100	96	I
61a1	100	56	II
61a2	100	56	II
63a	100	114	I
63b	100	114	I
65	100	56	II
69	100	198	II
71c1	100	114	I
71c2	100	114	I
72	1000	96	I
75	100	81,5	I
76	100	56	II

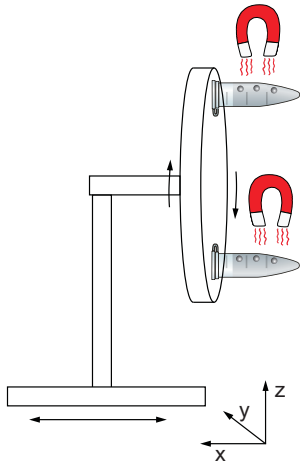


Abbildung 3.5: Technik der magnetisch induzierten Beadbewegung. Die Probengefäße wurden senkrecht zur Drehachse auf einer Scheibe befestigt, die sich gleichmäßig bei 4 rpm im Uhrzeigersinn dreht. Magneten sind abwechselnd im Zentrum und auf der Außenseite der Drehscheibe durch eine separate Halterung ortsfest befestigt. Bei Rotation der Drehscheibe werden die magnetischen Mikropartikel abwechselnd an die Innen- bzw. Außenwand des Probengefäßes (also in z-Richtung) gezogen. Die Drehscheibe ist auf einem Schüttelinkubator befestigt, der in x-Richtung schwenkt.

gesamte Probevolumen der Analytlösung auf zwei unterschiedlichen Achsen ermöglicht.

Test der Kreuzreaktivität

Beads mit unterschiedlichen Zusammensetzungen der Oberflächenmodifikation wurden von einem der Partner des Projektes TheraEDGE bezogen⁸. LNA modifizierte capDNA Fragmente und polyA₁₀ Oligomere wurden während des Vorgangs der Beadbeschichtung in unterschiedlichen Verhältnissen hinzugegeben. Durch Amidbindung wurden die Fragmente auf mit Carboxylgruppen modifizierten Beads kovalent fixiert. Weitere Details zum allgemeinen Protokoll der Beadfunktionalisierung sind in [Klamp et al., 2013] enthalten.

Jeweils $3,5 \times 10^3$ Varian Beads unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierung wurden in 35 μL L6 (50 %) gelöst und i) mit 3 μL des Reporters 1 (1 μM , ATTO 647N Label) und ii) mit 3 μL des Reporters 3 (1 μM , ATTO 647N Label) für 15 Minuten bei 60 °C unter Schütteln (700 rpm) inkubiert. Nach einer Waschphase von fünf Schritten wurden die Beads mit 100 Millisekunden Belichtungszeit und einer Anregungsleistung von 56 W/cm^2 auf dem miniaturisierten Fluoreszenzmikroskop (II) vermessen.

⁸Firma: Biokit, S.A., Department of Molecular Biology and R&D, Can Malé s/n, 08186 Lliçà d'Amunt, Barcelona-Spain

QD655 als Label (gleichzeitige Zugabe)

20 μL der Ziel-Fragmente unterschiedlicher Konzentrationen wurden in der Anwesenheit eines großen Überschusses an Hilfs-Fragmenten für fünf Minuten auf 95 °C erhitzt. Anschließend wurden $3,5 \times 10^3$ Beads (Varian, beschichtet mit Fänger 6), detDNA (biotin-modifizierter Reporter 3, 1 μM) sowie QD655 (Streptavidin modifiziert, 100 nM) hinzugegeben und die Probe für 17 Minuten bei 60 °C unter Schütteln (700 rpm) inkubiert. Nach vier Waschschritten erfolgte die Vermessung der Probe bei einer Anregungsleistung von 105 W/cm² mit einer Belichtungszeit von 100 ms auf dem optischen Aufbau (II).

QD655 als Label (sukzessive Zugabe)

20 μL der Ziel-Fragmente unterschiedlicher Konzentrationen wurden in der Anwesenheit eines großen Überschusses an Hilfs-Fragmenten für fünf Minuten auf 95 °C erhitzt. Anschließend wurden $3,5 \times 10^3$ Beads (Varian, beschichtet mit Fänger 6) sowie detDNA (biotin-modifizierter Reporter 3, 1 μM) hinzugegeben und die Probe für 15 Minuten bei 60 °C unter Schütteln (700 rpm) inkubiert. Nach vier Waschschritten wurden 2 μL von QD655 (Streptavidin modifiziert, 100 nM) dazu gegeben, gefolgt von einer weiteren Inkubationsphase von 10 Minuten bei 60 °C unter Schütteln (700 rpm). Danach wurden die Beads viermal gewaschen und anschließend bei 105 W/cm² Anregungsleistung mit 100 ms Belichtungszeit auf dem optischen Aufbau (II) vermessen.

Multiplexing: Separation von Quantifizierungs- und Codierungskanal

Zu der Herstellung der unterschiedlichen Codes wurden fünf verschiedene Konzentrationen (5×10^{-12} M, 1×10^{-11} M, 5×10^{-11} M, 1×10^{-10} M, 5×10^{-10} M) von biotinyliertem ATTO 532, gelöst in PBS, hergestellt und zu je 40 μL aufgeteilt. Dieser Lösung wurden jeweils 1 μg Streptavidin modifizierte Beads (CM01N, Bangs Laboratories Inc.) beigefügt und für ca. 30 s durch Pipettierung gut durchmischt. Anschließend wurden die Proben fünfmal mit PBS gewaschen und in die Messkammern überführt. Die Fluoreszenzbilder wurden mit einer Anregungsleistung von 72 W/cm² und einer Belichtungszeit von 0,1 s akquiriert.

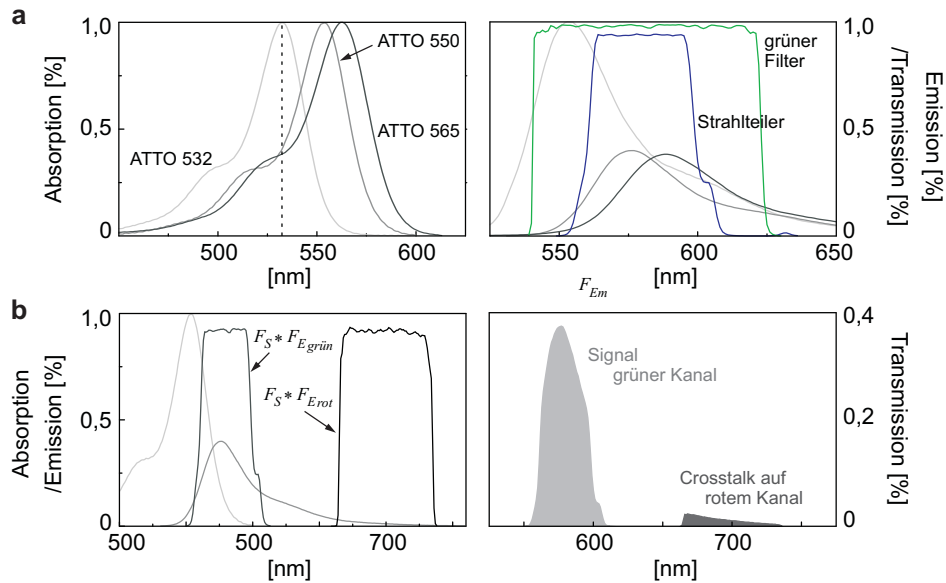


Abbildung 3.6: Absorptions- (links) und Emissionsspektren (rechts) der untersuchten Fluoreszenzfarbstoffe. Die gestrichelte Linie zeigt die Anregungswellenlänge (532 nm) an.

3.6 Bestimmung des SCR bei Zweifarbandetektion (Multiplexing)

Um das Multiplexing unterschiedlicher Ziel-Fragmente zu ermöglichen, wurde der miniaturisierte fluoreszenzmikroskopische Aufbau um eine weitere Anregungslinie (532 nm) erweitert (siehe Kapitel 3.2.2, Seite 22). Für die Bewertung der Eignung verschiedener grün fluoreszierender Fluoreszenzfarbstoffe zum Einsatz der Zweifarbandetektion mittels des fluoreszenzmikroskopischen Aufbaus (II) wurde das Signal-zu-Übersprechsignal-Verhältnis (SCR⁹) unterschiedlicher Fluorophore als Entscheidungskriterium herangezogen.

Um die maximal detektierbare Fluoreszenzintensität unter Verwendung des Sets der verbauten Spektralfilter zu bestimmen, wurden die Integrale der normalisierten Emissionsspektren der drei relevanten Fluorophore Atto 532, Atto 550 und Atto 565 bei einer Anregungswellenlänge von 532 nm verglichen (Abb. 3.6). Aufgrund ineffizienter Anregung sind die Fluoreszenzintensitäten von ATTO 550 und ATTO 565 vergleichend zu ATTO 532 vermindert (Abb. 3.6a, links). Andererseits ist das Emissionsmaximum beider Fluorophore im Gegensatz zu dem von ATTO 532 zum Zentrum des Transmissionsfensters des Detektionsfilters

⁹engl.: Signal-to-Crosstalk-Ratio

verschoben (Abb. 3.6a, rechts).

Wegen dieses konkurrierenden Effekts wurde zunächst die Funktion des effektiv detektierbaren Emissionssignals im grünen Kanal Em'_g berechnet. Diese ist abhängig von der Transmission des dichroitischen Strahlteilers und der des grünen Detektionsfilters. Em'_g kann also durch die Faltung der Funktion des Emissionsspektrums Em_g mit der des Strahlteilers S_g im grünen Spektralbereich und der des Filters F_g beschrieben werden:

$$Em'_g(\lambda) = Em_g(\lambda) * S_g(\lambda) * F_g(\lambda) \quad . \quad (3.5)$$

Dies gilt ebenso für das effektiv detektierbare Crosstalk-Signal im roten Kanal Em'_r , hier müssen allerdings die Funktionen des Strahlteilers im roten Spektralbereich S_r und die des roten Detektionsfilters F_r mit einbezogen werden:

$$Em'_r(\lambda) = Em_r(\lambda) * S_r(\lambda) * F_r(\lambda) \quad . \quad (3.6)$$

Da sich das SCR aus dem Verhältnis der effektiven Signale des grünen zum roten Kanal ergibt (Abb. 3.6b), ist dieses durch den Quotienten beider Integrale gegeben:

$$SCR = \frac{\int Em'_g(\lambda) d\lambda}{\int Em'_r(\lambda) d\lambda} \quad . \quad (3.7)$$

Tabelle 3.5: Maximal detektierbares Signal im grünen Kanal in Abhängigkeit ineffizienter Anregung bei gegebenem Strahlteiler und Detektionsfilter. Anregungswellenlänge: 532 nm.

Farbstoff	Gesamtssignal [%]	Signal grüner Kanal [%]	Signal roter Kanal [%]	SCR* (Grün/Rot)
ATTO 532	100	37,9	1,7	22,3
ATTO 550	39,9	22,6	1,5	15
ATTO 565	38,2	18,8	1,7	11

* engl.: Signal-to-Crosstalk Ratio

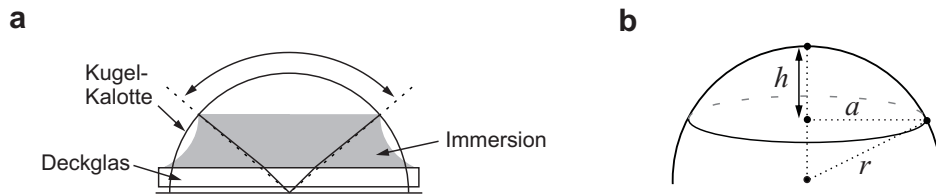


Abbildung 3.7: Bestimmung der Fläche der Kugelkalotte (b) anhand des Raumwinkels eines Objektivs (a).

3.7 Berechnung der Verluste durch Austausch des Objektivs

Die Numerische Apertur berechnet sich nach:

$$NA = n \cdot \sin \alpha \quad (3.8)$$

Der halbe objektseitige Öffnungswinkel α des Objektivs ist dabei durch

$$\alpha = \arcsin \left(\frac{NA}{n} \right) \quad (3.9)$$

mit der Numerischen Apertur NA und dem Brechungsindex n des Mediums verknüpft.

Da die Oberfläche einer Kugel $4\pi r^2$ beträgt, ist für einen Raumwinkel von 180° die Oberfläche eines idealen Objektes ($r = 1$) mit

$$\frac{4\pi r^2}{2} = 2\pi \quad (3.10)$$

gegeben. Die Berechnung der Fläche eines Kugelausschnitts in Abhängigkeit des Raumwinkels σ ist gemäß Abbildung 3.7b:

$$A = (a^2 + h^2) \quad (3.11)$$

Es gilt auch:

$$h = r - r \cdot \cos \frac{\sigma}{2} \quad (3.12)$$

Wobei der Raumwinkel σ des Ausschnitts der Kugelkalotte 2α beträgt. Damit folgt

$$A = 2\pi r^2 \left(1 - \cos \frac{\sigma}{2} \right) \quad (3.13)$$

Für $\alpha = \sigma/2$ bedeutet dies nach Formel (3.9):

$$A = 2\pi r^2 \left(1 - \cos \left(\arcsin \left(\frac{NA}{n} \right) \right) \right) . \quad (3.14)$$

4 Ergebnisse und Diskussion

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt durch Einteilung in drei Sinnabschnitte: In **Teil 1** (Kapitel 4.1) wird ein allgemeiner Umriss des Verfahrens gegeben und grundlegende Zusammenhänge aufgezeigt.

In **Teil 2** (Kapitel 4.2 bis 4.3) wird der Hybridisierungsprozess charakterisiert sowie Details und Optimierungen der Prozedur beschrieben.

In **Teil 3** (Kapitel 4.4 und 4.5) wird die Umsetzung des Verfahrens zur Implementierung in der Praxis verdeutlicht.

4.1 Das Bead-basierte Quantifizierungsverfahren

Die Effizienz sowie der Erfolg eines quantifizierenden Nachweisverfahrens sind von vielen Parametern abhängig, die eng miteinander verknüpft sind. Diese Verflechtung der verschiedensten Anforderungen macht die Bestimmung und Charakterisierung der sensitivitätsbestimmenden Faktoren zu einer großen Herausforderung bei der Konzipierung eines neuen Verfahrens. Eine allgemeine Einteilung der Hauptfaktoren hat Haes [Haes et al., 2006] für die Formulierung des Erfolgs von Immunoassays vorgenommen. Dieser ist demnach abhängig von: 1) der Bindungskonstanten bzw. der Affinität der Bindungspartner, 2) dem Ausmaß der unspezifischen Bindung, 3) der Diffusionsdistanz der Bindungspartner, 4) der Sensitivität des Detektors und 5) der Reaktionszeit. Durch Anwendung des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Nachweisverfahrens zur Quantifizierung von DNA-Fragmenten ist die Möglichkeit der Beeinflussung sowie der Manipulation der oben genannten Hauptfaktoren gegeben.

Nach eingehender Betrachtung des Prozesses der Datenverarbeitung als elementaren Bestandteil des Verfahrens werden im folgenden Abschnitt die Rolle sowie die Vorteile und Limitierungen der Anwendung von Beads als feste Phase im Zusammenhang mit der Detektion von DNA-Fragmenten aufgezeigt.

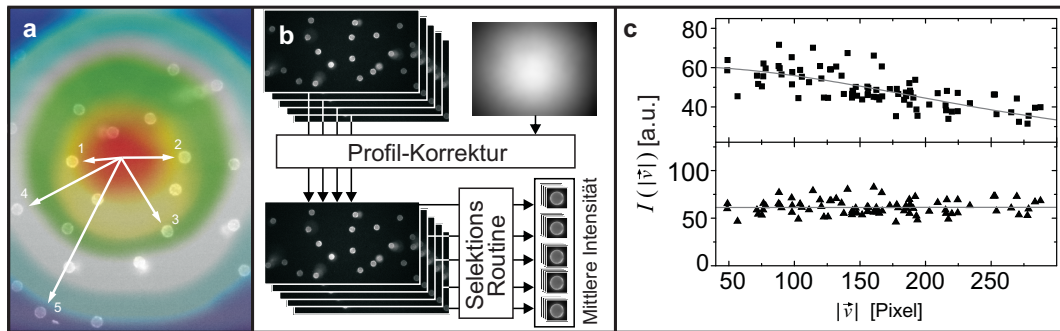


Abbildung 4.1: Korrektur des Anregungsprofils. (a) Entsprechend der Lage werden die Beads unterschiedlichen Anregungsleistungen ausgesetzt. (b) Prinzip der Datenverarbeitung. Das Fluoreszenzbild wird bezüglich des Anregungsprofils korrigiert; anschließend werden einzelne Beads für die Analyse selektiert. (c) Abhängigkeit der Beadintensität von der Lage im Anregungsprofil. ■ Nicht-korrigierte und ▲ profil-korrigierte Intensitätswerte. [Klamp et al., 2013]

4.1.1 Datenverarbeitung

Der Prozess der Bildverarbeitung kann in zwei grundlegende Hauptprozesse unterteilt werden. Zum einen ist die Angleichung des gaußförmigen Laserprofils elementar für die Reproduzierbarkeit der Daten. Zum anderen kommt der Selektion der zu verarbeitenden Beads eine große Bedeutung zu. Die Optimierung beider Prozesse führt zu einer Verbesserung der Unterscheidbarkeit gering unterschiedlicher Konzentrationen der Ziel-DNA Fragmente (tDNA¹) beziehungsweise gering unterschiedlicher Bead-Intensitäten und erhöht somit die Empfindlichkeit des Nachweisverfahrens.

Angleichung des Anregungsprofils

Wie aus Abbildung 4.1a & b zu entnehmen ist, folgt das Leistungsprofil des Laserstrahls der Weitfeldausleuchtung in lateraler Ausrichtung einem gaußförmigen Habitus. Dies kann am einfachsten unter Bestrahlung einer homogenen Fluoreszenzfarbstofflösung gezeigt werden (Abb. 4.1b oben rechts). Wird eine Probe homogen-fluoreszierender Beads einem derartigen Anregungsprofil ausgesetzt, unterliegt die Emission folglich dem gleichen charakteristischen Profil. Dies führt somit zu dem Effekt, dass Beads an der Peripherie der Anregungs-

¹engl.: Target DNA

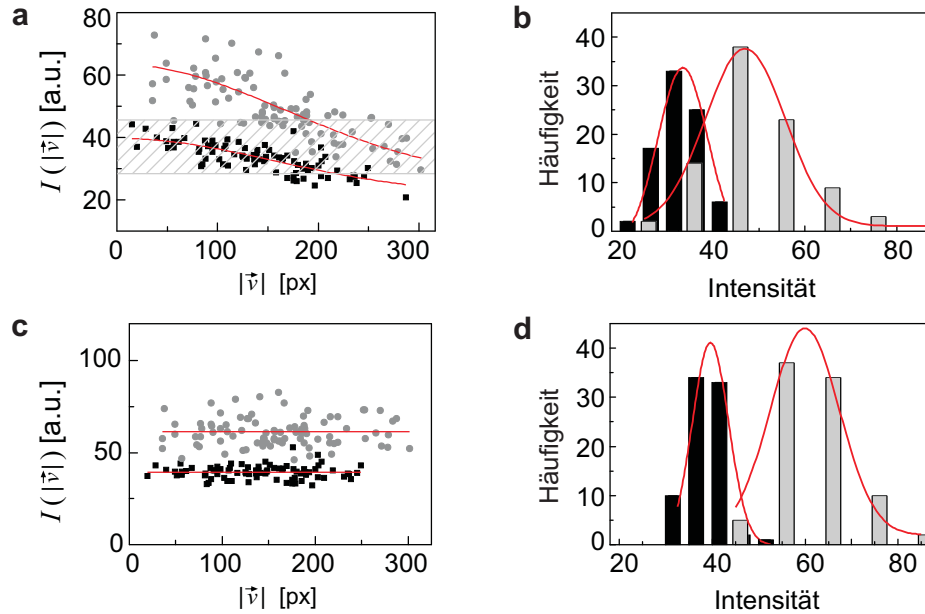


Abbildung 4.2: Erweiterung der Detektionsgrenze durch Angleichung des Anregungsprofils. Bead-Intensitäten (**a**, **c**) und Intensitätsverteilungen (**b**, **d**) vor (**a**, **b**) und nach (**c**, **d**) Angleichung des Anregungsprofils. Die schraffierte Region verdeutlicht den Intensitätsbereich, in dem eine Unterscheidung nicht möglich ist. ● 10 pM [5kbp DNA-Fragment], ■ Nullprobe.

funktion mit geringerer Intensität emittieren als Beads gleicher Farbstoffbelegung im Zentrum der Laserausleuchtung (Abb. 4.1c oben). Abbildung 4.2 verdeutlicht weiter die Problematik der Unterscheidung von Beads verschiedener Belegungs-Konzentrationen aufgrund ihrer Fluoreszenzintensität bei ungünstiger Lage innerhalb der Laserausleuchtung. Dies ist insbesondere bei geringen Intensitätsunterschieden, wie sie nahe des Detektionslimits zu finden sind (vgl. Abb. 4.39a), der Fall. Zur Charakterisierung des Zusammenhangs zwischen Lage im Anregungsprofil und Fluoreszenzintensität wird der Vektor vom Zentrum des Anregungsprofils zu der Position des entsprechenden Beads herangezogen (siehe Abb. 4.1a). Bei gegenseitiger Auftragung kann das Ausmaß dieser Abhängigkeit typischerweise durch eine gaußförmige Anpassung der Daten verdeutlicht werden. Diese Funktion folgt parametrisch typischerweise der gleichen Funktion des Anregungsprofils. Wie in Abbildung 4.2 gezeigt, kann die effiziente Korrektur der Bead-Intensitäten die Unterscheidung zwischen Beads ähnlicher Fluoreszenzintensität ermöglichen und somit die Detektionsgrenze erweitern.

Selektion der Beads

Der zweite wichtige Schritt der Bildverarbeitung ist die angemessene Selektion der zu prozessierenden Beads in den Fluoreszenzbildern. Zum Teil ist das Auftreten von Artefakten ein großes Hindernis bei der präzisen Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität. Diese sind zwar mit dem bloßen Auge recht gut erkennbar, für einen automatisierten Algorithmus allerdings schwer zu identifizieren. Als Mittel der Charakterisierung der fluoreszenten Strukturen wurden zwei strukturelle Parameter herangezogen, die Größe und die Zirkularität. In ihrer Kombination sind sie nicht nur ein effektives Instrument zur Unterscheidung zwischen Beads und Artefakten, sondern auch zur Identifikation repräsentativer Beads. Solche Partikel, die beispielsweise Aggregatbildung oder Verwischungen zeigen, sind für den Auswertungsprozess nicht geeignet, da der Mittelwert der

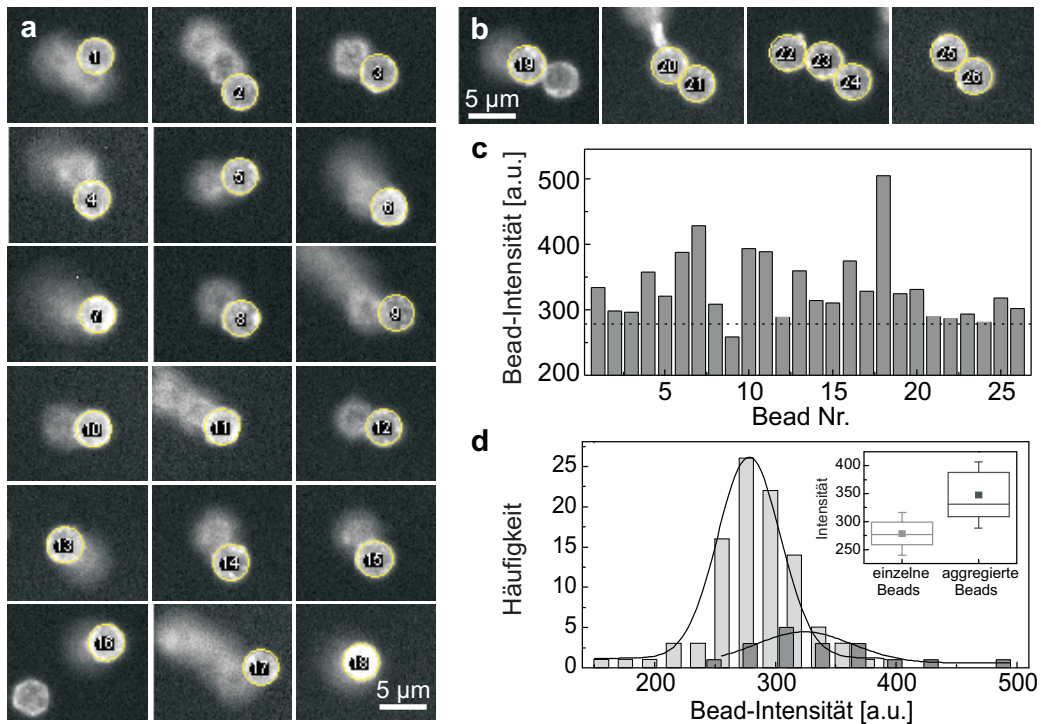


Abbildung 4.3: Cluster-Analyse. (a) Axiale Aggregation. (b) Laterale Aggregation. (c) Mittlere Beadintensität aggregierter Beads. Beadnummern beziehen sich auf (a) und (b), die gestrichelte Linie zeigt die mittlere Beadintensität einzelner (nicht aggregierter) Beads an. (d) Vergleich der Verteilungen der Beadintensitäten zwischen \blacksquare einzelnen und \blacksquare aggregierten Beads bei der Quantifizierung von 5 kbp Ziel-Fragmenten. Box-Plot: \blacksquare Arithmetisches Mittel, $-$ Median, \square Interquartilsabstand, \perp Standardabweichung.

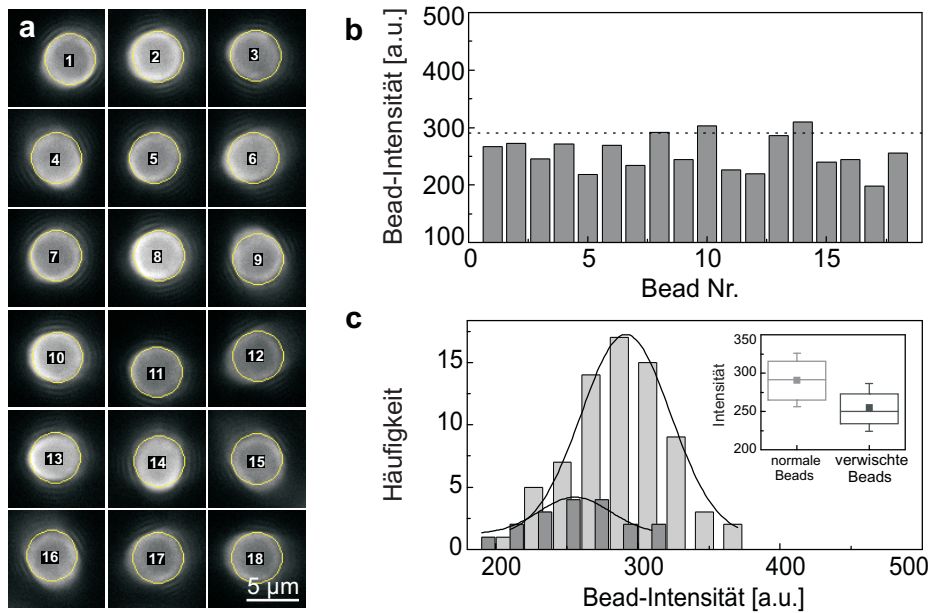


Abbildung 4.4: Verwischungen von Beads. (a) Fluoreszenzbilder. (b) Mittlere Beadintensität verwischter Beads. Die gestrichelte Linie zeigt die mittlere Beadintensität scharf abgebildeter Beads an. (c) Vergleich der Verteilungen der Beadintensitäten zwischen ■ scharf und ■ verwischt abgebildeten Beads. Box-Plot: siehe Abb. 4.3.

Intensitätsverteilung sich von dem der einzelnen, scharf abgebildeten Beads unterscheidet.

Eine genaue Untersuchung aggregierter Beads zeigt, dass an den Schnittstellen bzw. Überlappungen mehrerer Beads die Intensität aufgrund der Akkumulation des Fluoreszenzsignals leicht erhöht ist (Abb. 4.3). Folglich ist auch die mittlere Fluoreszenzintensität solcher Beads überdurchschnittlich höher als die der frei liegenden Mikropartikel (Abb. 4.3c). Der Einfluss dieses Effekts auf den Mittelwert der Gesamtheit der Beads ist also abhängig von dem Ausmaß der Aggregatbildung. Für eine repräsentative Probe mit einem Stichprobenumfang von $n = 97$ zeigt sich, dass knapp ein Viertel der Beads Aggregate aufweist. Die Intensitätsverteilung dieser Partikel (Abb. 4.3d) hat einen Mittelwert von 347 Counts,² der sich mit 69 Counts somit um $1,8 \sigma$ vom Mittelwert der Intensitätsverteilung einzelner Beads (mit 278 Counts) unterscheidet.

Den gegenteiligen Einfluss auf den Intensitätsmittelwert weisen solche Partikel auf, die Verwischungen zeigen (Abb. 4.4). Bedingt durch Bewegung dieser

²engl.: Zählimpulse

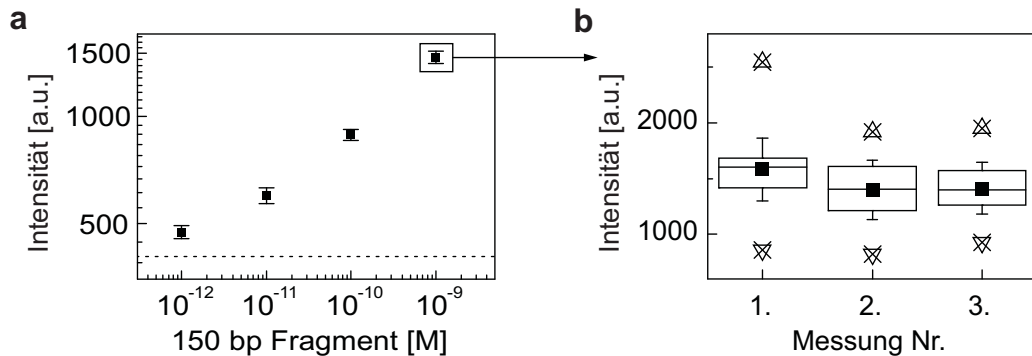


Abbildung 4.5: Reproduzierbarkeit der Datenanalyse Anhand des Vergleichs dreier unabhängiger Messungen. (a) Detektion von 151 bp Fragmenten des Organismus *S. pneumoniae*. ■ Arithmetisches Mittel der Mittelwerte dreier unabhängiger Messungen. Fehlerbalken: SEM. (b) Box-Whisker-Plots der Intensitätsverteilungen bei einer Analyt-Konzentration von 1 nM. ■ Arithmetisches Mittel, – Median, Box: Interquartilsabstand, ⊥ S.D., × Perzentile P99 und P1, △ ▽ Ausreißer. Probenpräparation nach Tabelle 3.2 & 3.4, Seite 34 ff.

Beads während der Dauer der Akquisition der Fluoreszenzbilder, ergibt sich ein Verlust in der mittleren Beadintensität und somit eine Verringerung des Mittelwerts der Intensitätsverteilung (Abb. 4.4b, c). Hier ergibt sich eine Abweichung von $1,2 \sigma$, allerdings zu niedrigen Intensitäten verschoben.

In ihrer Kombination kann das Auftreten beider Effekte also im besten Fall zu einer Kompensation in der Verschiebung des Mittelwerts führen. Nichtsdestotrotz handelt es sich hierbei um eine Verfälschung der Grundgesamtheit der auswertbaren Beads, die zumindest eine Vergrößerung der Halbwertsbreite der Intensitätsverteilung und somit eine Erhöhung der Standardabweichung mit sich zieht. Dies kann sich gerade bei sehr geringen Intensitätsunterschieden von unterschiedlichen Analyt-Konzentrationen negativ auf die Sensitivität des Nachweisverfahrens auswirken.

Reproduzierbarkeit der Daten

Die Funktionalität sowie die Zuverlässigkeit der einzelnen Prozesse der Datenverarbeitung spiegelt sich in der Reproduzierbarkeit der Daten wider. Eine unzulängliche Profilkorrektur beziehungsweise Beadselektion führt zu großen Streuungen der einzelnen Beadintensitäten. Der arithmetische Mittelwert aller Mikropartikel einer Probe unterliegt in diesem Fall, besonders bei kleinen Stichprobenumfängen, großen Schwankungen. Die Analyse der Standardabweichung

(SD) einer Probe mit $n = 50$ Beads weist nach Verarbeitung der Daten einen relativen Wert von 2-12 % auf. Der relative Standardfehler der Mittelwerte (SEM) von 1-6 % verdeutlicht dabei die hohe Stabilität des arithmetischen Mittels für diese Größe der Stichprobe.

Die präzise Reproduzierbarkeit des Intensitätsmittelwerts der Gesamtheit aller Beads ist in Abbildung 4.5 anhand der Durchführung dreier unabhängiger Messreihen bei der Quantifizierung synthetischer Fragmente des Organismus *Streptococcus pneumoniae* aufgezeigt. Auch weisen hier die Intensitätsverteilungen der einzelnen Beads der Messungen ein hohes Maß an Symmetrie auf. Beide Faktoren unterstreichen somit die korrekte Funktionsweise der Software zur Verarbeitung der Fluoreszenzbilder. Weiter begründet der geringe relative Standardfehler der Mittelwerte der drei Messungen (4 %) die Zuverlässigkeit des arithmetischen Mittelwerts als robusten Quantifikationsparameter des Nachweisverfahrens.

4.1.2 Möglichkeiten des Nachweisverfahrens

Viele Aspekte der Eigenschaften und der Anwendung des Nachweisverfahrens profitieren von dem Einsatz magnetischer Beads als mobile feste Phase. Das Lösen der festen in der flüssigen Phase ermöglicht etwa die Verkürzung der Diffusionsdistanz der Bindungspartner [Fan et al., 1999] und führt zu einer stark verbesserten Reaktionsrate [Jungell-Nortamo et al., 1988]. Ein weiterer wesentlicher Vorteil gegenüber einer stationären festen Phase ist die Möglichkeit der Manipulation der Bindungsreaktion. Durch aktive Bewegung der magnetischen Partikel lässt sich beispielsweise ihr Reaktionsradius erweitern - dies führt neben der Erhöhung der lokalen Konzentration des Analyten und der daraus folgenden Akkumulation des Signals auf der Oberfläche [Kim et al., 2006] zu einer weiteren Beschleunigung der Reaktion; die Bindung des Analyten erfolgt also unabhängig von Brown'scher Molekularbewegung.

Experimentell konnte dieses Verhalten zur Maximierung der Akkumulationseffizienz genutzt und weiter optimiert werden. Dies verdeutlicht der Vergleich der Detektionseffizienz bei Variation der Inkubationsbedingungen. Abbildung 4.6 zeigt die Abhängigkeit der Detektionseffizienz von der Art der Inkubationstechnik anhand dreier Extrembeispiele. Die Größe des Reaktionsradius wurde dabei durch das Ausmaß der aktiven Bewegung der Beads kontrolliert, die durch i) einfache Sedimentation, ii) das Schütteln der Probe und iii) Etablierung eines magnetischen Wechselfeldes herbeigeführt wurde (die genaue Beschreibung der Prozedur ist in Kapitel 3.5.2, Seite 35 zu finden).

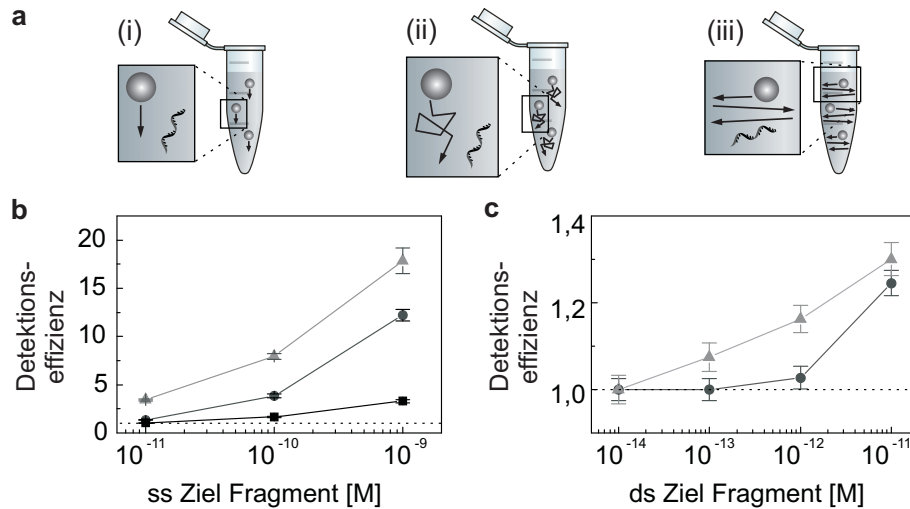


Abbildung 4.6: Einfluss der Inkubationstechnik auf die Detektionseffizienz. Aktive Bewegung der Beads durch i) einfache Sedimentation ■, ii) Schütteln der Probe bei 450 rpm ●, iii) ein magnetisches Wechselfeld ▲. (b) Detektion einzelsträngiger 119nt DNA Fragmente mit 100 nM [detDNA] (▲ n = 25-34 Beads, ● n = 19-27, ■ n = 21-38), (c) Detektion doppelsträngiger 151nt DNA Fragmente mit 1 µM [detDNA] (● n = 108-140, ▲ n = 59-26 Beads). Probenpräparation nach Tabelle 3.3 & 4.6, Seite 34 ff. ⊥: SEM.

Dieses Experiment unterstreicht nicht nur den Einfluss der Beadbewegung auf die Hybridisierungseffizienz, es zeigt auch weiter einen simplen Weg zu der Optimierung der Detektionsempfindlichkeit ohne Veränderung der Assay-Komponenten (Beadfunktionalisierung, Oligonukleotidsequenzen u.a.) auf. So kann die Detektionsgrenze des Nachweises des doppelsträngigen Ziel-Fragments 1 durch einfaches Schütteln der Probe um eine Größenordnung und durch Anwendung der magnetisch induzierten Bewegung um etwa 3 Größenordnungen von 1 nM auf 0,1 pM erweitert werden. Damit ermöglicht die Anreicherung des Signals auf der Beadoberfläche Detektionsempfindlichkeiten, die trotz der Anwendung einfacher Weitfeld-Mikroskopie Empfindlichkeiten aufweisen, wie man sie durch Einsatz konfokaler Fluoreszenzspektroskopie erhält [Yahiatène et al., 2012].

Darüber hinaus resultieren aus der Nutzung von magnetischen Beads erhebliche Vorteile hinsichtlich der Integration des Verfahrens in LOC-basierten Point-of-care-Testing (POCT) Systemen. Die magnetischen Eigenschaften der Mikro-partikel ermöglichen ein effizientes Waschen, also einen Austausch des Mediums, oder die Separation der überschüssigen Reporter-Oligonukleotide. Auch das Handling auf LOC-Elementen ist durch die Möglichkeit einer gerichteten Bewegung, auch entgegen der Strömungsrichtung des Mediums, stark erleich-

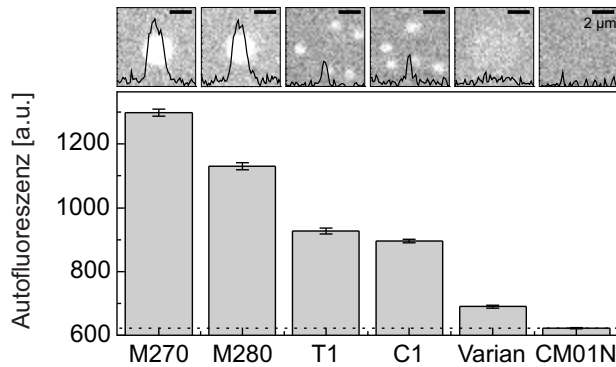


Abbildung 4.7: Vergleich der Autofluoreszenz unterschiedlicher kommerziell-beziehbarer magnetischer Beads. (oben) Intensitätsprofile einzelner Beads. (unten) Mittlere Autofluoreszenz. Die Fehlerbalken zeigen den SEM mit $n = 87-116$ Beads.

tert. Weiter kann die Akkumulation des Analyten sowie der Bildgebungsprozess auf der gleichen Phase durchgeführt werden. Dies führt zu einer Vereinfachung der Nachweis-Prozedur und somit zu einer erheblichen Zeitersparnis.

4.1.3 Limitierungen des Nachweisverfahrens

Die ausschlaggebendste Limitierung, der Bead-basierte Nachweisverfahren unterliegen, ist der Effekt des nicht-spezifischen Hintergrundsignals (NSH). Formel (3.4) verdeutlicht, dass die Maximierung der Detektionseffizienz nicht nur durch Erhöhung des spezifischen, sondern auch durch Herabsetzung des unspezifischen Signals erfolgen kann. Bei gegebener Intensität des unspezifischen Signals determiniert dieses die Empfindlichkeit des Nachweisverfahrens und wirkt sich somit limitierend aus. Im Folgenden sind die unterschiedlichen Quellen und Gründe für das Auftreten unspezifischen Signals charakterisiert und Strategien zu der Verminderung dessen beschrieben.

NSH - Autofluoreszenz

Eine grundlegende Begründung für das Aufkommen von unspezifischen Hintergrundsignal liefert die Autofluoreszenz der magnetischen Mikropartikel im roten Wellenlängenbereich. Da diese zwischen unterschiedlicher Herstellern stark variieren kann, wurde zunächst ein Screening verschiedener relevanter Produkte durchgeführt. Wie Abbildung 4.7 zu entnehmen ist, kann durch die richtige Wahl der Partikel das Hintergrundsignal auf Niveau des CCD-Rauschens reduziert werden.

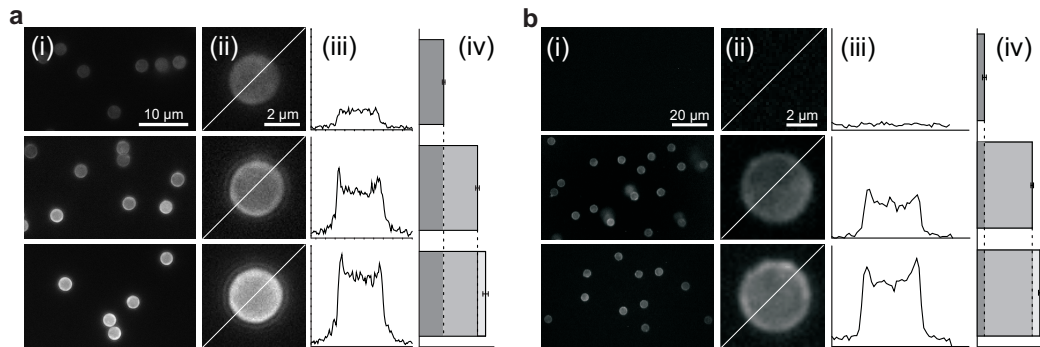


Abbildung 4.8: Verteilung der Fluoreszenz-Signale am Detektionslimit. **(a)** Beads mit hoher Autofluoreszenz (Dynabeads M280), **(b)** Beads mit geringer Autofluoreszenz (Varian). Erste Reihe: Autofluoreszenz; zweite Reihe: Nicht-spezifischer Hintergrund (NSH); dritte Reihe: Spezifisches Signal. **(i)** Fluoreszenzbild der Beads. **(ii)** Vergrößerung eines einzelnen Beads. **(iii)** Intensitätsprofil des Beads gezeigt in **(ii)**. **(iv)** Mittlere Fluoreszenzintensität und Fehler der Mittelwerte (SEM) mit einem Stichprobenumfang von $n = 40$ für a) und $n = 100$ Beads für b).

NSH - Adsorption von Reportern

Die Untersuchung der Verteilung der Intensitätssignale am Detektionslimit offenbart neben der Autofluoreszenz eine weitere Quelle für die Entstehung des NSH. So zeigt die Messung der Blindprobe (ohne Ziel-Fragment), dass eine weitere Fraktion von Hintergrundfluoreszenz die Empfindlichkeit der Quantifizierungsmethode begrenzt (Abb. 4.8). Diese kommt durch Adsorption von Reporter-Molekülen auf der Beadoberfläche zustande und ist damit, auch bei der Verwendung von Beads niedriger AF, der letztendlich entscheidende sensitivitäts-limitierende Faktor. In diesem Zusammenhang bestimmt die Beschaffenheit des Fluoreszenzlabels zu einem erheblichen Teil die Stärke dieses Effektes. Abbildung 4.9 verdeutlicht, wie sich beispielsweise durch Austausch des Labels der Reporter-Fragmente (detDNA) die Adsorption relativ verändert (eine genaue Untersuchung unterschiedlicher Möglichkeiten der Fluoreszenzmarkierung ist in Kapitel 4.3 gegeben). Darüber hinaus wird das Ausmaß der Adsorption durch zwei Hauptfaktoren beeinflusst. Einerseits spielt die Zugänglichkeit der Oberfläche eine Rolle und andererseits wirkt sich das Koppeln der Fluorophore an DNA Fragmente (z.B. Reporter-Fragmente) auf das Adsorptionsverhalten der Farbstoffmoleküle aus.

Beide Effekte sind in Abbildung 4.9 dargestellt: Die Beschichtung der Oberfläche von $4,7 \mu\text{m}$ Varian Beads mit Fänger-Fragmenten (captDNA) führt eine Verkleinerung der zugänglichen Beadoberfläche herbei. Nach Inkubation mit

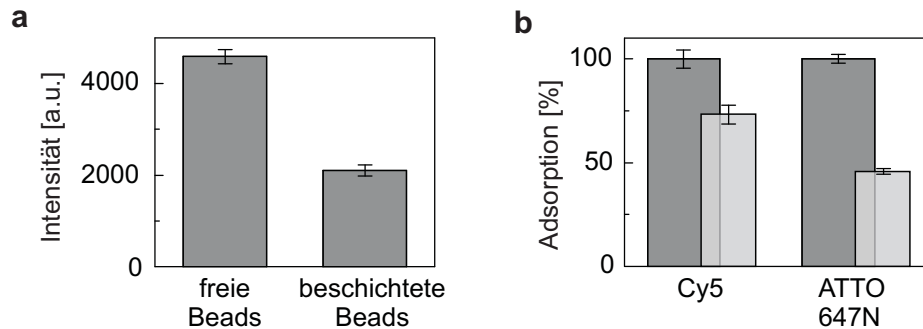


Abbildung 4.9: Adsorption von Fluoreszenzfarbstoff. (a) Adsorption von freiem Farbstoff (ATTO 647N, 1 μ M). (b) Abnahme der Adsorption auf freien Beads durch Konjugation des Farbstoffs an detDNA Oligonukleotide. ■ 1 μ M freier Farbstoff, ▒ 1 μ M detDNA. Fehlerbalken: SEM mit $n = 66-72$.

freiem Farbstoff³ offenbart der Vergleich der Beadintensitäten einen Abfall von ca. 50 % (Abb. 4.9a), was eine starke Abnahme der Adsorption anzeigt. Die Kopplung von Fluorophoren an DNA Fragmente (z.B. detDNA) führt zu einer weiteren Verringerung des Effekts der nicht-spezifischen Oberflächenadsorption (Abb. 4.9b), da sich damit die Hydratationseigenschaften ändern.

NSH - Kreuzreaktivität

Neben der Adsorption von detDNA auf der Beadoberfläche trägt noch eine weitere Form des NSH zu dem Signal der Blindprobe in Abbildung 4.8 bei. Dieser Fraktion des NSH ist die Wechselwirkung zwischen detDNA und capDNA geschuldet. Durch Teil-Hybridisierung kann es auch in der Abwesenheit von Ziel-DNA zu Teilhybridisierungen zwischen capDNA und detDNA kommen (Weitere Details in Kapitel 4.4.3 auf Seite 82).

Unabhängig von dem Grund der Wechselwirkungen kann das Ausmaß der Kreuzreaktivität durch Variation der Anzahl der captDNA Moleküle auf der Beadoberfläche bei gleichbleibender detDNA Konzentration bestimmt werden. Dies wurde für zwei unterschiedliche detDNA-Fragmente, eines mit i) hoher und eines mit ii) niedriger Komplementarität, durchgeführt (Abb. 4.10). Bei diesem Experiment ist die Blockierung der Zwischenräume zwischen den Fänger-Oligonukleotiden mit weiteren DNA Fragmenten von entscheidender Wichtigkeit. Nur so kann die Zugänglichkeit der Oberfläche für Moleküle der detDNA

³N-hydroxysuccinimidylester (NHS) funktionalisierte Farbstoffmoleküle (1 μ M) wurden vor der Zugabe zu den Beads in Wasser hydrolysiert.

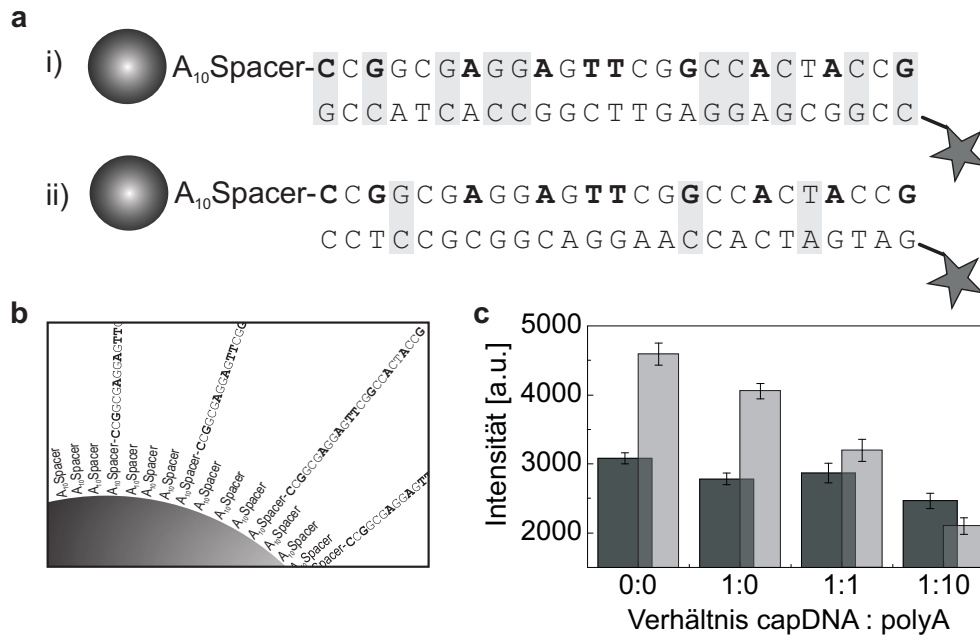


Abbildung 4.10: Kreuzhybridisierung zwischen capDNA und detDNA. (a) ATTO 647N markierte Repoter-Oligomere mit i) hoher und ii) geringer Komplementarität zur capDNA wurden mit Beads inkubiert, die in unterschiedlichen Verhältnissen von capDNA zu polyA Fragmenten funktionalisiert wurden (b). (c) ■ hohe Komplementarität (i), ■ geringe Komplementarität (ii). Fehlerbalken: SEM mit $n = 74-85$. Probenpräparation nach Kapitel 3.5.2, Seite 37. [Klamp et al., 2013]

verhindert werden, um somit einen Einfluss der Oberflächenadsorption auszuschließen zu können. Realisiert werden konnte dies durch Variation des Verhältnisses von capDNA zu kurzen, 10 Nukleotide (NT) langen poly-Adenin (polyA) Fragmenten bei der Funktionalisierung der Beads (Abb. 4.10b). Abb. 4.10c zeigt mit reduzierter Dichte der capDNA einen starken Abfall des Fluoreszenzsignals von i), während das von ii) nahezu auf dem gleichen Level verbleibt. Dies bestätigt die Annahme, dass die Interaktion zwischen detDNA und capDNA mit erhöhter Komplementarität zunimmt, und verdeutlicht somit die Wichtigkeit der Wahl einer geeigneten detDNA Sequenz. Dabei ist neben der Zusammensetzung auch die Abfolge der einzelnen Basen zu beachten, da diese ebenfalls einen Einfluss auf die Stärke der Wechselwirkungen der Fragmente zueinander hat [Southern et al., 1999]. Besonders DNA-LNA⁴ Basenpaarungen (Abb. 4.10, fett gedruckte Nukleotide) weisen eine erhöhte Affinität auf [Kaur et al., 2008; Arora et al., 2008].

⁴engl.: Locked Nucleic Acid: Modifiziertes Nukleotid

NSH - Hintergrund-Nukleinsäuren

In physiologischen Probelösungen der Atemwegsschleimhaut (Sputum) ist allgemein mit einer Kontamination durch nicht-spezifische Hintergrund-Nukleinsäuren (BgNA⁵) von Keimen oder Organismen der oralen Mikroflora zu rechnen. Da diese in großer Menge und Diversität vertreten ist [Keijser et al., 2008], kann es zu nicht-spezifischen Wechselwirkungen der Reporter- oder Hilfs-Fragmente beziehungsweise der Beads mit diesen Nicht-Ziel-Fragmenten kommen. In diesem Fall ist, entsprechend der Art der Wechselwirkungen, entweder die Verminderung des spezifischen oder die Erhöhung des unspezifischen Fluoreszenzsignals die Konsequenz der Anwesenheit von Hintergrund DNA. Unabhängig des Ursprungs der unerwünschten Wechselwirkungen wirkt sich eine geringe Spezifität negativ auf die Detektionseffizienz γ und somit limitierend auf das Nachweisverfahren aus. Eine nähere Betrachtung der Spezifität des Nachweisverfahrens ist in Kapitel 4.4.1 „Test der Spezifität“ auf Seite 77 zu finden.

⁵engl.: Background Nucleic Acid

4.2 Der Hybridisierungsprozess

Der Nachweis von DNA durch Anwendung der bead-basierten Methode gliedert sich in zwei Hauptprozesse. Der erste Schritt beinhaltet die Akkumulation der Ziel-Fragmente auf der Oberfläche der Mikropartikel durch spezifische Hybridisierung der capDNA. Weiter ist die Markierung der Ziel-DNA mit Reporter-Fragmenten obligatorisch für die erfolgreiche Quantifizierung mittels bildgebender Fluoreszenzmikroskopie. Beide Prozesse erfolgen entweder simultan oder sind, im Falle des Nachweises doppelsträngiger Ziel-Fragmente, zeitlich separiert. Die Effizienz des Gesamtprozesses wird dabei durch die Performanz beider Teilprozesse bestimmt und ist determinierend für die Sensitivität des Quantifizierungsverfahrens.

4.2.1 Optimierung der Beschichtungsdichte

Die Beschichtung der Beads mit capDNA hat einen maßgeblichen Einfluss auf die maximal erreichbare Detektionssensitivität. Dabei spielen einige, zum Teil konkurrierende Faktoren eine wichtige Rolle. Einerseits wird die Effizienz des Akkumulationsprozesses durch die Dichte der capDNA Moleküle bestimmt. Das bedeutet, höhere Dichten des Fänger Fragmentes führen zu einer gesteigerten Akkumulationseffizienz und somit zu einer erhöhten Anzahl gefangener Fragmente; gleichzeitig vermindert sich die Größe der Zwischenräume der freien Beadoberfläche mit steigender Dichte, was damit eine Verminderung der Oberflächenadsorption mit sich zieht (siehe Kapitel 4.1.3). Andererseits sinkt mit steigender Dichte die Zugänglichkeit der capDNA bedingt durch sterische Hinderung [Southern et al., 1999] oder Coulomb'sche Abstoßung [Vainrub and Pettitt, 2002] mit der Konsequenz einer verringerten Hybridisierungseffizienz [Peterson et al., 2001]. Diese ist jedoch mit der Affinität der Oligonukleotide verknüpft, die wiederum von der Länge der Fragmente abhängig ist (siehe Kapitel 4.2.2). Durch Untersuchungen an Mikroassays ist allerdings ebenso bekannt, dass die maximal mögliche Oberflächendichte durch die Länge der capDNA bestimmt wird [Steel et al., 2000]. Die optimale capDNA-Dichte ist also sowohl von der Zugänglichkeit als auch von der Affinität der capDNA abhängig und erfordert somit einen Kompromiss zwischen beiden Faktoren.

Für die Quantifizierung der *S. pneumoniae* Fragmente wurde die Bestimmung der optimalen Funktionalisierungsdichte daher experimentell durch Titration der capDNA bestimmt. Dabei wurde die Konzentration der 19 Nukleotide langen biotinylierten capDNA während der Beschichtungsprozedur variiert und die Beads anschließend im Nachweisverfahren eingesetzt. Abbildung 4.11 ist zu ent-

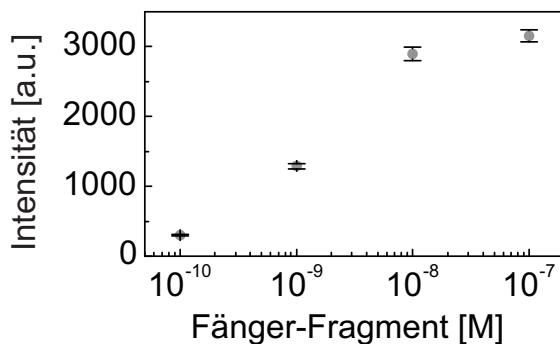


Abbildung 4.11: Einfluss der Beschichtungsdichte der Beads (M-280 SA) auf die Hybridisierungskapazität. Die Konzentration von Fänger 5 wurde während der Beschichtung der Beads variiert. Nach Entfernung der ungebundenen capDNA erfolgte die Detektion des ssZiel-Fragments 2 (*S. pneumoniae* (1 μ M, [detDNA] = 1 μ M). Fehlerbalken zeigen den SEM mit $n = 47-59$ Beads.

nehmen, dass ab einer capDNA-Konzentration von 10 nM ein Sättigungseffekt im Intensitätssignal entsteht. Aussagen über die Gründe dafür sind allerdings nur schwer zu treffen, da neben den oben genannten Effekten die Sättigung der verfügbaren Streptavidin-Bindestellen ebenfalls für einen vergleichbaren Kurvenverlauf verantwortlich sein könnte. In jedem Fall identifiziert dieses Experiment diejenige Dichte der capDNA, die zu maximal erreichbaren Hybridisierungseffizienzen führt. Infolgedessen wurde für alle weiteren Experimente mit diesem Ziel-Fragment eine capDNA-Konzentration von 100 nM für die Funktionalisierung der Partikel eingesetzt.

4.2.2 Variation der Länge der capDNA Fragmente

Wie aus Anwendungen von Gen-Expressions Arrays bekannt ist, hat die Länge der capDNA einen direkten Einfluss auf die Spezifität der Fragmente [Chou et al., 2004]. Wie obig diskutiert, existieren bei der Verlängerung der Sequenzen allerdings Einschränkungen hinsichtlich der Dichte der Beadfunktionalisierung. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob bereits geringe Änderungen der Länge zu einer Verbesserung des Akkumulationsprozesses führen. Zu diesem Zweck wurde das Fänger-Fragment 1 von 25 über 30 (Fänger 2) bis 35 (Fänger 3) Nukleotide verlängert und der Einfluss auf die Hybridisierungseffizienz untersucht (Abb. 4.12). Anhand des starken Intensitätsanstiegs von ca. 350 % (Fänger 3) bei gleichbleibendem NSH lässt sich verdeutlichen, dass sich durch diese Strategie die Detektionseffizienz dramatisch steigern lässt.

Der deutliche Intensitätsunterschied zwischen der Anwendung von Fänger 2 & 3 lässt allerdings den Schluss zu, dass die Verlängerung des Fragments nicht alleinig für die verbesserte Hybridisierungseffizienz verantwortlich ist. Eine genauere Betrachtung der Komposition der Sequenzen zeigt die Erweiterung des capDNA-tDNA Hybrids um drei starke (G:C) und zwei schwache (A:T) Basen-

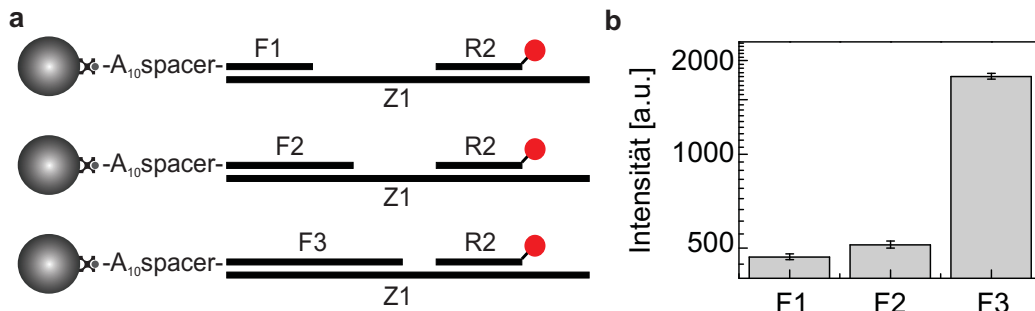


Abbildung 4.12: Einfluss der Länge der Fänger-Oligonukleotide auf die Akkumulationseffizienz. (a) Schematische Darstellung der Unterschiede der verwendeten Sequenzen für die Detektion des ss Ziel-Fragments 1 (*M. luteus*). F1-3: Fänger 1-3, R2: Reporter, Z1: Ziel-Fragment 1. (b) Einfluss der Sequenzlänge auf die mittlere Fluoreszenzintensität. Fehlerbalken: SEM mit $n = 41-59$ Beads. Probenpräparation nach Tabelle 3.2 & 3.4, Seite 34 ff.

paarungen im Falle von Fänger 2 und eine Erweiterung um vier weitere starke und eine schwache Basenpaarung bei Fänger 3 (siehe Tabelle 3.1, Seite 31). Nach der Faustregel, dass ein zusätzliches A:T Basenpaar die Schmelztemperatur um $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ und ein G:C Basenpaar diese um $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ steigert [Southern et al., 1999], ist für den Einsatz von Fänger 2 die Schmelztemperatur T_m um $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ und für den Einsatz von Fänger 3 um $34\text{ }^{\circ}\text{C}$ gegenüber Fänger 1 erhöht. Diese Betrachtung schließt die Wechselwirkungen der zusätzlichen Nukleotide zu denen der unmittelbaren Nachbarschaft durch Stapelwechselwirkungen⁶ allerdings nicht mit ein und ist daher ungenau. Demzufolge wurde die genaue Simulation der Bindung der capDNA:tDNA Dimere nach [Markham and Zuker, 2005] unter Einbeziehung des Nächster-Nachbar-Koeffizienten⁷ [SantaLucia, 1998] durchgeführt. Die Berechnungen ergeben unter den vorherrschenden Reaktionsbedingungen eine Temperatur von $71,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ für Fänger 1, $78,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ für Fänger 2 und $81,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ für Fänger 3 als Schmelzpunkt des Doppelstrangs mit der tDNA. Viel entscheidender als die Stabilität des Dimers ist in diesem Zusammenhang folglich die Beschaffenheit des freien (5') Endes der capDNA-Sequenz. Während dieses bei Fänger 2 mit Thymin gefolgt von Adenin endet, weist das 5'-Ende von Fänger 3 Guanin und Cytosin auf. Da terminale G:C Paarungen signifikant höhere Hybridisierungsausbeuten erzeugen als das A:T Pendant [Maskos and Southern, 1993], ist der starke Unterschied der Detektionseffizienz zwischen Fänger 2 & 3 vielmehr mit diesem Effekt zu erklären.

⁶engl.: Stacking Interactions

⁷engl.: Nearest Neighbor

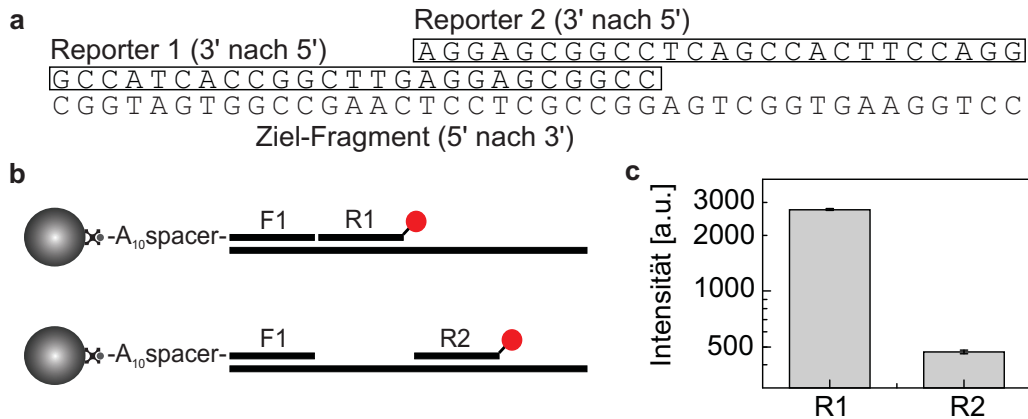


Abbildung 4.13: Einfluss der Position des Reporters auf dem Ziel-Fragment. (a) Schematische Darstellung der Unterschiede in der Sequenz. (b) Schematische Darstellung der Unterschiede in der Position. (c) Einfluss der Position auf die mittlere Fluoreszenzintensität. Fehlerbalken beschreiben den SEM mit $n = 52 - 63$ Beads. Probenpräparation nach Tabelle 3.2 & 3.4, Seite 34 ff.

4.2.3 Einfluss der Binderegionen von detDNA und capDNA

Neben der Erhöhung des Akkumulationsprozesses durch Verlängerung der capDNA ist der Einfluss der bindenden Regionen ein elementarer Faktor, der sich stark in der Hybridisierungseffizienz niederschlägt. So können schon geringfügige Änderungen in der Sequenz oder aber der Abfolge der Nukleotide einen Einfluss auf die Hybridisierungseffizienz haben [Southern et al., 1999]. Für die Detektion von Fragmenten des Organismus *M. luteus* konnten die Auswirkungen dieses Effektes durch Verschiebung der Sequenz der detDNA um 15 Nukleotide in 3'-Richtung der tDNA gezeigt werden (Abb. 4.13). Trotz gleicher Länge der Fragmente und 10 identischen Basenpaarungen mit der detDNA kommt durch Einsatz von Reporter 1 eine um 50 % erhöhte Detektionseffizienz zustande. Ei-

Tabelle 4.1: Thermodynamische Details des detDNA-tDNA Doppelstrangs von Reporter 1 & 2. Berechnungen nach [Markham and Zuker, 2005] basieren auf einer Na^+ Konzentration von 1 M und einer Reaktionstemperatur von 37°C. ΔG : Gibbs-Energie, ΔH : freie Energie, ΔS : Entropie, T_m Schmelzpunkt.

Oligo Name	G:C/A:T	ΔG [kcal/mol]	ΔH [kcal/mol]	ΔS [cal/mol/K]	T_m [°C]
Reporter 1	2,57	-37,3	-206,6	-545,8	88,4
Reporter 2	2,13	-36,4	-201,5	-532,2	88,1

ne Erklärung dafür liefert die Analyse der Komposition der Sequenzen und der thermodynamischen Eigenschaften der detDNA-tDNA Hybride. Die Ergebnisse dieser Betrachtung sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst. Angesichts der starken Ähnlichkeit in der Zusammensetzung der beiden Fragmente kommt es hier zu vergleichbaren Werten; die ungleiche Hybridisierungseffizienz beruht also nicht auf Unterschieden in der Stabilität des Hybrids, sondern auf Inkongruenzen der Duplexbildung. Dergleichen ergibt auch die Untersuchung der Nukleotidfolge der beiden Reporter. Diese identifiziert den entscheidenden Unterschied beider Fragmente in Form der Gestaltung der terminalen Enden. Vergleichend zu Reporter 2 ist der Anteil der starken Basenpaarungen bei Reporter 1 beidseitig stärker ausgeprägt. Diese Eigenschaft begünstigt die Bildungsrate des transienten Nukleationskomplexes durch Interaktion einiger weniger Basenpaarungen [Mir, 1995]. Ausgehend von diesen Regionen kann die Nukleation der Duplexbildung anschließend reißverschlussartig fortschreiten [Southern et al., 1999]. Bezüglich der Duplexbildung ist ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen Reporter 1 und Reporter 2 durch ihre relative Lage zu dem Fänger-Fragment gegeben. Basierend auf einer Lücke von 15 Nukleotiden zwischen Reporter 2 und dem Fänger-Fragment wird das Fortschreiten des Hybridisierungsprozesses an dieser Stelle unterbrochen. Im Gegensatz dazu ist die Lage von Reporter 1 auf dem Ziel-Fragment bündig zu der Sequenz der capDNA (siehe Abb. 4.13b). Neben der Bindungsrate ist also die Bildung der Helixstruktur durch diese Konstellation begünstigt. Da sich Stapelwechselwirkungen stärker auf die Stabilität eines Doppelstrangs auswirken als Basenpaarwechselwirkungen [Yakovchuk et al., 2006] ist in dieser Kombination von Fänger- und Reporteroligonukleotid auch die Gesamthybridisierungseffizienz, also die des Akkumulations- sowie die des Markierungsprozesses, am deutlichsten ausgeprägt. Dies zeigt auch der Vergleich der Intensitätswerte dieser Kombination mit der von Fänger 3 mit Reporter 2 (siehe Abb. 4.12b). Akkumulations- und Markierungsprozess können also nicht voneinander losgelöst betrachtet werden.

4.2.4 Erhöhung der Affinität durch Modifikation der capDNA

Wie in den vorhergehenden Abschnitten beschrieben, ist die Steigerung der Effizienz des Akkumulationsprozesses durch Verlängerung der capDNA aus zweierlei Gründen nicht zweckmäßig. Erstens wirkt die Verlängerung der Fragmente sich negativ auf die maximal mögliche Funktionalisierungsdichte der capDNA aus und zweitens führt sie zu konkurrierenden Binderegionen mit Reporter 1. Um die Affinität des Fänger-Fragments trotz der Vermeidung einer Verlängerung zu steigern, wurde das Nukleotidrückgrat der capDNA Sequenz punktuell

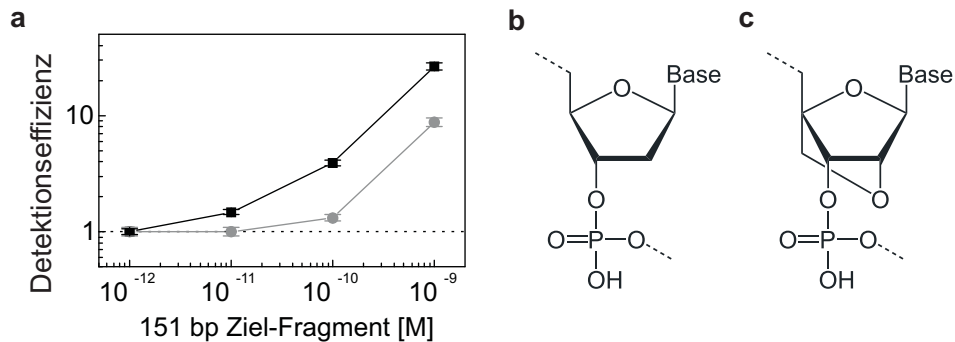


Abbildung 4.14: Erhöhung der Akkumulationseffizienz durch Einsatz von LNA modifizierter capDNA. (a) ● DNA Fänger-Oligos, ■ LNA modifizierte capDNA. Die gestrichelte Linie zeigt das Intensitätslevel der Nullprobe an. Fehlerbalken: SEM mit $n=60-89$ Beads. (b) DNA Nucleotid. (c) LNA Nucleotid. Probenpräparation nach Tabelle 3.2 & 3.4, Seite 34 ff.

modifiziert. Dafür wurden einzelne DNA-Nucleotide durch LNA⁸-Nucleotide [Obika et al., 1997; Koshkin et al., 1998] substituiert. Das sind modifizierte RNA-Nucleotide, deren Ribose-Bestandteil durch eine zusätzliche Brücke zwischen dem 2'-Sauerstoff und dem 4'-Kohlenstoff erweitert ist (Abb. 4.14b & c). Diese Brücke fixiert die Ribose in der energetisch günstigen C3'-endo Form, also ihrer natürlichen Konformation innerhalb einer A-Helix, in der das Phosphat, bedingt durch Rotation während der Bindung, nicht mit dem 2'-O des Furanose-Rings der Ribose sterisch interferiert. Diese Konformation begünstigt die Interaktion der entsprechenden Base zu ihrem komplementären Gegenstück sowie die hybridisierungsbedingte Windung des Nucleotidrückrats zu einer Helix. Dies führt zu einer erhöhten Affinität sowie Reaktionskinetik des Hybridisierungsvorgangs [Vester and Wengel, 2004; Arora et al., 2008] und einer höheren Stabilität der Hybride [Kaur et al., 2008].

Die Auswirkungen solcher chimären DNA:LNA Fänger-Fragmente auf die Detektionseffizienz sind in Abbildung 4.14 dargestellt. Die Inkorporation der LNA-Nucleotide erfolgte dabei aus bereits diskutierten Gründen an den beiden terminalen Basenpaaren sowie in regelmäßigen Abständen auf der capDNA. Bei einer Inkubationszeit von 15 Minuten konnte durch Anwendung dieser Strategie die Sensitivität um eine Größenordnung von 100 pM (capDNA) auf 10 pM (LNA modifizierte capDNA) gesteigert werden. Neben der verbesserten Affinität der capDNA ist hier vor allem die schnellere Reaktionskinetik für die höhere Sensitivität verantwortlich.

⁸engl.: Locked Nucleic Acid

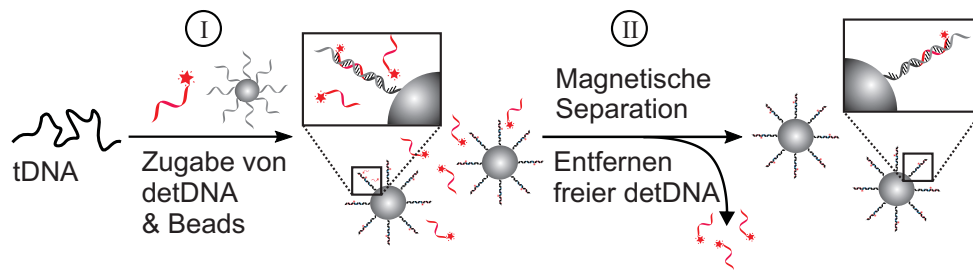


Abbildung 4.15: Prozedurschema zur Quantifizierung einzelsträngiger Ziel-Fragmente (tDNA). CapDNA funktionalisierte Beads (2,8 μm) und detDNA-Fragmente werden der Probelösung beigegeben, für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gewaschen.

4.2.5 Einzelsträngige und doppelsträngige Ziel-Fragmente

Die Prozeduren der Quantifizierung von einzel- bzw. doppelsträngigen Ziel-Fragmenten unterscheiden sich stark hinsichtlich der Komplexität der Probenpräparation. Während der Nachweis von Einzelsträngen (ss DNA⁹) ausschließlich auf der Markierung sowie der Akkumulation der tDNA auf der Beadoberfläche beruht, ist die Gewährleistung der Zugänglichkeit der Ziel-Sequenz der tDNA die Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Detektion von Doppelsträngen (ds DNA¹⁰).

Quantifizierung einzelsträngiger Ziel-Fragmente

Mit dem Anspruch des Einsatzes in POCT-Anwendungen wurde die Prozedur der Quantifizierung von ssDNA so simpel wie möglich gehalten. Auf Grund dieser Voraussetzung wurde auf mögliche Heizschritte in Form von Temperaturprogrammen trotz der Erwartung einer gesteigerten Hybridisierungseffizienz [Archer et al., 2006] verzichtet. Dies führt zu einer Nachweisprozedur, die in zwei Prozessschritten durchgeführt werden kann. Nach Zugabe von capDNA-funktionalisierten Beads und detDNA zu der Probe der tDNA und einer anschließenden einstündigen Inkubationsphase folgt lediglich ein Waschschrift zur Vervollständigung der Prozedur (Abb. 4.15). Um die Ausprägung der Oberflächenadsorption (Kapitel 4.1.3) zu minimieren, wurde dem Waschpuffer die Detergens Polysorbat 20 zugesetzt und die Probe bei jedem Waschschrift für jeweils 5 Sekunden bei 1500 rpm geschüttelt.

⁹engl.: single stranded DNA

¹⁰engl.: double stranded DNA

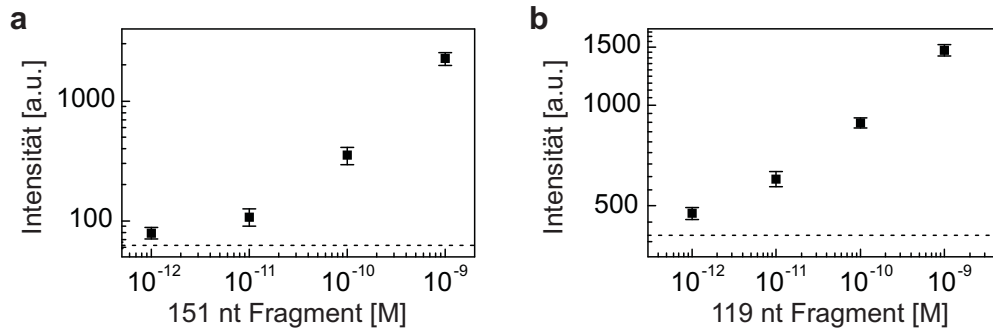


Abbildung 4.16: Detektion einzelsträngiger Ziel-Fragmente. (a) Synthetisches Fragment des Organismus *M. luteus* (Ziel-Fragment 1). (b) Synthetisches Fragment des Organismus *S. pneumoniae* (Ziel-Fragment 2). Dargestellt ist das Arithmetische Mittel der Mittelwerte dreier unabhängiger Messungen. Gestrichelte Linie: Intensitätslevel der Blindprobe; Fehlerbalken: SEM. Probenpräparation nach Tabelle 3.2 & 3.4, Seite 34 ff.

Abbildung 4.16 verdeutlicht die Effizienz der Detektion von synthetischen ss-tDNA-Fragmenten. Hier zeigt sich, dass trotz der Einfachheit der Quantifizierungsprozedur und der Vermeidung einer Vervielfältigung des Signals oder magnetisch induzierter Beadbewegung, Detektionssensitivitäten von 1 pM erreicht werden können. Aufgrund des relativ niedrigen Schmelzpunktes der capDNA:tDNA und der detDNA:tDNA Doppelstränge des *S. pneumoniae* Fragments von $T_m = 41,2$ °C beziehungsweise $T_m = 50,1$ °C ist diese Nachweisprozedur ohne Zuführung von Wärme bei Raumtemperatur durchführbar. Dies ist insbesondere bei der Benutzung der Biotin-Streptavidin Bindung zur Funktionalisierung der Beads von großer Bedeutung, da diese ab Temperaturen von 60°C degradiert [Holmberg et al., 2005].

Quantifizierung doppelsträngiger Ziel-Fragmente

Wie am vereinfachten Beispiel der Detektion einzelsträngiger tDNA gezeigt, kann der hybridisierungsbedingte Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen mit wenig Aufwand durchgeführt werden; der Prozess der Markierung der tDNA und dessen Akkumulation auf Beads ist also unter einfachen Bedingungen möglich. Da in relevanten Patientenproben die Erreger-DNA jedoch als Doppelstrang vorliegt, muss für einen erfolgreichen Nachweis die Separation der Ziel-Sequenz von seinem Komplement gegeben sein.

Um dies zu gewährleisten wurde die Nachweisprozedur nach Abbildung 4.17 um einen zusätzlichen Prozessschritt erweitert. In diesem werden die Proben in Anwesenheit eines starken Überschusses (1 μ M) an Hilfs-Fragmenten auf 95°C

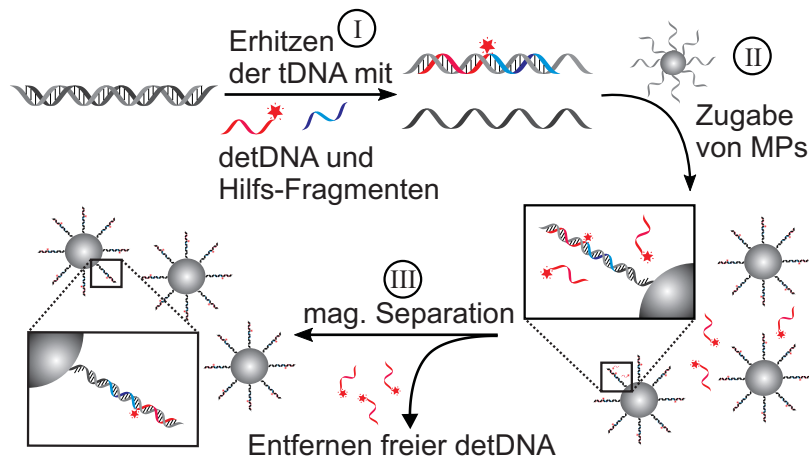


Abbildung 4.17: Prozedurschema zur dsDNA(tDNA) -Quantifizierung.

erhitzt. Die hohe Temperatur sorgt dabei für die effiziente Denaturierung des Doppelstrangs [Archer et al., 2006], während der Einsatz der Hilfs-Fragmente, die neben den detDNA- und capDNA-bindenden Regionen auf der Ziel-Sequenz hybridisieren (Abb. 4.18), die Zugänglichkeit für Fänger- und Reporterfragmente gewährleistet. Aufgrund der schnelleren Bindungskinetik der Hilfs-Fragmente während des Abkühlungsvorgangs der Probelösung [Minunni et al., 2004] entstehen geblockte Regionen auf der tDNA, die eine Re-Hybridisierung des nativen Komplements an die Ziel-Sequenz verhindern [Hill et al., 2007; Minunni et al., 2005].

Die temporäre Separation von Hybridisierung der Oligonukleotide (Abb. 4.17 I) und der Akkumulation der Ziel-Komplexe auf Mikropartikeln (Abb. 4.17 II) hat den Vorteil, dass die Möglichkeit der Anwendung der Streptavidin-Biotin Bindung zur Funktionalisierung der Beads erhalten bleibt. Ferner lässt sich durch Vergleich der Detektionssensitivität von Einzel- und Doppelstrangdetektion der Einfluss der Separation des Doppelstrangs auf die Sensitivität der Quantifizierungsmethode klarlegen. So führt die Quantifizierung von dsDNA mit einer Nachweisgrenze von 10 pM zu einem Verlust von etwa einer Größenordnung an Empfindlichkeit.

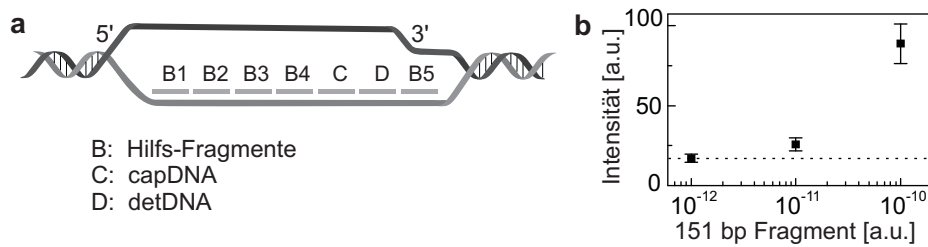


Abbildung 4.18: Detektion von doppelsträngigen Fragmenten. (a) Anordnung der hybridisierenden Oligonukleotide auf dem tDNA-Fragment. (b) Detektionssensitivität. Probenpräparation nach Tabelle 3.2 & 3.4, Seite 34 ff.

4.3 Der Markierungsprozess (Das Reportersystem)

Der Nachweis der auf der Beadoberfläche fixierten Ziel-DNA Fragmente erfolgt durch Hybridisierung eines Reporter-Oligonukleotids. Die Markierung dieses Fragments kann dabei durch Amidbindung oder Biotin-Streptavidin-Wechselwirkungen ermöglicht werden. Die Möglichkeiten für die Verwendung unterschiedlicher fluoreszierender Label sind entsprechend groß und verschiedenste Vorgehensweisen sind für die Anwendung in DNA-Assays in der Literatur beschrieben. Neben dem Einsatz von Nanokristallen [Liu et al., 2008; Kim et al., 2006], fluoreszierenden Mikro- bzw. Nanobeads [Mayr et al., 2009] oder Interkalatoren können auch Fluorophore [Klamp et al., 2013] bzw. Molecular Beacons [Horejsh et al., 2005] für die Markierung genutzt werden. Die unterschiedlichen Arten der Label weisen dabei neben spezifischen Vorteilen allerdings auch Probleme bei der Verwendung in beadbasierten Assays auf. Um die Vor- und Nachteile der verschiedenen Markierungsmöglichkeiten zu identifizieren, wurde zunächst eine Charakterisierung bezüglich der Anwendbarkeit im vorliegenden Nachweisverfahren durchgeführt.

4.3.1 Geeignete Fluoreszenzlabel

Aufgrund ihrer überdurchschnittlichen Helligkeit und Photostabilität bieten sich vor allem Halbleiternanokristalle (NC) oder Mikro- bzw. Nanobeads mit Farbstoffeinschlüssen für die Markierung an. Besonders auf großen Zeitskalen sind fluoreszierende Nanobeads und NCs organischen Farbstoffen wie Cyaninen (Alexa 647) und Carbo-Rhodaminen (ATTO 647N) der Stabilität bezüglich überlegen (Abb. 4.19 a). Bei einer Belichtungsdauer von 14 Sekunden fällt die Anfangsintensität des Fluoreszenzsignals von auf einer Beadoberfläche fixierten Alexa 647 beziehungsweise ATTO 647N Molekülen auf 21 % bzw. 31 %.

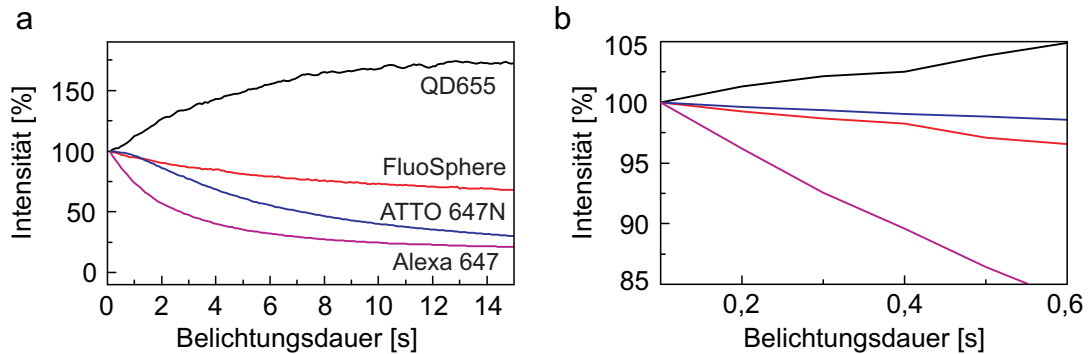


Abbildung 4.19: Photobleaching unterschiedlicher Fluoreszenzlabel, fixiert auf der Oberfläche von 8 μm großen Beads (CM01N, Bangs Laboratories) und angeregt mit einer Leistungsdichte von 56 W/cm^2 . Die Intensitäten wurden auf 100 % bei $t = 0$ normalisiert.

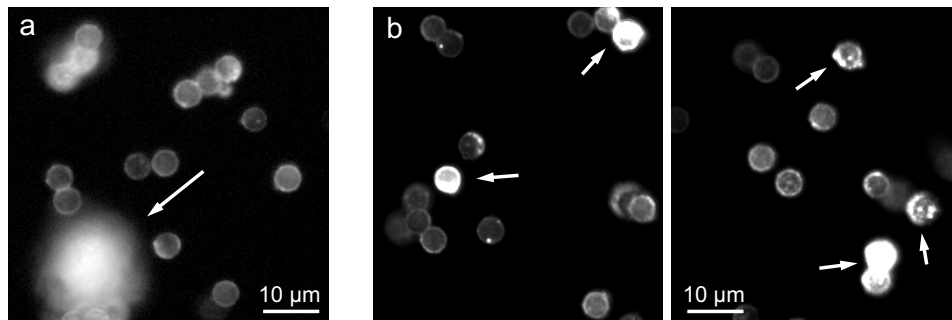


Abbildung 4.20: Aggregation von QD 655 auf der Oberfläche der (a) Probenkammer (logarithmische Graustufenskalerung) und (b) der Beads (lineare Graustufenskalerung) während der Detektion 5 kbp langer Ziel-Fragmente (1 nM). Probenpräparation nach Kapitel 3.5.2, Seite 38.

Im Gegensatz dazu ist die Emissionsintensität der mit FluoSpheres markierten Beads unter identischen Bedingungen nach gleicher Belichtungszeit bei 70 % des Ausgangssignals, während die der NC beschichteten Partikel sogar ansteigt. Der 73 %ige Anstieg ist mit photoinduzierter Aktivierung einzelner NCs durch Oberflächen-Transformation zu erklären [Jaiswal et al., 2003; Hess et al., 2001] und führt, ähnlich dem Effekt des Photobleaching, zu einer zeitlichen Inkonsistenz des Signals. Im Bereich der relevanten Belichtungszeiten (100 bis 500 ms) beträgt die Abweichung allerdings maximal 3 %. Dies macht Halbleiternanokristalle in Verbindung mit einem hohen Extinktionskoeffizienten über einen großen Wellenlängenbereich sowie einer hohen Quantenausbeute von fast 90 % [Reiss et al., 2002] grundsätzlich zu einem attraktiven Label.

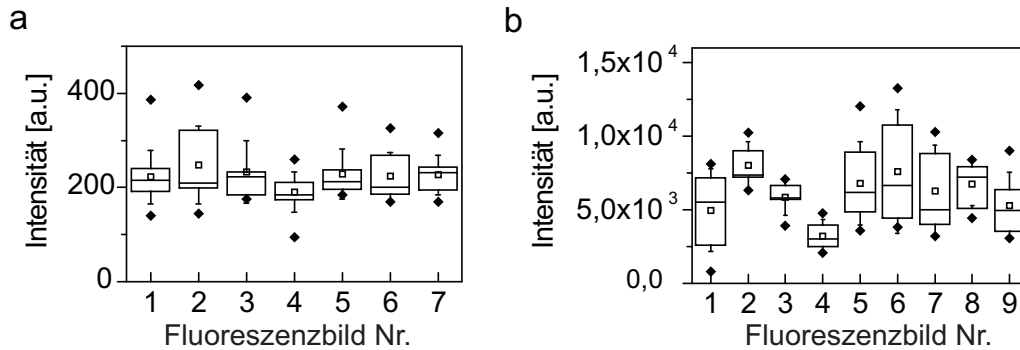


Abbildung 4.21: Vergleich der Streuung der Beadintensitäten zwischen unterschiedlichen Fluoreszenzbildern für (a) ATTO 647N und (b) QD 655 als Fluoreszenzlabel. Box: Interquartilsabstand und Median, \square arithmetischer Mittelwert, Fehlerbalken S.D., \blacklozenge kleinster und größter Wert.

Ein entscheidender Nachteil der NCs ist allerdings ihre Tendenz zur Aggregatbildung. Dies zeigt der Einsatz von Streptavidin modifizierten NCs (QD 655) als Label zur Markierung biotinylierter detDNA (Fänger 6, Reporter 3, siehe Tab. 3.1). Die Aggregate treten dabei sowohl auf der Oberfläche der Probekammern als auch auf den Beads auf (Abb. 4.20). Während die Artefakte auf der Oberfläche der Probenkammern durch Anwendung des Selektionsalgorithmus (Kapitel 3.3) im Rahmen der Auswertung verworfen werden, führen Cluster auf den Beads zu einer großen Streuung der Beadintensitäten. Die Analyse der Intensitätsverteilungen der Beads bei der Quantifizierung von 5 kbp langen Ziel-Fragmenten (Ziel-Fragment 3) mit QD 655 markierter detDNA verdeutlicht diesen Nachteil vergleichend zu ATTO 647N markierter detDNA (Abb. 4.21). Die großen Streuungen der Intensitätsmittelwerte einzelner Beads verhindern in diesem Fall die Diskriminierung geringer DNA-Konzentrationen und senken damit die Detektionsgrenze.

Im Zusammenhang des Clusterings ergibt sich ein weiterer Nachteil aus der Verwendung der Biotin-Streptavidin Bindung zur Markierung der detDNA. Bei gleichzeitiger Zugabe von Beads, biotinylierter detDNA und Streptavidin funktionalisierter NCs ist die Ausprägung der Aggregatbildung sowohl auf der Oberfläche der Probekammern als auch auf Beads erheblich verstärkt (Abb. 4.22). Dieser Effekt kann durch Einfügen eines weiteren Waschschruttes zwischen detDNA und NC Zugabe zwar vermindert, aber nicht vollständig vermieden werden (vergleiche Abb. 4.20). Zudem erfordert dies einen weiteren Prozessschritt, was sich nicht nur auf die Komplexität, sondern auch auf die Dauer der Nachweisprozedur negativ auswirkt.

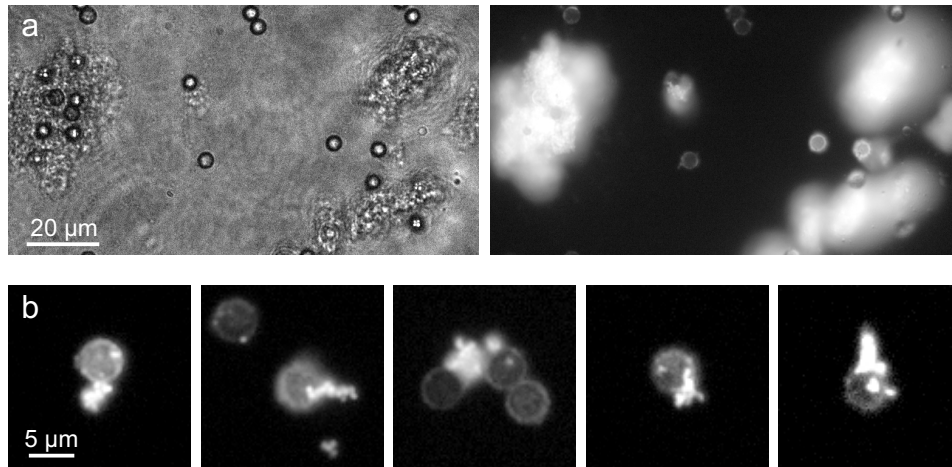


Abbildung 4.22: Aggregation von QD 655 auf der Oberfläche der (a) Probenkammer (logarithmische Graustufenskalerung) und (b) der Beads (logarithmische Graustufenskalerung) bei gleichzeitiger Zugabe von detDNA und QDs. Probenpräparation nach Kapitel 3.5.2, Seite 38.

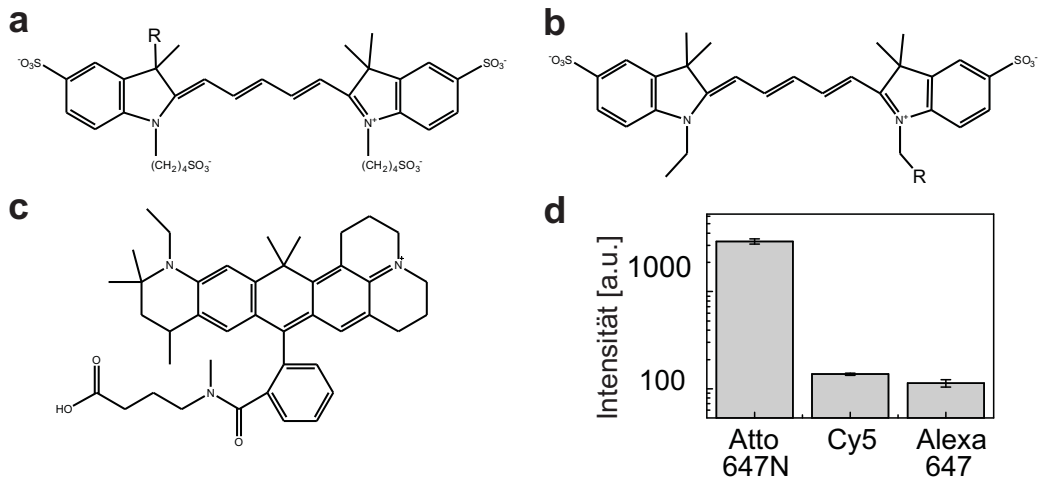


Abbildung 4.23: Chemische Strukturen der benutzten Fluorophore und deren Adsorption auf Beads. (a) Alexa 647 [Terpetschnig et al., 2004], (b) Cy5, (c) ATTO 647N [Egging et al., 2009], (d) nicht-spezifische Adsorption auf Beads. Die N-hydroxysuccinimidyl Ester -Funktionalisierung der Farbstoffe (R) wurde vor Zugabe zu freien Beads zu Carboxylsäure hydrolysiert. ATTO 647N Beads wurden mit einer Belichtungszeit von 10 ms, Cy5 und Alexa 647 Beads mit einer Belichtungszeit von 100 ms aufgenommen. Fehlerbalken: SEM mit $n = 50$.

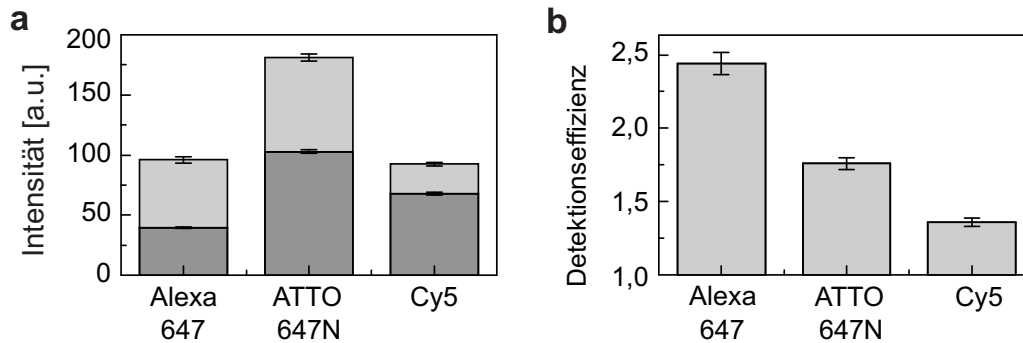


Abbildung 4.24: Vergleich der Detektionseffizienz unter Verwendung verschiedener Fluorophore als Label. (a) Zusammensetzung des Gesamtsignals aus ■ NSH und ■ spezifischen Signal. (b) Detektionseffizienz. Fehlerbalken: SEM mit $n = 48 - 122$ Beads für die Detektion von 5 kbp Ziel-Fragmenten (Ziel-Fragment 3, 1n M). Probenpräparation nach Tabelle 3.2 & 3.4, Seite 34 ff.

Derselben Einschränkung unterliegt der Einsatz von mit Streptavidin funktionalisierten, fluoreszenten Mikrobeads. Diese Art des Labels ist wegen seiner photophysikalischen Eigenschaften besonders in der Mikroarray-Technologie sehr beliebt [Nagl et al., 2005]. Auf Grund der Abschirmung der in einer Polymerhülle eingebetteten Fluorophore vor Einflüssen des Mediums sowie einer damit einhergehenden strukturellen Stabilität verfügen diese Partikel über eine hohe Photostabilität. Zudem führt die Akkumulation mehrerer fluoreszenter Moleküle in einem Partikel zu einem starken Fluoreszenzsignal. Die Betrachtung der relevanten Zeitskalen, im Bereich von 100 bis 1000 ms, zeigt jedoch, dass der Vorteil einer erhöhten Photostabilität erst ab einer Belichtungszeit $> 1,5$ s zum Tragen kommt (Abb. 4.19). Unterhalb dieser Bestrahlungsdauer weist der Carbo-Rhodamin Farbstoff ATTO 647N eine vergleichsweise konstantere Emissionsintensität auf. Weiter birgt der Einschluss der Fluorophore in einer Polymermatrix besonders in Verbindung mit beadbasierten Assays eine erhebliche Beschränkung in sich. Da es sich bei den meisten Produkten um eine Polystyren-Hülle handelt, führen die hydrophoben Eigenschaften dieser Mikropartikel zu einem stark erhöhten NSH auf der Beadoberfläche [Mayr et al., 2009], dessen Verminderung mit erheblichem Aufwand verbunden ist [Wang et al., 2005].

Da die Stärke des durch Oberflächenadsorption bedingten NSH durch die Hydrophobizität des Labels bestimmt wird, gilt Gleiches auch für den Einsatz von Fluorophoren. Dies bestätigt auch der Vergleich der Intensitätslevel von freien, unbelegten Beads, die jeweils einer Farbstofflösung von ATTO 647N, Alexa 647 oder Cy5 ausgesetzt wurden (Abb. 4.23). ATTO 647N wird dabei

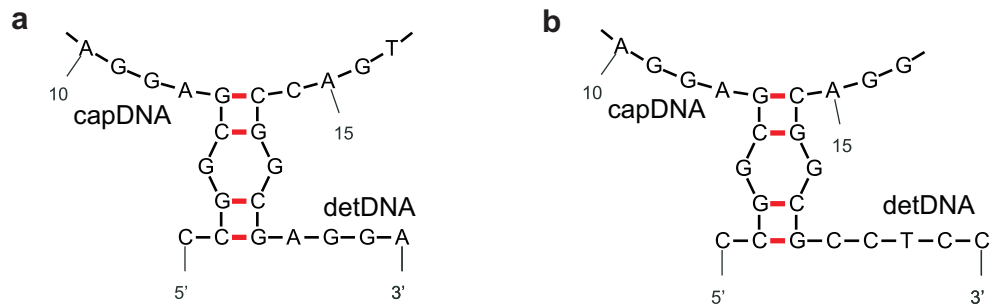


Abbildung 4.25: Simulation der Kreuzhybride zwischen detDNA und capDNA nach [Markham and Zuker, 2005]. (a) Reporter 7 (b) Reporter 3. Reaktionsbedingungen: 1 mM [NaCl], 1 nM [tDNA], Temp. = 60 °C.

auf Grund der hydrophoben Eigenschaften am stärksten auf der Beadoberfläche adsorbiert. Der Vergleich zwischen Alexa 647 und Cy5 zeigt, einer starken strukturellen Ähnlichkeit zum Trotz, einen geringen Unterschied der Intensitäten. Dieser ist mit kleinen Abweichungen in der Struktur der Fluorophore zu erklären: Das Einfügen zweier Sulfonsäure-Gruppen im Alexa 647 Molekül sorgt für eine negative Gesamtladung und somit für eine im Vergleich zu Cy5 erhöhte Hydrophilie.

Der Einfluss dieses Effektes auf den Gesamt-NSH, also Wechselwirkungen zwischen detDNA und captDNA mit eingeschlossen und damit auf die Detektionseffizienz, lässt sich durch Detektion von 5 kbp langen DNA Fragmenten (1 nM) nachweisen. Abbildung 4.24 verdeutlicht, dass trotz nahezu gleichem Gesamtsignal, die Detektionseffizienz mit Einsatz des Alexa 647 Label, bedingt durch einen geringeren NSH, gegenüber dem Ansatz mit Cy5 Label verbessert ist. Auf der anderen Seite ist das geringere spezifische Signal unter Verwendung der Cy5 markierten detDNA ein Grund für die niedrige Detektionseffizienz. Dies ist durch Abweichungen in der Sequenz des detDNA Fragments zu begründen. Wie simulierte Untersuchungen der Bindung von Reporter 7 bzw. Reporter 3 mit der entsprechenden tDNA-Sequenz zeigen, hat die veränderte Nucleotidsequenz des Cy5 detDNA Fragments allerdings keinen Einfluss auf die Stärke der Kreuzreaktivität zwischen capDNA und detDNA (Abb. 4.25). Trotz der veränderten Sequenz kann der Anstieg des NSH also auf die geringfügig erhöhte Hydrophobizität des Cy5 Labels zurückgeführt werden. Darüber hinaus ist in Abbildung 4.24b zu erkennen, dass die ATTO 647N Markierung entgegen der vergleichsweise höheren Photostabilität als Label im beadbasierten Assay zu einer geringeren Detektionseffizienz führt. Die Eignung eines Labels wird demnach durch die Hydrophobizität und nicht durch die Photostabilität kontrolliert.

Um die Vorteile der hohen Photostabilität von ATTO 647N trotz der hydro-

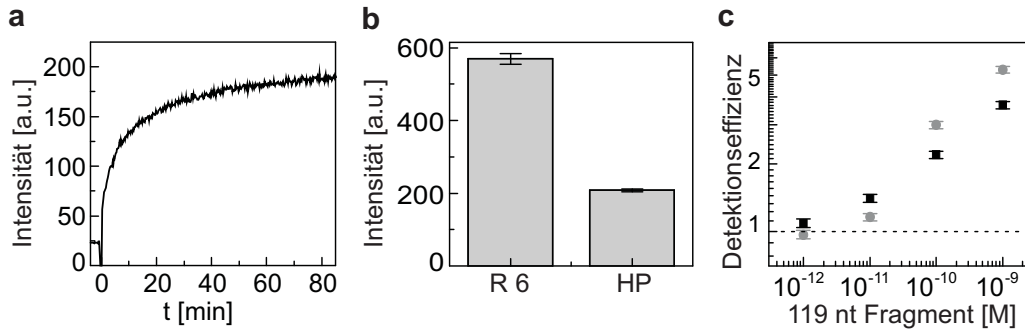


Abbildung 4.26: Benutzung eines Hairpins während der Detektion von 119 nt Fragmenten des Organismus *S. pneumoniae*. (a) Öffnungsvorgang des Hairpins während der Hybridisierung, gemessen im Ensemble. (b) Vergleich des NSH zwischen Reporter 6 (standard Reporter, R6) und Reporter 5 (Hairpin, HP) mit jeweils ATTO 647N Label. (c) Vergleich der Detektionseffizienz zwischen Reporter 5 (●) und Reporter 6 (■). Fehlerbalken: SEM mit $n = 45-52$ Beads. Probenpräparation nach Tabelle 3.2 & 3.4, Seite 34 ff.

phoben Eigenschaften des Moleküls nutzen zu können, ist der Einsatz von Molecular Beacons [Tyagi et al., 1996] denkbar. Das sind DNA-Sonden, deren Nukleotidsequenz des 3'-Endes komplementär zu der des 5'-Endes ist und deren Enden einerseits mit einem fluoreszierenden Molekül und andererseits mit einem Quencher funktionalisiert sind. Dies führt in freier Lösung zu einem hybridisierungsbedingten Kontakt der beiden Enden und somit zu einem Löschprozess der Fluoreszenz. Der mittlere Teil der Sequenz der Sonden bildet dadurch eine schleifenartige Form, die dieser Art Sonden auch den Namen Hairpin¹¹ verleiht. Bei Bindung des Mittelteils des Oligomers an eine komplementäre Zielsequenz öffnet sich die Schleifenform und es entsteht unter Anregung des Farbstoffes ein molekulares Leuchtsignal¹².

Die Herstellung eines solchen Reporters lässt sich durch geringfügige Modifikation eines bestehenden detDNA Fragments durchführen. Ein solches Hairpin wurde für die Detektion des 119 nt Ziel-Fragments des Organismus *Streptococcus pneumoniae* (Ziel-Fragment 2, Tabelle 3.1) entwickelt. Dafür wurde eine 13 Nukleotide lange, Ziel-Fragment spezifische Sequenz als Mittelteil benutzt, deren Enden um jeweils fünf Nukleotide erweitert wurden (Reporter 5, Tabelle 3.1). Weiter wurde dem 5'-Ende das Fluorophor ATTO 647N hinzugefügt und das 3'-Ende mit dem Quencher BBQ 650 funktionalisiert. Die jeweils letzten fünf endständigen Nukleotide bilden so den Stamm und die 13 mittig gelegenen

¹¹engl.: Haarnadel

¹²engl.: Molecular Beacon

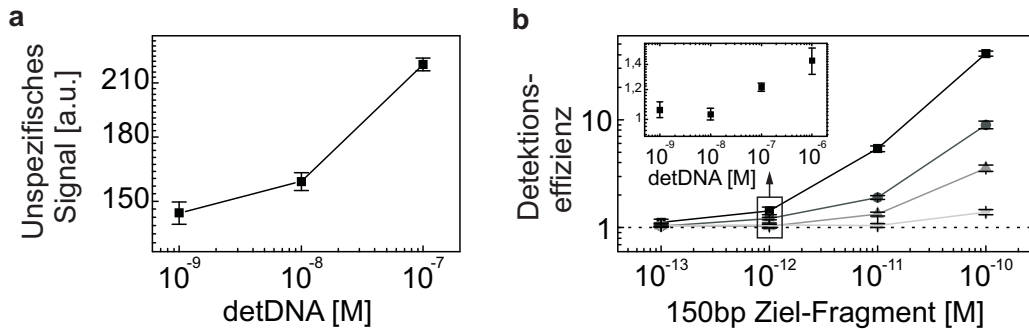


Abbildung 4.27: Einfluss der Reporter-Konzentration bei der Detektion von *M. luteus*-Fragmenten mit ATTO 647N funktionalisierter detDNA. (a) Abhängigkeit des NSH und (b) der Detektionseffizienz von der Reporterkonzentration. ■ 1 μM , ● 100 nM, ▲ 10 nM, ▼ 1 nM. Das eingebettete Diagramm zeigt die Detektionseffizienz als Funktion der Reporterkonzentration mit 1 pM [Ziel-Fragment]. Die Fehlerbalken stellen den SEM mit $n=63\text{-}127$ Beads dar. Probenpräparation nach Tabelle 3.3 & 3.4, Seite 34.

Nukleotide die Schleife des Hairpins. Abbildung 4.26a verdeutlicht durch einen siebenfachen Anstieg der Emissionsintensität während der Bindung des HPs an das Ziel-Fragment die effiziente Löschung des Hairpins in der Abwesenheit des Analyten (bei $t < 0$). Dies zeigt sich auch im Vergleich des NSH bei Benutzung eines herkömmlichen Reporters mit ATTO 647N Label (Abb.4.26b). So kann durch Einsatz des HPs der NSH um circa 65% reduziert werden. Auch die Anzahl der Waschschrte zum Entfernen des Signals der nicht gebundenen Reporter aus der Probelösung lässt sich durch dieses Vorgehen von vier auf zwei verringern. Dem entgegen steht die vergleichsweise niedrige Detektionseffizienz bei gering konzentrierten Proben des Ziel-Fragmentes (Abb. 4.26c). Die Differenz im Bereich von 10^{-12} bis 10^{-11} M ist ein Hinweis darauf, dass die Affinität des HPs geringer ist als die von Reporter 6. Mögliche Gründe könnten Unterschiede in der Länge oder der Position der bindenden Regionen sein. Erfolgt die Bindung des HPs (10^{-10} oder 10^{-9} M) ist trotz geringerer Belegung des Beads die Detektionseffizienz aufgrund des verminderten NSH entsprechend größer.

4.3.2 Einfluss der Reporterkonzentration

Wie obenstehend gezeigt, ist im Vergleich unterschiedlicher Fluoreszenzmarkierungen die Hydrophobizität des Labels der bestimmende Faktor bezüglich der Ausprägung des NSH. Die Darstellung des bindungsbedingten Intensitätsanstiegs durch spezifische Hybridisierung mit Hilfe der Detektionseffizienz γ ermöglicht weiter den direkten Vergleich der Effizienz des gesamten Bindungs-

prozesses, d.h. einschließlich Akkumulations- und Markierungsprozess, bei variierendem NSH.

Neben der Art des Labels ist auch die Konzentration der detDNA maßgeblich für die Stärke des NSH (Abb. 4.27a). Da die Bindungs- bzw. Dissoziationskonstante des Komplexes neben den Konzentrationen der Liganden auch von Faktoren wie der Belegungsdichte der Oberflächenbeschichtung (Kapitel 4.2.1) oder der Art der Beadbewegung (Kapitel 4.1.2) abhängig ist, wurde zur experimentellen Bestimmung der optimalen detDNA-Konzentration eine Titrationsreihe durchgeführt. Auf Grund der Abhängigkeit des NSH von der Konzentration der detDNA, wurde zur Bestimmung der Änderung des Fluoreszenzanstiegs durch Variation der [detDNA] wiederum die Detektionseffizienz als Vergleichsparameter herangezogen. Abbildung 4.27b illustriert in diesem Zusammenhang die Zunahme der Detektionseffizienz in Abhängigkeit der Reporterkonzentration (10^{-8} bis 10^{-6} M) anhand der Detektion von 150 bp doppelsträngigen Fragmenten. Der kontinuierliche Anstieg der Detektionseffizienz bei gegebener Ziel-Fragment-Konzentration (Abb. 4.27b, Einsatzdiagramm) verdeutlicht, dass die Zunahme der Komplexbildung mit Erhöhung der Reporterkonzentration der Zunahme des unspezifischen Signals überwiegt. Die Effizienz des Reportersystems lässt sich somit durch einen starken Überschuss an detDNA erhöhen.

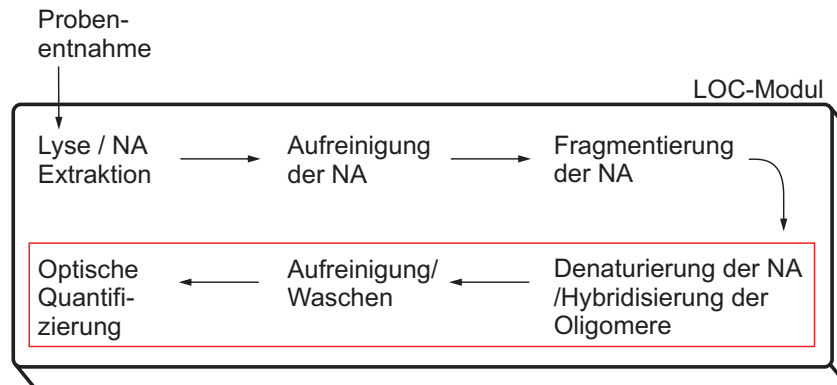


Abbildung 4.28: Schematische Darstellung des Ablaufs des integrierten Nachweisverfahrens (verkürzt). Der rot markierte Bereich stellt den Abschnitt der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Quantifizierungsprozedur dar. NA: Nukleinsäure.

4.4 Implementierung der Anforderungen für die Integration des Verfahrens in LOC-basierten POCT Systemen

Die Integration des Nachweisverfahrens in LOC (Lab-on-a-chip) basierten POCT (Point-of-care-Testing) Instrumenten ist mit spezifischen Anforderungen an die Prozedur des Verfahrens verknüpft. Die Umsetzung dieser Bedingungen sowie die Charakterisierung der Einflüsse auf die Detektionseffizienz sind in diesem Kapitel dargestellt. Weiter werden Strategien zur Optimierung des Verfahrens hinsichtlich dieser Bedingungen aufgezeigt.

4.4.1 Die integrierte LOC-Prozedur

Durch potenzielle Anwendung eines LOC-Systems¹³ ist die Umsetzung der Gesamtprozedur, von der Extraktion der tDNA bis zur Identifizierung der Konzentration des Pathogen-Levels, in einem ganzheitlichen Aufbereitungs- und Analyseprozess vorausgesetzt (Abb. 4.28). Als Konsequenz entstehen aus technischen Gründen Einschränkungen bezüglich der Hybridisierungsbedingungen. Diese sind konkret durch Vorgaben der Pufferbedingungen, der Funktionalisierung der Mikropartikel, der Beschaffenheit der Ziel-Fragmente und durch An-

¹³Entwickelt durch: Institut für Mikrotechnik Mainz GmbH, Carl-Zeiss-Str. 18-20, 55129 Mainz, Deutschland.

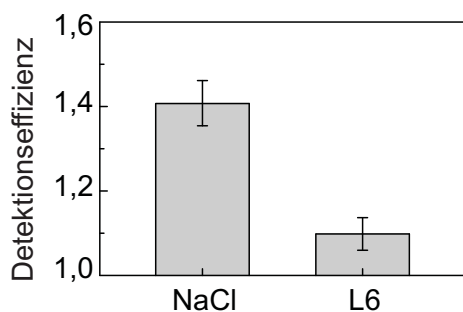


Abbildung 4.29: Qualitative Auswirkungen des Lysepuffers L6 auf die Detektionseffizienz. Der Vergleich wurde bei der Detektion der ds-tDNA 1 (*M. luteus*, 100 pM) unter sonst identischen Bedingungen durchgeführt (Präparationsdetails Tabelle 3.2 & 3.4, Seite 34 ff.). Fehlerbalken: SEM mit $n = 71-81$ Beads.

wesenheit einer hohen Konzentration an Hintergrund-Nukleinsäuren (BgNA) gegeben.

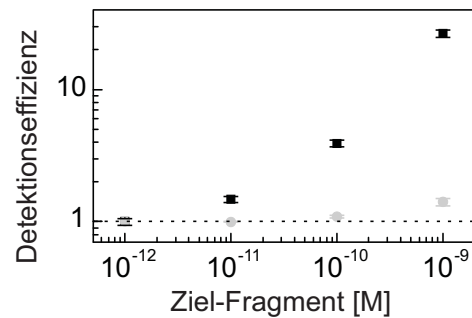
Pufferbedingungen

Die Extraktion der Nukleinsäuren aus den Erregerzellen sowie die Aufreinigung des Lysats beruht auf dem Gebrauch des Lyse-Puffers L6 [Boom et al., 1990]. Der Austausch des Puffers für den anschließenden Hybridisierungsvorgang ist aus mikrofluidischen Gründen allerdings nachteilig. Auch die Aufbewahrung des einmolaren NaCl-Puffers in Reservoirs ist problematisch, da der Trocknungsprozess zu Kristallbildung führt. Aus diesem Grund wurde eine Revision der Auswirkungen des L6 Puffers auf die Detektionseffizienz in einem qualitativen Vergleich durchgeführt (Abb. 4.29).

Der starke Verlust in der Detektionseffizienz lässt sich durch die Abwesenheit der monovalenten Kationen (Na^+) des Natriumchlorids in L6 erklären; dies wirkt sich sowohl auf die Bindungskinetik als auch auf die Stabilität der Doppelbindungen des DNA-Hybrids negativ aus. Weiter destabilisieren Störungen der Wasserstoffbrückenbindung durch das chaotrope Salz Guanidinium thiocyanate (GuSCN) [Hamaguchi and Geiduschek, 1962] des L6-Puffers die Bindung des Doppelstrangs.

Ferner ist der Einsatz von Detergenzien, wie Polysorbat 20, mit Problemen bezüglich der Integration des Nachweisverfahrens in LOC-Kartuschen assoziiert, da diese sich mindernd auf die Oberflächenspannung der Probelösungen und somit nachteilig auf die mikrofluidischen Eigenschaften in Mikrokanälen auswirken. Deren Gebrauch zur Verminderung der nicht-spezifischen Oberflächenadsorption auf Beads ist daher ebenfalls nicht möglich.

Abbildung 4.30: Detektionseffizienz für die Quantifizierung von 5 kbp Ziel-Fragmenten. ● 5 kbp Fragment, ■ 151 bp Ziel-Fragment. Fehlerbalken: SEM dreier unabhängiger Messungen. Probenpräparation nach Tabelle 3.2 & 3.4, Seite 34 ff.



Länge der Ziel-Fragmente

Mit Hinblick auf eine in das Gesamtsystem integrierte Nachweisprozedur ist die Wahl der Ziel-Fragmente von bedeutsamer Relevanz, da für Fragmente realistischer Größe eine geringere Detektionseffizienz zu erwarten ist. Im Anschluss des Aufbereitungsprozesses der DNA der Ziel-Organismen auf dem LOC-Modul [Roeser et al., 2011] ist die Verkürzung der genomischen DNA durch einen dem Nachweisverfahren vorgeschalteten Fragmentierungsvorgang gegeben (siehe Abbildung 4.28). Durch hydrodynamische Scherkräfte können mit Hilfe mikrofluidischer DNA-Fragmentierungs-Chips Fragmentlängen von 5k bp erhalten werden [Shui et al., 2011].

Die Auswirkungen der immensen Verlängerung des doppelsträngigen Ziel-Fragments auf die Detektionssensitivität wurden durch Quantifizierung eines rekombinanten Plasmids von ebenfalls 5k bp Länge (Ziel-Fragment 3, *M. luteus*) und anschließendem Vergleich mit der Quantifizierung von 151 bp detDNA bestimmt. Abbildung 4.30 zeigt, dass der Verlust trotz Verwendung der LNA-modifizierten capDNA mit ein bis zwei Größenordnungen zu beziffern ist. Diese dramatische Abnahme kommt hier durch eine starke Zunahme von Sekundärstrukturen zustande. Die Wahrscheinlichkeit für deren Bildung steigt mit zunehmender Fragmentlänge infolge von Eigenfaltungen durch WATSON-CRICK-Basenpaarungen [Southern et al., 1999]. Dies hat nachteilige Auswirkungen sowohl auf die Markierungs- als auch auf die Akkumulationseffizienz. Zum einen sinkt durch komplexe Sekundärstrukturen des Ziel-Fragments bei ungünstiger Anordnung die Zugänglichkeit für Hilfs- und Reporteroligonukleotide mit folgender Verminderung der Hybridisierungseffizienz. Zum anderen hemmt die strukturbedingte Größe des Knäuels die Annäherung der tDNA an die Oberfläche der Mikropartikel und inhibiert damit die Bindung der capDNA [Southern et al., 1999].

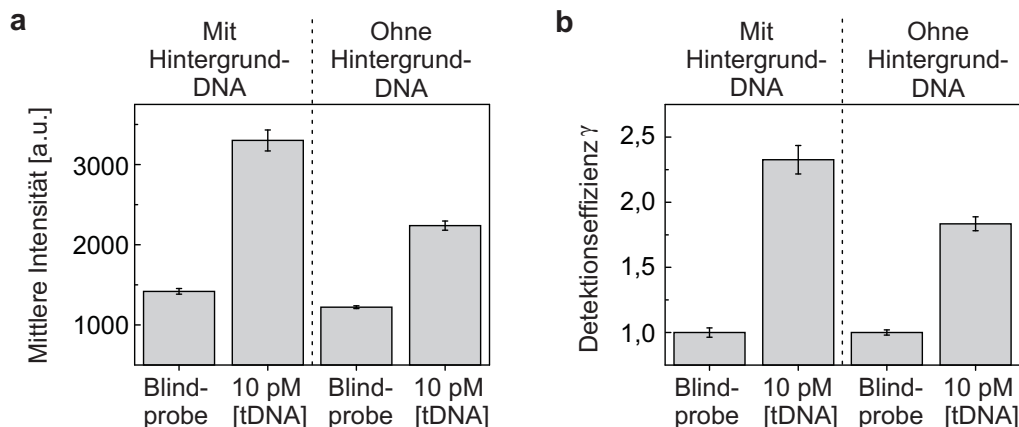


Abbildung 4.31: Test der Spezifität des Nachweisverfahrens. Vergleichende Darstellung der (a) mittleren Beadintensitäten und (b) Detektionseffizienzen γ in der Anwesenheit oder Abwesenheit eines 2000-fachen Überschusses an Nicht-Ziel (Hintergrund-) DNA-Fragmenten (7,5 kbp). Fehlerbalken: SEM mit $n = 40 - 71$ Beads. [Klamp et al., 2013]

Test der Spezifität

Sind die Fänger- und Reporterfragmente nicht exakt bezüglich der Sequenz-Spezifität der tDNA optimiert, so kann es zu ungenauen Identifizierungen aufgrund nicht-spezifischer Kreuz-Hybridisierung mit ähnlichen Sequenzen kommen. Die Art der Proben, für die das Nachweisverfahren entwickelt wurde, beinhaltet eine hohe Diversität an BgNA, gegeben durch unterschiedliche Mikroorganismen. So sind Proben des Sputums durch Entnahme eines Abstrichs aus dem Nasenrachenraum bzw. dem Hals oftmals durch Speichel o.ä. kontaminiert. Neben menschlichen Epithel-Zellen oder Keimen können in derartigen Proben Bakterien der symbiotischen Oralflora enthalten sein. Letztere treten in hoher Diversität auf [Keijser et al., 2008] und besitzen zum Teil eine hohe phylogenetische Ähnlichkeit zu CA-LRTI Organismen. Das Auftreten von eventuellen Kreuzreaktivitäten der eingesetzten Assay-Oligonukleotide mit der Hintergrund-DNA dieser Organismen kann also trotz sorgfältiger Auswahl der Sequenzen nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Dabei wirken sich alle Arten der nicht organismus-spezifischen Identifikatoren (falsch-positiv f/p, falsch-negativ f/n) negativ auf das tatsächliche Quantifizierungsvermögen der Ziel-Fragmente aus.

Um die Spezifität des Quantifizierungssystems qualitativ zu prüfen, wurde die Detektion von 5 kbp langen Ziel-Fragmenten in einer Probe mit einem großem Überschuss (2000-fach) an Hintergrund-DNA durchgeführt. Dabei handelt es

sich um doppelsträngige DNA-Fragmente ähnlicher Länge (ca. 7,5 kbp), die den mit Ziel-DNA versetzten Proben (10 pM) in einer Konzentration von 20 nM beigefügt wurden. Wie Abbildung 4.31 zu entnehmen ist, zeigt die Detektionseffizienz in der Anwesenheit von Hintergrund DNA einen geringen Abfall. Es ist daher davon auszugehen, dass unerwünschte Wechselwirkungen der Assay-Oligonukleotide mit den Fragmenten der Hintergrund DNA auftreten. Die Abnahme des γ -Werts kommt durch eine Verringerung des spezifischen Signals bei nahezu gleichbleibendem Fluoreszenzlevel der Bildprobe zustande und ist mit ca. 22 % relativ gering ausgeprägt. Das Vermögen der Identifizierung einer 10 pM Ziel-Fragment-Konzentration bleibt somit erhalten; auch die Auswirkung auf das LOD (Detektionslimit) ist nur marginal (vgl. Abb. 4.39). Auch wenn die Auswirkungen des Effekts der unspezifischen Wechselwirkungen auf die Detektionseffizienz auf diese Weise bestimmt werden können, besteht die Problematik in der Bewertung der Gründe, so ist keine eindeutige Zuordnung bezüglich der Art der Wechselwirkungen möglich.

Eine grundsätzliche Betrachtung der möglichen Wechselwirkungen lässt folgende Schlüsse zu: Besteht eine Interaktion der Fänger-Oligonukleotide mit Fragmenten der Hintergrund-DNA, kommt es bei gleichzeitiger Interaktion der Reporter-Oligonukleotide mit der Hintergrund-DNA zu einer Erhöhung des Fluoreszenzsignals. Dies ist der dramatischste Fall nicht-spezifischer Wechselwirkungen. Da das falsch-positive (f/p) Signal nicht vom richtig-positiven (r/p), also spezifischen, Signal zu unterscheiden ist, erfolgt damit eine vermeintliche Identifikation des Analyten.

Einer Abnahme des Fluoreszenzsignals, also einem falsch-negative (f/n) Ergebnis, wie es im vorliegenden System geringfügig der Fall ist, können drei mögliche Ursachen zu Grunde liegen. Zum einen kann eine Wechselwirkung der Hilfs-Oligonukleotide mit der Hintergrund-DNA zu einer Verringerung der effektiven Konzentration dieser in der Proben-Lösung und somit zu einer Verringerung der spezifischen Bindung an die Ziel-Fragmente führen. Dies begünstigt die Re-Hybridisierung des Komplements an die Ziel-Sequenz und hat damit eine geringere Akkumulationseffizienz der Ziel-Fragmente auf der Beadoberfläche, bedingt durch eine verminderte Zugänglichkeit der Fänger-Oligomere auf der Zielsequenz, zur Folge. Zum anderen kann eine direkte Interaktion der Fänger-Oligomere mit Fragmenten der Hintergrund-DNA für die unerwünschte Akkumulation von Hintergrund-DNA auf der Bead Oberfläche verantwortlich sein. Dabei werden potentielle Bindestellen der Ziel-Fragmente blockiert. Die dritte Ursache für einen Rückgang der Detektionseffizienz kann in der Wechselwirkung der Reportermoleküle mit Hintergrund-Fragmenten begründet liegen. In diesem Szenario ist die effektive Konzentration der Reporter verringert, wodurch ein

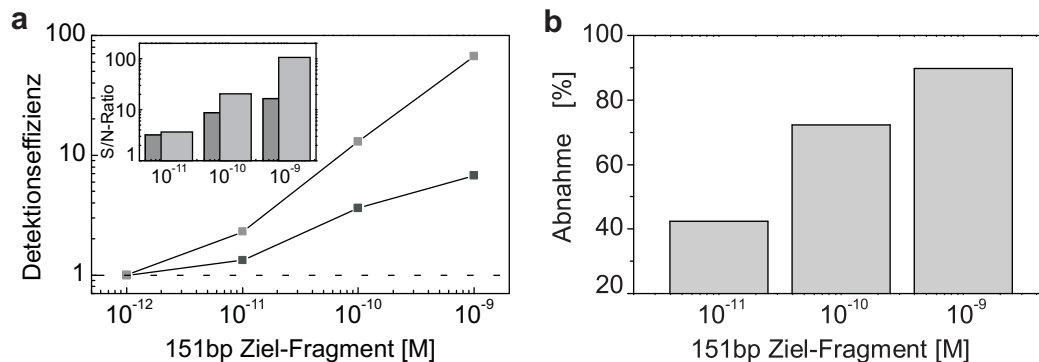


Abbildung 4.32: Vergleich des Detektionsvermögens unterschiedlicher mikroskopischer Systeme. ■ Optimierter wissenschaftlicher Aufbau, ■ miniaturisiertes Detektionssystem. (a) Direkter Vergleich der Detektionseffizienzen in Abhängigkeit der Ziel-Fragment Konzentration. Einschubgrafik: Verhältnis des spezifischen Signals zum Rauschen des CCD Chips. (b) Verluste bedingt durch die Miniaturisierung des mikroskopischen Systems. [Klamp et al., 2013]

effizientes Markieren der Ziel-Fragmente eingeschränkt sein kann. Zu erkennen ist diese Art der Wechselwirkung, abhängig vom Ausmaß der Interaktion, an der verminderten Fluoreszenzintensität der Beads der Blindprobe (vgl. Abb. 4.27a).

Da auch im durchgeführten Spezifitätstest eine Verringerung der Fluoreszenzintensität der Blindprobe in Anwesenheit von Hintergrund-DNA erkennbar ist (Abb. 4.31a), spricht viel für das Auftreten der zuletzt genannten Art unspezifischer Wechselwirkungen. Ob allerdings eine Vermischung der Auswirkungen unterschiedlicher Interaktionsmöglichkeiten vorliegt, kann an dieser Stelle nicht beurteilt werden.

4.4.2 Prämissen für POCT-basierte Anwendungen

Miniaturisierung des Fluoreszenzmikroskopischen Systems

Die Miniaturisierung des Fluoreszenzmikroskopischen Aufbaus (I) ist in Bezug auf die Integration des Quantifizierungsverfahrens in Point-of-Care Systemen von großer Bedeutung. Im Rahmen der medizinischen Vor-Ort-Diagnose erfordert die Identifikation von Erregern kleine und stabile Geräte, die aufgrund der geringen Größe und des geringen Gewichts eine hohe Mobilität aufweisen. Mit der Reduzierung der Größe geht die Forderung nach einem besonders robusten

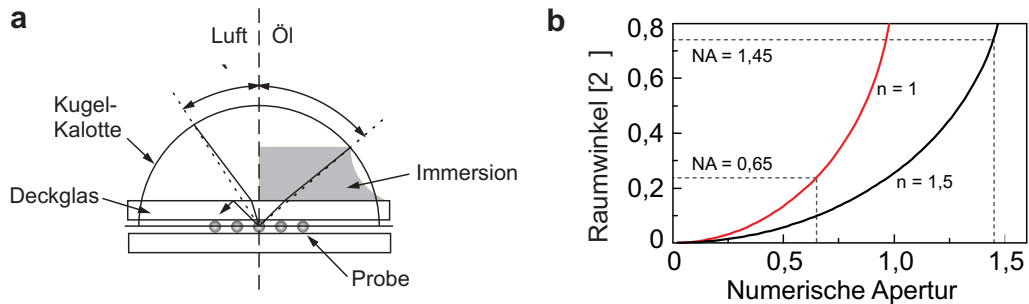


Abbildung 4.33: Verlust der Sammeleffizienz des Objektivs durch Änderung der NA. (a) Einfluss des Immersionsmediums auf die Numerische Apertur (NA). Der Raumwinkel 2α gibt die Fläche der Kugelkalotte vor und bestimmt somit das Sammelvermögen des Fluoreszenzsignals eines Objektivs. (b) Abhängigkeit des Raumwinkels von der NA. n : Brechungsindex des Mediums. Berechnung des Raumwinkels nach Kapitel 3.7, Seite 41.

optischen Aufbau einher, um Anfälligkeiten für Dejustierungen zu minimieren. Eine hohe Stabilität sorgt für Zeit- und Kostenersparnisse aufgrund geringer Wartungs- und Kalibrierungsansprüche, da die Sensitivität des Instruments aufgrund der Anforderungen der Datenanalyse (Kapitel 4.1.1) mit der Stabilität des optischen Strahlengangs verbunden ist. Ein weiterer entscheidender Grund für eine Miniaturisierung ist die Einsparung von Kosten während des Produktionsprozesses durch Verwendung kleiner und kostengünstiger Komponenten.

Der Einsatz eines miniaturisierten fluoreszenzmikroskopischen Systems ist allerdings auch mit erheblichen Nachteilen bezüglich des Detektionsvermögens verbunden. Um diese zu evaluieren, wurde ein miniaturisiertes System konstruiert. Während der zu Forschungszwecken benutzte optische Aufbau (I) des Laborgeräts mit eindeutig mehr High-End Hardwarekomponenten ausgestattet ist, wurden aus Gründen der Kostenersparnis und der technischen Anwendbarkeit im Funktions-Prototyp der fluoreszenzmikroskopischen Einheit des POCT-Geräts einfachere Komponenten verbaut. Besonders der Austausch des Objektivs und der CCD-Kamera beeinflusst in diesem Zusammenhang die physikalische Sensitivität des miniaturisierten Systems. So führt der Wechsel des Öl-Objektivs hoher Numerischer Apertur ($NA\ 1,4$) zu einem Luft-Objektiv geringer $NA\ (0,65)$ zu einem Verlust der Sammeleffizienz der emittierten Photonen der Probe (Abb. 4.33), gegeben durch den halben objektseitigen Öffnungswinkel α des Objektivs (Abb. 4.33a). Durch theoretische Berechnung nach Formel (3.14) kann der Verlust der maximal detektierbaren Photonen auf 67 % approximiert werden. Die Auswirkungen des Austauschs der CCD-Kamera schlagen sich in einem Verlust der Quanteneffizienz (QE, Abb. 4.34) sowie einem verminderten Signal-

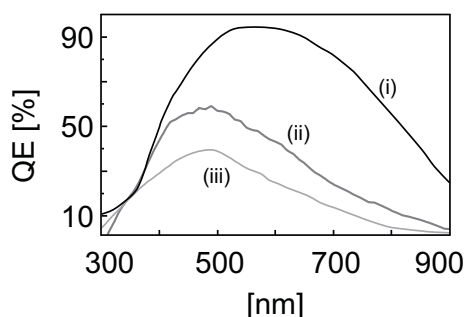


Abbildung 4.34: Quanteneffizienz unterschiedlicher CCD-Detektoren in Abhängigkeit des Spektralbereichs. (i) iXON EM (Andor Technology), (ii) CoolSnap HQ (Roper Scientific), (iii) Pixelfly VGA (PCO).

zu-Hintergrund-Verhältnis (SNR¹⁴) niedriger (Abb. 4.32, Einsatzgrafik). Neben einem unterschiedlichen Modell des CCD-Chips ist der Detektor des miniaturisierten Systems (Aufbau II) ohne Kühleinheit versehen (Pixelfly VGA, PCO). Das Auslesen der Pixel des Chips erfolgt somit bei Raumtemperatur (20 °C) mit einem Rauschen von von 11-14 e⁻ rms¹⁵ und einer QE im relevanten Spektralbereich von 670 nm von 18 %. Die Kühlung des Chips von Aufbau (I) auf -30 °C sorgt für ein Ausleserauschen von 6-8 e⁻ rms und einer QE (670 nm) von 30 % (CoolSnap HQ, Roper Scientific). Im Vergleich dazu verfügen High-End EM-CCD Kameras (z.B. iXon EM, Andor Technology) aufgrund der Rückseiten-Illumination des CCD-Chips über QEs von 90 % (670 nm) bei einem Ausleserauschen von < 1 e⁻ rms bei -100 °C.

Der Gesamtverlust der Detektionseffizienz durch Einbuße der Photonensammel- und -detektionseffizienz in Verbindung mit der Verwendung des miniaturisierten Systems ist in Abbildung 4.32 dargestellt. Im Fall der Quantifizierung doppelsträngiger DNA-Fragmente (151 bp, *M. luteus*) beträgt dieser 72% für eine Konzentration von 100 pM.

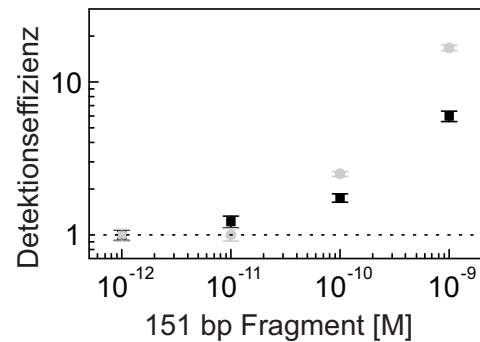
Verkürzung der Prozessierungsdauer

Für den Erfolg einer wirksamen medizinischen Behandlung ist in vielen Fällen die Zeit von der Probenentnahme bis zur Generierung von Laborergebnissen von essenzieller Bedeutung [Bissonnette and Bergeron, 2012]. Da für die Durchführung der Gesamtprozedur (siehe Abb. 4.28) eine Bearbeitungszeit von 30 Minuten angestrebt wurde, ist die Realisierung der Quantifizierungsprozedur in 20 Minuten die Voraussetzung für die Integration in das Gesamtsystem. Die Auswirkungen der Verkürzung des Akkumulationsprozesses auf die Sensi-

¹⁴engl.: Signal-to-Noise-Ratio

¹⁵engl.: Quadratisches Mittel

Abbildung 4.35: Variation der Inkubationszeit des Akkumulationsprozesses. ● 30 Minuten, ■ 15 Minuten. Die Probenpräparation für dieses Experiment ist geringfügig abweichend zu der Standardprozedur: Zugabe der detDNA in Phase II des Nachweisverfahrens (siehe Kapitel 3.5.2, Seite 35).



tivität des Verfahrens sind in Abbildung 4.35 dargestellt. Auch hier wurde für eine beschleunigte Hybridisierung das LNA-modifizierte Fänger-Fragment 4 in Kombination mit dem entsprechenden Reporter-Fragment 3 benutzt. Trotz der Abnahme der Detektionseffizienz bleibt die Möglichkeit der Detektion des doppelsträngigen Fragments 1 bei derart verkürzten Inkubationszeiten erhalten.

4.4.3 Zusätzliche Optimierungen

Durch Umsetzung der Anforderungen bezüglich der Integration des Quantifizierungsverfahrens in LOC-basierten POCT Systemen entstehen erhebliche Verluste in der Detektionseffizienz (siehe Kapitel 4.4.1 & 4.4.2). Der folgende Abschnitt zeigt auf, wie diese zur Steigerung der Sensitivität kompensiert werden können.

Optimierung des Waschvorgangs

Blockungsexperimente zeigen, dass der Anteil der Kreuzhybridisierung am nicht-spezifische Signal bis zu 30 % betragen kann (Kapitel 4.1.3). Der Einfluss dieser Art des NSH auf die Detektionseffizienz ist also erheblich. Die Reduzierung des NSH durch Verringerung von Kreuzreaktionen ist folglich unabdingbar für die Steigerung der Detektionseffizienz γ .

Der Effekt der Kreuzhybridisierung ist auf Teilhybridisierung der Oligonukleotide zurückzuführen. Die Stabilität eines solchen captDNA:detDNA Teil-Hybrids ist somit verglichen mit der des captDNA:tDNA Doppelstrangs weitaus geringer ausgeprägt. Durch Variation der Waschbedingungen während der letzten Phase des Quantifizierungsverfahrens (Phase III, Abb. 4.17, Seite 64) wurde

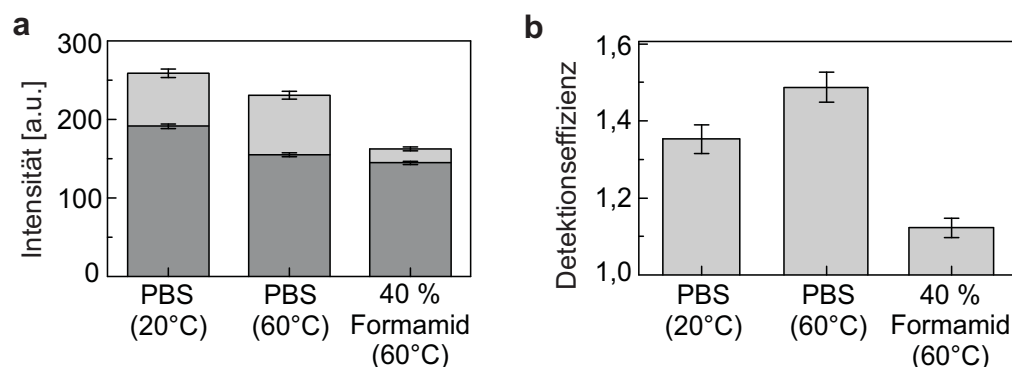


Abbildung 4.36: Anwendung unterschiedlicher Waschpuffer zur Verminderung des NSH. (a) Absolute Intensitätswerte. ■ Spezifisches Signal, ■ unspezifisches Signal. (b) Detektionseffizienz. Fehlerbalken SEM mit $n = 88-103$ Beads.

der Versuch unternommen die Abtrennung der detDNA von den Fragmenten der capDNA zu erwirken, ohne dabei die Bindungen des tDNA Hybrids zu beeinflussen. In diesem Sinne sind zwei unterschiedliche Herangehensweisen möglich. Die unerwünschte Bindung der einzelnen Nukleotide kann durch Erhöhung der Temperatur unter Überschreitung des Schmelzpunktes T_m aufgetrennt werden. Weiter führen destabilisierende Zusätze wie Formamid die Absenkung des Schmelzpunktes herbei [Bonner et al., 1967; Gillespie and Gillespie, 1971].

Beide Strategien sind allerdings mit Vor- und Nachteilen behaftet. Während der Zusatz von Formamid sich ebenfalls destabilisierend auf die spezifische Bindung des Ziel-Fragments auswirkt, ist die Temperatur des Waschpuffers wegen der potenziellen Beeinflussung der Beschichtung des mikrofluidischen Chips auf 60 °C limitiert. Die Auswirkungen beider Vorgehensweisen sowohl auf das spezifische Signal der tDNA-Hybride als auch auf das der Bindungen der capDNA mit detDNA sind in Abbildung 4.36 zusammengefasst. Hier zeigt sich, dass die Reduzierung der Kreuzhybridisierungen durch Anwendung des 40 %igen Formamidpuffers am stärksten ausgeprägt ist. Andererseits bewirkt dessen Einsatz ebenso die Verminderung der spezifischen Ziel-DNA Bindungen. Dies stellt sich auch in der Betrachtung der Detektionseffizienz dar. Während der Nachweis von Ziel-Fragment 3 (ds, $c = 1$ nM) unter Anwendung des auf 60 °C erhitzten PBS-Puffers mit einer Detektionseffizienz von $1,49 \pm 0,04$ erfolgt, verringert sich diese um 25 % auf $1,12 \pm 0,05$ im Falle des 40 %igen Formamidpuffers auf PBS-Basis.

Die nähere Betrachtung der thermodynamischen Eigenschaften der Hybride gibt dabei Aufschluss über die genauen Zusammenhänge der Stabilitäten unter den differierenden Pufferbedingungen. Wie Simulationen der Bindungseigenschaften

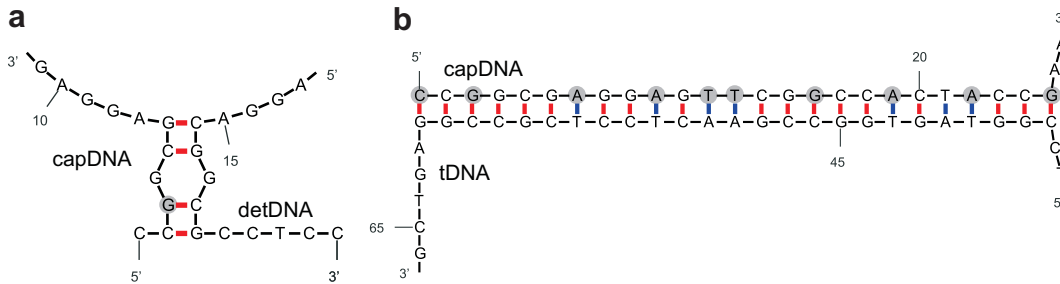


Abbildung 4.37: Struktur der Hybride bei 60°C Hybridisierungstemperatur nach [Markham and Zuker, 2005]. (a) CapDNA:detDNA Hybrid, (b) capDNA:tDNA Hybrid. Verkürzte Darstellung der Oligonukleotide um die freistehenden Enden. Die nebenstehenden Zahlen geben die Nummerierung der Nukleotide beginnend am 5'-Ende an, grau unterlegte Nukleotide sind durch LNA substituiert.

nach [Markham and Zuker, 2005] zeigen, ist die Schmelztemperatur des Kreuzhybrids (capDNA:detDNA) aufgrund der geringeren Anzahl der hybridisierten Nukleotide (Abb. 4.37a) mit $T_m = 32,3 \text{ }^\circ\text{C}$ weit unter der des capDNA:tDNA Hybrids mit $T_m = 90,6 \text{ }^\circ\text{C}$ (siehe Tabelle 4.2). Da in dieser Berechnung die Modifikation einiger Nukleotide des Fänger-Fragments allerdings nicht mit einbezogen ist, muss dieser Wert noch korrigiert werden. Nach [McTigue et al., 2004] tragen dabei LNA Pyrimidine mehr zu der Stabilität der Bindung bei als LNA Purine mit durchschnittlichen T_m Werten von $4,44 \pm 1,46$ für LNA C, $3,21 \pm 1,41$ für LNA T, $2,83 \pm 1,75$ für LNA G und $2,11 \pm 1,30$ für LNA A Nukleotide. Die korrigierten Werte [IDT, 2013] ergeben eine Schmelztemperatur von $T_m \approx 98,6 \text{ }^\circ\text{C}$ für das capDNA:tDNA Duplex und $T_m \approx 35,13 \text{ }^\circ\text{C}$ für das capDNA:detDNA Kreuzhybrid. Die Erhöhung der Temperatur des Waschpuffers von 20 °C auf 60 °C bewirkt folglich eine effizientere Denaturierung des Kreuzhybrids, während das Ziel-DNA Duplex stabil bleibt; das Verhältnis des spezifischen zum unspezifischen Fluoreszenzsignal steigt also an (Abb. 4.36c).

Der Einsatz von Formamid führt zu einer Absenkung von T_m um $0,6 \text{ }^\circ\text{C}$ pro % (v/v) [Sadhu et al., 1984; Fuchs et al., 2010]. Die Schmelztemperatur des Kreuzhybrids fällt bei einem 40 %igen Formamidanteil auf $11,13 \text{ }^\circ\text{C}$, die des capDNA:tDNA Hybrids auf $74,6 \text{ }^\circ\text{C}$. Damit liegt sie lediglich $14,6 \text{ }^\circ\text{C}$ über der Temperatur des Waschpuffers. Vor allem aber die Stabilität des Reporter-Fragments wird durch die Absenkung der Schmelztemperatur seines Hybrids stark beeinflusst. Mit $63,6 \text{ }^\circ\text{C}$ liegt diese fast auf der Temperatur des Puffers und führt damit zu der Reduzierung der Markierungseffizienz. Als Konsequenz sinkt die Detektionseffizienz durch Einsatz des Formamidpuffers.

Bei dieser theoretischen Betrachtung ist allerdings zu beachten, dass die Grund-

4.4 Implementierung der Anforderungen für die Integration des Verfahrens in LOC-basierten POCT Systemen

Tabelle 4.2: Thermodynamische Details der Hybride. Berechnungen nach [Markham and Zuker, 2005] basieren auf einer Na^+ Konzentration von 1 M, einer Hybridisierungstemperatur von 60°C und einer Oligonukleotidkonzentration von $[10 \mu\text{M}]$ (Berücksichtigung der LNA-Nukleotide nicht eingeschlossen). capDNA: Fänger 4, detDNA: Reporter 3, tDNA: Ziel-Fragment 1, ΔG : Gibbs-Energie, ΔH : freie Energie, ΔS : Entropie, T_m : Schmelzpunkt.

Hybrid	Bindungen [#]	G:C Anteil [%]	ΔG [kcal/mol]	ΔH [kcal/mol]	ΔS [cal/mol/K]	T_m [$^\circ\text{C}$]
capDNA detDNA	4	100	-4,3	-46,7	-127,3	32,3
capDNA tDNA	25	72	-26,7	-215,2	-565,9	90,6
detDNA tDNA	24	37,5	-23,2	-192,1	-506,8	87,6

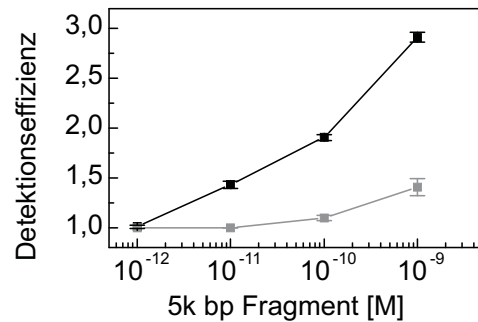
lage der Berechnungen die Reaktionsbedingungen nicht exakt widerspiegelt. So ist den Werten in Tabelle 4.2 eine Na^+ -Konzentration von 1 M zugrunde gelegt. Da das Experiment in L6 Puffer durchgeführt wurde, ist wegen der verminderten Konzentration der Kationen sowie der Anwesenheit des chaotropen Salzes Guanidiniumthiocyanate von geringeren Effektiv-Schmelzpunkten auszugehen. In diesem Fall ist eine weitere Verringerung der Stabilität des Ziel-DNA Hybrids die Folge.

Austausch des Fluoreszenzlabels

Neben dem Aufkommen des nicht-spezifischen Fluoreszenzsignals durch Kreuzreaktion von capDNA und detDNA ist die Adsorption von Reporter-Fragmenten erheblich an der Bildung des NSH beteiligt (siehe Kapitel 4.1.3). Da im Zuge der Integration des Nachweisverfahrens in LOC Modulen der Gebrauch von Detergenzien vermieden werden soll, ist diese Art des unspezifischen Signals potenziell verstärkt.

Um den Einfluss der Oberflächenadsorption bestmöglich zu begrenzen, wurde gemäß Kapitel 4.3.1 das ATTO 647N Label der detDNA durch den Fluoreszenzfarbstoff Alexa 647 ausgetauscht. Durch die geringe Hydrophobizität dieses Moleküls konnten für den qualitativen Nachweis einer hohen Konzentration (1 nM) des Ziel-Fragments 3 bereits gute Ergebnisse erzielt werden (siehe Abb. 4.24). Infolgedessen wurde der mit Alexa 647 markierte Reporter 3 auch für die Quantifizierung der 5 kbp Ziel-Fragmente eingesetzt. Durch direkten Vergleich

Abbildung 4.38: Erhöhung der Detektionseffizienz durch Austausch des Fluoreszenzlabels. ■ ATTO 647N Label, ■ Alexa 647 Label. [Klamp et al., 2013]



der Detektionseffizienz zu der mittels des ATTO 647N markierten Reporter Oligonukleotids erbrachten Quantifizierungsreihe kann der Einfluss des reduzierten NSH auf die Sensitivität verdeutlicht werden (Abb. 4.38). So kann diese durch Substitution des Fluoreszenzlabels unter sonst identischen Bedingungen um etwa eine Größenordnung gesteigert werden.

4.4.4 Bewertung der elementaren Parameter

Die Hauptfaktoren für die Reduzierung der Detektionseffizienz im Rahmen der Anpassung des Quantifizierungsverfahrens an die Anforderungen LOC-basierter POCT Systeme betreffen die Hybridisierungseffizienz sowie die Sensitivität des mikroskopischen Aufbaus. Darüber hinaus ist der nicht-spezifische Hintergrund der Beadfluoreszenz ein stark limitierender Faktor für die Sensitivität des Verfahrens.

Bezüglich der Hybridisierungseffizienz kommen dabei besonders die Auswirkungen der Verluste durch Detektion von sehr langen (5 kbp) Ziel-Fragmenten zum tragen (Kapitel 4.4.1, Abschnitt „Länge der Ziel-Fragmente“, Seite 76). Des Weiteren wirken sich die Verkürzung der Inkubationszeit des Akkumulationsprozesses von 60 auf 15 Minuten (Kapitel 4.4.2, Abschnitt „Verkürzung der Prozessierungsdauer“, Seite 81) sowie Bestandteile des Puffers (Kapitel 4.4.1, Abschnitt „Pufferbedingungen“, Seite 75) negativ auf die Effizienz des Hybridisierungsprozesses aus. Abhilfe bietet in diesem Zusammenhang zum einen die Steigerung der Akkumulationseffizienz durch Einsatz der LNA-modifizierten capDNA Fragmente (Kapitel 4.2.4, Abschnitt „Erhöhung der Affinität durch Modifikation der capDNA“, Seite 60) und andererseits die Verbesserung der tDNA-Markierung durch höhere Konzentrationen des Reporters (Kapitel 4.3.2, Abschnitt „Einfluss der Reporterkonzentration“, Seite 72).

Die Ausprägung der nicht-spezifischen Beadfluoreszenz ist der Autofluoreszenz

der Mikropartikel (Kapitel 4.1.3, Abschnitt „NSH - Autofluoreszenz“, Seite 51) sowie der Kreuzhybridisierung von capDNA und detDNA (Kapitel 4.1.3, Abschnitt „NSH - Kreuzreaktivität“, Seite 53) geschuldet. Weiter führt die Vermeidung von Detergenzien (Kapitel 4.4.1, Abschnitt „Pufferbedingungen“, Seite 75) zu einem Anstieg des NSH durch Oberflächenadsorption von detDNA auf den Mikropartikeln. Die Tragweite dieses Effektes konnte durch Austausch des Fluoreszenzlabels der detDNA stark eingeschränkt werden (Kapitel 4.4.3, Abschnitt „Austausch des Fluoreszenzlabels“, Seite 85) während durch Erhöhung der Temperatur des Waschpuffers die Auswirkungen der Kreuzreaktivität auf ein Minimum begrenzt wurde (Kapitel 4.4.3, Abschnitt „Optimierung des Waschvorgangs“, Seite 82). Weiter konnte durch Verwendung geeigneter Beads die Autofluoreszenz auf das Level des Hintergrundrauschens des CCD-Chips beschränkt werden.

Darüber hinaus konnten viele verfahrenstechnische Anforderungen umgesetzt werden. Die Akkumulation der Ziel-Fragmente, die Isolation dieser von Hintergrund-DNA der Probe sowie die Bildgebung kann ohne Wechsel der festen Phase des Quantifizierungsverfahrens durchgeführt werden (Kapitel 4.2.5, Abschnitt „Quantifizierung doppelsträngiger Ziel-Fragmente“, Seite 63). Dies führt, einschließlich der Akquisition des Fluoreszenzsignals innerhalb weniger Millisekunden, zu kurzen Prozessierungszeiten unter Anwendung einer simplen Nachweisprozedur. Die Vermeidung hoher Salzkonzentrationen während des Hybridisierungsvorgangs (Kapitel 4.4.1, Abschnitt „Pufferbedingungen“, Seite 75) ergibt in Verbindung mit kovalent auf der Beadoberfläche gebundenen Fänger-Oligonukleotiden die Möglichkeit langer Aufbewahrungszeiten der Probeflüssigkeiten in den Reservoirs der Testchips. Weiter sind die magnetischen Eigenschaften der Mikropartikel Grundlage für ein leichtes Handling der Beads während der Akkumulierungs- und Waschphase des Verfahrens in mikrofluidischen Kanälen.

4.4.5 Detektionslimit

Die Beachtung der elementaren Parameter ermöglicht die sensitive Detektion und Quantifizierung von 5k bp langen, doppelsträngigen Ziel-DNA-Fragmenten mit einer Empfindlichkeit, die eine Implementierung des Nachweisverfahrens in POCT- und IVD¹⁶-Systemen zulässt. Anhand des linearen Detektionsbereichs von drei Größenordnungen und eines relativen SEM von 4 % bei einer Konzentration des Ziel-Fragments von 10 pM, lässt sich das Detektionslimit

¹⁶engl.: In Vitro Diagnostic

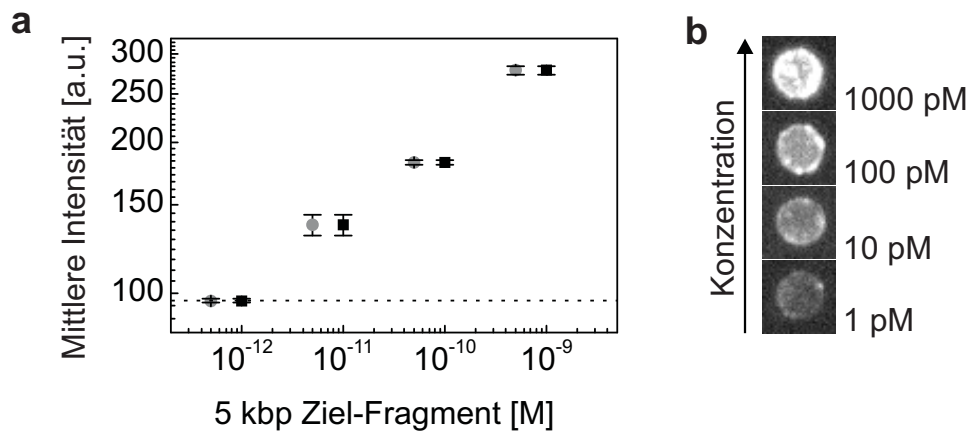


Abbildung 4.39: Linearer Detektionsbereich des Nachweisverfahrens für die Identifikation von 5 kbp Fragmenten unter LOC- und POCT-Bedingungen. (a) Absolute Intensitätswerte in Abhängigkeit der Konzentration. ■ Ausgangskonzentration des Ziel-Fragments in der Probe, ● Konzentration des Ziel-Fragments während der Inkubation. Die gestrichelte Linie zeigt das Fluoreszenzniveau der Blindprobe, die Fehlerbalken den SEM. (b) Visualisierung der Intensitätszunahme (identische Skalierung). [Klamp et al., 2013]

(LOD¹⁷) auf etwa 5×10^{-12} M abschätzen. Das entspricht bei einem Probenvolumen von 20 μ L einer Stoffmenge von 0,1-0,2 fmol beziehungsweise 7,8 \log_{10} Kopien der Ziel-Fragmente. Damit ist das Quantifizierungsverfahren geeignet, im Zusammenspiel mit einer probaten Probenvorbereitung (siehe Kapitel 4.4.1), innerhalb von 17 Minuten Pathogene wie beispielsweise Influenza mit typischen Niveaus von 7,5 \log_{10} Kopien pro mL der Mundrachenschleimhaut [Ngaosuwanikul et al., 2010; de Jong et al., 2006]) zu identifizieren.

Die Durchführung der Nachweisprozedur zur Bestimmung des LOD wurde durch einfaches Schütteln der Probe während Phase (II) des Verfahrens vollzogen. Unter der Voraussetzung, dass sich die Anwendung der magnetisch induzierten Bewegung der Beads in der integrierten LOC-Prozedur technisch realisieren ließe, ist mit einer weiteren Zunahme der Sensitivität zu rechnen. Gemäß Kapitel 4.1.2 kann die durch Anwendung dieser Technik gewonnene Steigerung der Detektionseffizienz auf ungefähr eine Größenordnung geschätzt werden (siehe Abb. 4.6).

¹⁷engl.: Limit of Detection

4.5 Multiplexing

Im Rahmen der Point-of-Care Diagnostik ist die simultane Identifikation mehrerer unterschiedlicher Pathogene (Multiplexing) von besonderem Interesse [Cirino et al., 2004]. So kann durch Anwendung einer geeigneten Methode auf Grundlage einer einzelnen Patientenprobe ein vollständiges Screening der möglichen Erreger durchgeführt werden. Dies spart Ressourcen und führt zu einer erheblichen Zeitersparnis vom Zeitpunkt der Probenentnahme zum Beginn einer adäquaten Medikation.

Das folgenden Kapitel zeigt einen ersten Ansatz zur Durchführung von Multiplex-Analysen unter Verwendung des miniaturisierten Fluoreszenzmikroskops auf. Durch Erweiterung des Aufbaus um eine weitere Laserlinie (532 nm) konnte so die Eignung des Mikroskops zur Zweifarbindetektion getestet und hinsichtlich probater Fluoreszenzfarbstoffe charakterisiert werden. Auf dieser Grundlage wurde eine Strategie für die Anwendung des Multiplexing im integrierten Nachweisverfahren entwickelt.

Qualitativer Ansatz

Um das Vermögen des erweiterten Aufbaus im ersten Schritt zum dualen Multiplexing zu prüfen, wurde die simultane Detektion zweier unterschiedlicher Analyten durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden in einem exemplarischen Ansatz beide Analyte, in Form biotinylierter Fluoreszenzfarbstoffe, direkt auf Streptavidin funktionalisierten Mikropartikeln fixiert. Dabei kamen drei verschiedene Fraktionen unterschiedlich belegter Beads zum Einsatz. In der ersten Probe wurden die Partikel mit einem rot-fluoreszierendem Farbstoff (ATTO 647N, 1 nM) und in der zweiten mit einem grün-fluoreszierendem Farbstoff (ATTO 565, 1 nM) inkubiert. Beide Spezies der spektral verschieden emittierenden Partikel wurden daraufhin mit unbelegten Beads vermischt. Durch sukzessive Bestrahlung mit beiden Laserlinien konnten anschließend mittels Austausch der Emissionsfilter die Fluoreszenzbilder der entsprechenden Wellenlänge akquiriert werden. Abbildung 5.1 zeigt die Möglichkeit der Identifikation der unterschiedlichen Beadfraktionen durch spektrale Auftrennung des Fluoreszenzsignals. Die Intensität im grünen Kanal (grün selektierender Detektionsfilter) zeigt dabei die Konzentration des ersten Analyten, die Intensität des Signals im roten Kanal (rot selektierender Detektionsfilter) zeigt die Konzentration des zweiten Analyten an.

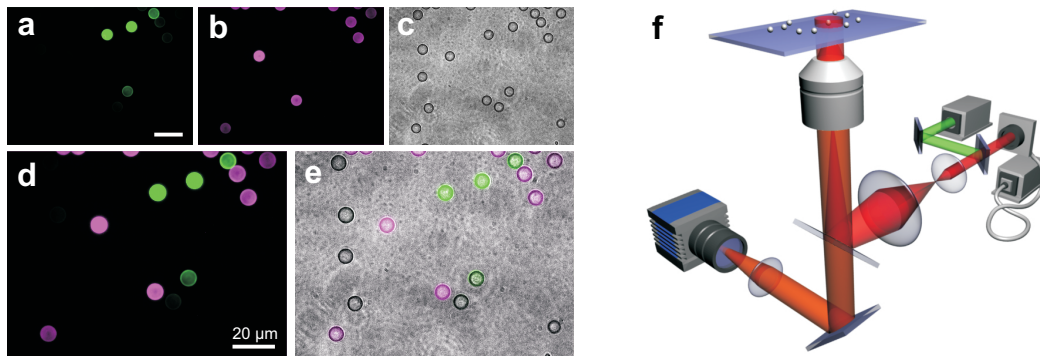


Abbildung 4.40: Multiplexing von zwei unterschiedlichen Fraktionen belegter Beads. (a) Beads belegt mit grünem Fluoreszenzfarbstoff (ATTO 565). (b) Beads belegt mit rotem Fluoreszenzfarbstoff (ATTO 647N). (c) Aufnahme aller Beads im Abbildungsbereich mit Oberlicht. (d) Zusammengefügte Abbildung roter und grüner Beads. (e) Zusammengefügte Abbildung aus a, b und c. Alle drei Fraktionen der Beads (grün, rot und unbelegt) können voneinander unterschieden werden. (f) Schematische Darstellung des Fluoreszenzmikroskopischen Aufbaus.

Geeignete Fluoreszenzlabel

Der Einsatz einer kurzwelligigen Laseranregung führt neben besonderen Ansprüchen an die optischen Komponenten des mikroskopischen Aufbaus (siehe 3.2.2) auch zu Bedingungen, die mit den Eigenschaften des verwendeten Fluorophors verknüpft sind. Bedingt durch die Rotverschiebung des Emissionssignals des grünen Farbstoffs kann es in Abhängigkeit des spektralen Emissionsmaximums zu einem Crosstalk¹⁸ auf den roten Detektor kommen. Da das Auftreten des Übersprechungssignals zu einem falsch-positiven Signal im roten Kanal und somit einer Fehlidentifikation rot markierter Ziel-Fragmente führt, ist die Vermeidung dieses Effektes zwingend notwendig für eine erfolgreiche Quantifizierung. Konträr dazu steht der Bedarf eines möglichst hohen Signals auf dem grünen Detektionskanal. Aufgrund der gegebenen Bandbreite des Strahlteilers und eines Stokes-Shifts der gängigen Farbstoffe von 21 bis 29 nm muss bei der Wahl des Labels demnach zwischen effizienter Anregung und Intensität des maximal detektierbaren Emissionssignals abgewogen werden. Der bestimmende Parameter für eine effiziente Detektion des grünen Signals ist somit das Verhältnis der Intensität des spezifischen Signals zum Crosstalk (SCR¹⁹). Die Vorgehensweise zur Bestimmung des SCR von unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen ist in Kapitel 3.6 (Seite 39) beschrieben. Tabelle 4.3 zeigt die Ergebnisse dieses

¹⁸engl.: Übersprechungssignal

¹⁹engl.: Signal-to-Crosstalk-Ratio

Tabelle 4.3: Maximal detektierbares Signal im grünen Kanal in Abhängigkeit ineffizienter Anregung bei gegebenem Strahlteiler und Detektionsfilter. Anregungswellenlänge: 532 nm.

Farbstoff	Gesamtsignal [%]	Signal grüner Kanal [%]	Signal roter Kanal [%]	SCR* (Grün/Rot)
ATTO 532	100	37,9	1,7	22,3
ATTO 550	39,9	22,6	1,5	15
ATTO 565	38,2	18,8	1,7	11

* engl.: Signal-to-Crosstalk Ratio

Vergleichs für die Fluoreszenzfarbstoffe ATTO 532, ATTO 550 und ATTO 565.

Bewertung unterschiedlicher Methoden

Für die Codierung der unterschiedlichen Analyten bieten sich vier verschiedene Strategien an. Die direkte Codierung (siehe oben) ist die experimentell einfachste Form und basiert auf analytspezifischer Zuordnung des Fluoreszenzlabels. D.h. jedes Reporter-Oligonukleotid wird entsprechend der Spezifität bezüglich des Analyten mit einem spektral verschieden emittierenden Fluoreszenzlabel markiert. Für die Quantifizierung bedeutet dies, dass jeder Detektionskanal separat die Konzentration eines Analyten entsprechend der Fluoreszenzintensität anzeigt. Da aus bereits diskutierten Gründen (Kapitel 4.3.1) die Anwendung von QDs, deren Anregungsspektrum sich über einen breiten Wellenlängenbereich erstreckt, als Label nicht zweckmäßig ist, muss bei dieser Methode jeweils eine Anregungsquelle für jeden Analyten bereitgestellt werden. Im Funktionsprototypen der mikroskopischen Einheit des POCT-Geräts (Aufbau II) ist die maximale Anzahl der Laser aus Komplexitäts- und Kostengründen allerdings auf zwei limitiert.

Eine weitere Möglichkeit ist die Codierung eines spezifischen Ziel-Fragments durch Markierung mittels mehrerer spektral verschiedener Fluorophore. Bei zwei unterschiedlichen Anregungsquellen ist die theoretische Anzahl der möglichen Kombinationen drei (rot, grün, rot-grün). Eine Einschränkung dieser Methode ist in der Praxis allerdings durch das Auftreten eines Crosstalks bei sehr hohen Konzentrationen grünen Emissionssignals gegeben. Da sich die Konzentration des Analyten der dritten Kombination aus den Signalen beider Detektionskanäle ergibt, ist die Eichung der Kalibrationskurve für hohe Überspre-

chungssignale unmöglich. Eine mögliche Lösung bringt in diesem Zusammenhang lediglich eine Begrenzung des Detektionsbereichs des Nachweisverfahrens entsprechend des SCRs. Für unbekannte Proben zur Bestimmung des Erregerlevels ist diese Einschränkung jedoch nicht annehmbar. Damit wird die Verwendung dieser Kombination unbrauchbar und die Methode unterscheidet sich nicht von der erstgenannten.

Werden die beiden unterschiedlichen Farbstoffe während des Markierungsvorgangs in ein zahlenmäßiges Verhältnis zueinander gesetzt, erweitert sich die potenzielle Anzahl der Kombinationen auf mindestens vier (abhängig von dem stöchiometrischen Verhältnis). Für die einfachste Form ergeben sich also die Kombinationen rot, grün, rot > grün, rot < grün. Durch das Verhältnis der unterschiedlichen Emitter zueinander kann in diesem Fall auf den jeweiligen Analyten geschlossen werden, die Summe der Signale beider Detektionskanäle spiegelt die Konzentration der Analyten wider. Die Vorteile dieser Methode sind jedoch ebenfalls durch mangelnde Praxistauglichkeit hinfällig. Analog zu der obenstehenden Methode ist die Bestimmung hoher Analytkonzentrationen bei der Kombination rot < grün infolge des Crosstalks nicht möglich. Auch die dritte Kombinationsmöglichkeit (rot > grün) ist in Hinblick einer potenziellen Anwendung nachteilig. Hier ist das Problem mit der mangelnden Möglichkeit zur eindeutigen Identifikation des Analyten bei sehr geringen Konzentrationen verknüpft. Sinkt das rot > grüne Signal unterhalb der Detektionssensitivität des grünen Kanals, kommt es in dieser Kombination zu falsch-positiven Ereignissen bezüglich des roten Codes der ersten Kombination.

Die erfolgsversprechendste Methode basiert auf der Separation der spektralen Kanäle entsprechend ihrer Funktion. Dabei wird der grüne Kanal zur Codierung verschiedenartiger Fraktionen des Analyten durch Zuordnung unterschiedlicher Intensitäten genutzt, während der rote Bereich für die Quantifizierung belassen wird. Dies kann erzielt werden, indem die Beads entsprechend ihrer Spezifität mit ungleichen Anteilen des grün-emittierenden Farbstoffs markiert werden. Die einzige Einschränkung dieser Methode besteht in der Verminderung der Bindestellen, die für die Funktionalisierung mit capDNA zur Verfügung stehen. Wird die Anregungsintensität der grünen Laserlinie entsprechend angepasst, ist der Anteil der für die Codierung genutzten Bindestellen sehr gering. Der folgende Abschnitt zeigt, dass mit Hilfe dieser Methode mindestens fünf unterschiedliche Codierungsmöglichkeiten geschaffen werden können.

Für alle Codierungsmethoden kann zusätzlich zu der spektralen Verschlüsselung die Anzahl der Codes durch größenbasierte Unterscheidung der Partikel erweitert werden. Dadurch steigt die Kapazität des Multiplexing mit dem Faktor der verschiedenen Beadgrößen.

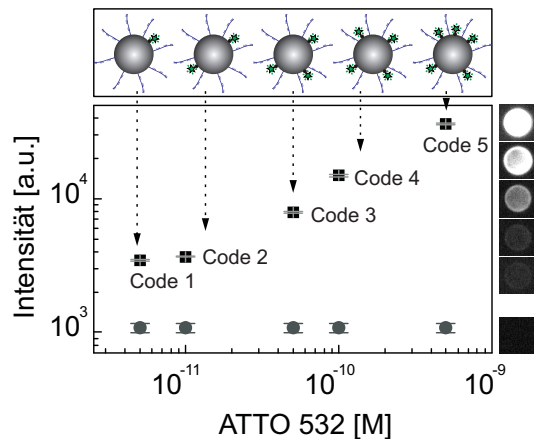


Abbildung 4.41: Separation des Detektionskanäle entsprechend der Funktion. ■ Intensitätssignal des Kodierungskanals und ● Crosstalk im Quantifizierungskanal ($\hat{=}$ dem Level des Dunkelsignals). Die Fehlerbalken zeigen den SEM mit $n = 46-60$ Beads. Probenpräparation nach Kapitel 3.5.2 (Seite 38).

Separation von Quantifizierungs- und Codierungskanal

In diesem Ansatz determiniert das SCR des benutzten Fluorophors den für die Codierung zur Verfügung stehenden Intensitätsbereich. Wegen des maximalen SCR von 22,3 (Tabelle 4.3) wurde für diese Methode der Fluoreszenzfarbstoff ATTO 532 herangezogen. Dabei wurden Streptavidin-modifizierte Beads (10 μm , CM01N) mit unterschiedlichen Konzentrationen biotinylierten 40 pb Fragmenten (ATTO 532 Label) vermischt und anschließend gewaschen. Im nächsten Schritt wurden diese Beads konform zu Kapitel 4.2.1 mit capDNA funktionalisiert. Abbildung 4.41 stellt den Intensitätsbereich des grünen Kanals dar, in dem die Codierung mit dieser Strategie ohne das Auftreten eines Crosstalk-Signals möglich ist. Durch die kleinen relativen Standardfehler von 0,9-2,2 % der Beadverteilungen ist die Möglichkeit der Unterscheidung fünf verschiedener Codes gegeben.

Die Prozedur des integrierten LOC-Verfahrens sieht zwischen dem Prozessschritt der Fragmentierung der Nukleinsäuren und dem Einsatz der Beads zwecks Hybridisierung eine Aufspaltung der Probeflüssigkeit auf drei unterschiedliche Detektionskanäle vor. Damit ergibt sich unter Verwendung zwei unterschiedlicher Partikelgrößen eine Multiplexingkapazität von 30 Möglichkeiten.

5 Fazit und Ausblick

Auf dem Forschungsfeld der CA-LRTI-Diagnostik besteht ein erhöhter Bedarf an sensitiven und schnellen Analysemethoden. Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, erfolgreich eine adäquate Methode für den quantitativen Nachweis von aus Pathogenen extrahierten Nukleinsäuren am Beispiel von DNA-Fragmenten zu entwickeln. Dazu wurde eine bead-basierte Hybridisierungs-Technik in Verbindung mit bildgebender Fluoreszenzmikroskopie benutzt.

Besonders die Optimierung der biologischen Parameter spielte eine fundamentale Rolle für die Entwicklung des Verfahrens, da der Hybridisierungsprozess die Grundlage für den Akkumulations- und Markierungsvorgang bildet. Insbesondere dem Design der Assay-Fragmente kam dabei eine große Bedeutung zu. Hier sind Länge und die Anordnung der unterschiedlichen Oligonukleotide auf der Sequenz des Zielfragments ausschlaggebende Faktoren für die Regulierung der Hybridisierungseffizienz. Bezüglich der Fänger-Fragment-Länge war ein Kompromiss zwischen Spezifität und Stabilität zu finden. Vorausgesetzt die spezifische Zusammensetzung der vier Basen wird aus statistischen Gründen vernachlässigt, ist aus thermodynamischer Sicht die Stabilität der hybridisierten Doppelstränge direkt abhängig von der Anzahl der bindenden Nukleotide. Mit der Verlängerung der capDNA geht allerdings ein Verlust der Spezifität einher, da die Wahrscheinlichkeit für Teilhybridisierungen mit Sequenzen der BgNA steigt.

Auch die maximale Beschichtungsdichte der Beads ist durch die Länge der Fragmente determiniert. Im speziellen Fall ist die Anordnung der bindenden Regionen allerdings von ausschlaggebender Bedeutung, da sie durch Einfluss auf die Basenstapelung sowohl einen Effekt und somit auf die Stabilität als auch durch Gestaltung der terminalen Enden auf die Reaktionskinetik der Hybridbildung hat. Zudem kann durch eine lückenlose Anordnung der unterschiedlichen Assay-Fragmente die Länge des effektiven Hybrids erweitert werden; dies wirkt sich nicht nur auf die thermodynamische Stabilität, sondern auch auf die Flexibilität aus. Durch eine Umstrukturierung beziehungsweise Neubewertung der verwendeten bindenden Regionen der Assay-Oligonukleotide kann hier die Hybridisierungseffizienz des Gesamtkomplexes für zukünftige Optimierungen noch gesteigert werden. Der Einsatz LNA-modifizierter capDNA konnte in diesem Zusammenhang eine stark erhöhte Schmelztemperatur der Duplex-Sequenzen

der Fänger-Fragmente hervorrufen, ohne dafür eine Verlängerung dieser in Anspruch zu nehmen. Auch eine veränderte Art der Modifikation mit anderen Nukleinsäure-Analoga oder die Variationen der Positionen könnte eine weitere potenzielle Verbesserung der Hybridisierungseffizienz bewirken.

Für die Detektion von realistischen doppelsträngigen DNA-Fragmenten ist allerdings nicht der Hybridisierungsprozess, sondern die Gewährleistung der Zugänglichkeit der bindenden Regionen auf dem Ziel-Fragment die grundlegende Schwierigkeit. Vergleichende Experimente an einzelsträngigen Ziel-Fragmenten zeigten beispielsweise, dass Verluste der Detektionseffizienz vielmehr auf der Problematik der Denaturierung des Doppelstrangs und der Vermeidung der Rehybridisierung des nativen Komplements beruhen. Hier ist eine mögliche Weiterentwicklung durch den Einsatz modifizierter Hilfs-Fragmente gegeben.

Der Gebrauch magnetischer Beads als mobile Phase des NA-Assays stellte sich in vielerlei Hinsicht als vorteilhaft heraus. Über die bereits in den 80er Jahren publizierte Möglichkeit zur Erhöhung der Reaktionsrate mittels Verkürzung der Diffusionsdistanzen durch Suspension der festen Phase [Jungell-Nortamo et al., 1988] konnte in dieser Arbeit die aktive Manipulation der Beadbewegung zur Steigerung der Akkumulationseffizienz ausgenutzt werden. Dabei wurde durch magnetisch induzierte Bewegung der Partikel die Anreicherung geringer Mengen der Ziel-DNA herbeigeführt. In Proben von 20 μL konnte somit eine Stoffmenge von zwei amol ($1,2 \times 10^6$ Moleküle) doppelsträngiger DNA-Fragmente nachgewiesen werden. Das entspricht einer Empfindlichkeit, die mit Einzelmolekül-Methoden vergleichbar ist [Yahiatène et al., 2012]. Unter der Annahme, dass diese Art der Beadbewegung senkrecht zur Strömungsrichtung in mikrofluidischen Kanälen induziert wird, ist mit einer weiteren Steigerung der Akkumulationseffizienz zu rechnen, da diese Technik eine weitere Vergrößerung des effektiv für den Anreicherungsprozess zur Verfügung stehenden Probevolumens bewirkt. Die Anreicherung, Markierung und der Nachweis der Ziel-Fragmente kann mit Hilfe der bead-basierten Methode ohne Wechsel der Phase erfolgen und in zwei Prozessschritten erfolgen. Für die Anwendung des Verfahrens unter POCT-Bedingungen ist dies von Relevanz, da damit eine Vereinfachung der Prozedur und eine kurze Prozessierungsdauer einher geht.

In Verbindung mit Beads als Werkzeug der Signal-Akkumulation stellt die bildgebende Fluoreszenzmikroskopie ein effizientes Mittel zur Detektion in IVD-POCT-Systemen dar. Durch die äußerst geringe Dauer des Akquisitionsvorgangs innerhalb weniger Millisekunden kann durch Verwendung dieser Methode ein hoher Durchsatz an Proben erzielt werden. Die Wahl des Fluoreszenzlabels ist einer der kritischen Faktoren bei der Benutzung dieser Technik für empfindliche Nachweise. Da ein Teil des Fluoreszenzsignals auf nicht-spezifische Ad-

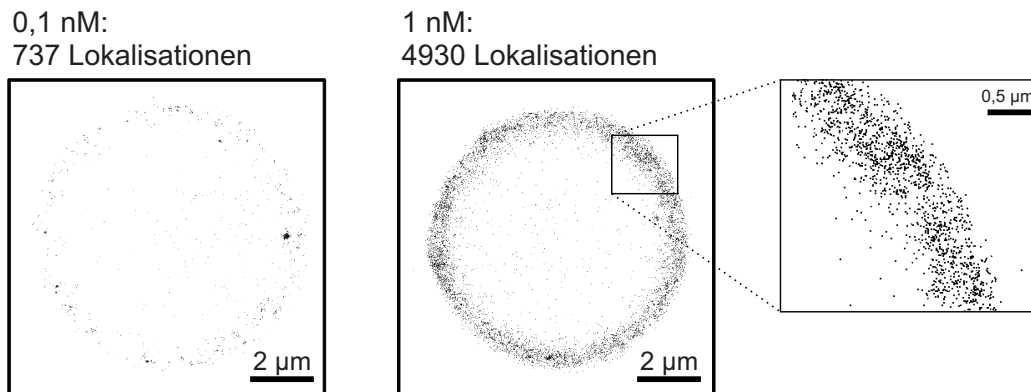


Abbildung 5.1: Quantifizierung mittels *d*STORM auf 8 µm Beads. Zur Simulation des capDNA:tDNA:detDNA-Komplexes wurde ein biotyniliertes DNA-Fragment herangezogen. Dies wurde durch kurzes (5 s) Mixen mittels Pipettieren auf Streptavidin modifizierten Beads akkumuliert. Durch eine entsprechende Auswertungssoftware (*rapi d*STORM [Wolter et al., 2012]) kann bei identischen Lokalisationsparametern die Anzahl der Einzelmolekülereignisse bestimmt werden.

sorption des Reportermoleküls zurückzuführen ist, bieten sich hier insbesondere hydrophile Fluorophore für den Markierungsprozess an. Darüber hinaus kann das Ausmaß des NSH durch den Einsatz von Hairpins (HP) als Fluoreszenzlabel weiter vermindert werden. Auch in diesem Zusammenhang bietet sich eine zusätzliche Optimierung an. In weiterführenden Arbeiten könnten HPs, wie bereits durch [Riccelli et al., 2001] und [Horejsh et al., 2005] gezeigt als Fänger eingesetzt werden. Neben der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Reduzierung des NSH führt diese Strategie zu einer verbesserten Bindungskinetik [Riccelli et al., 2001], da in diesem Szenario der Markierungsschritt entfällt. Weiter ist bei dieser Methode durch intrinsische Markierung während der Fänger-Fragment-Bindung eine Markierungseffizienz von 100 % die Folge. Voraussetzung für den Erfolg dieser Herangehensweise ist allerdings die Ermöglichung einer Beschichtungsdichte durch Benutzung des HP, die vergleichbar zu derjenigen ist, wie sie mit linearen ss-capDNA Fragmenten erzielt werden kann.

Die fluoreszenzmikroskopische Detektion ermöglicht weiter die Verbindung der bildgebenden Darstellung von Bindungsereignissen einzelner Moleküle mit der Nutzung einer gesteigerten Akkumulationseffizienz durch Anreicherung des Signals durch den Einsatz von magnetischen Mikropartikeln. Abbildung 5.1 zeigt erste Ergebnisse zur Quantifizierung von Ziel-Fragmenten auf Beads mittels der hochauflösenden Methode *d*STORM¹ [Heilemann et al., 2008; van de Linde

¹engl.: direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy

et al., 2011]. Bei Anwendung dieser Detektions-Methode bleibt die Limitierung der Nachweisgrenze des Verfahrens durch unspezifische Reporter-Adsorption zwar grundsätzlich bestehen, kann jedoch durch Einsatz von HPs während des Markierungsprozesses umgangen werden. Unter dieser Voraussetzung ist eine Verknüpfung des Nachweisverfahrens mit der Technik der bildgebenden Quantifizierung mittels *d*STORM äußerst vielversprechend. Zudem können kostengünstige fluoreszenzmikroskopische Systeme zur Lokalisations-Mikroskopie ebenfalls in miniaturisierter Form realisiert werden [Holm et al., 2013].

Bezüglich der Multiplexing-Kapazität ist die Quantifizierung mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie anderen Methoden wie beispielsweise der qPCR überlegen. Durch das vorgestellte Prinzip der simultanen Detektion unter Separation des Quantifizierungs- und Detektionskanals ist im späteren integrierten Verfahren der Nachweis von 30 unterschiedlichen Pathogenen möglich, während die Kapazität einer qPCR auf 10 - 20 beschränkt ist [Broude et al., 2001; Syvanen, 2005; Fredriksson et al., 2007].

Ein effizienter Bildverarbeitungsprozess ist Voraussetzung und elementarer Bestandteil aller Ansätze der fluoreszenzmikroskopischen Analyse. Zu diesem Zweck wurde eine neuartige Methode entwickelt, die in der Lage ist, Signalintensitäten der Fluoreszenzbilder um das Anregungsprofil der Laserausleuchtung zu korrigieren. Abhängig von der technischen Realisierung des mikroskopischen Aufbaus ist dies für eine fluoreszenzbasierte Quantifizierung die Grundvoraussetzung. Die vorgestellte Herangehensweise basiert dabei auf einer Fluoreszenzbild intrinsischen Technik der Profilkorrektur; bei einem stabilen und gut justierten mikroskopischen Aufbau ist es damit möglich diesen Prozess ohne vorhergehende Kalibrationsmessungen allein anhand der akquirierten Proben-Bilder durchzuführen.

Zur Evaluation der potenziellen Sensitivitätsverluste bedingt durch die Integration des entwickelten Nachweisverfahrens im späteren POCT-System wurde ein Funktions-Prototyp der fluoreszenzmikroskopischen Einheit konstruiert. Dabei zeigte sich, dass die Verwendung eines kostengünstigen und miniaturisierten fluoreszenzmikroskopischen Aufbaus einen erheblichen Einfluss auf die Empfindlichkeit zur Folge hat. Andererseits kann die erzielte Kostenersparnis gegenüber einem High-End-Gerät auf ca. 65-70 k Euro abgeschätzt werden. Da für einen effizienten Vermarktungsprozess die Produktionskosten eines POCT-Geräts limitiert sind, ermöglicht die erfolgreiche Umsetzung des Nachweisverfahrens unter Verwendung des Prototypens die Anwendbarkeit fluoreszenzbasierter Weitfeldmikroskopie im Rahmen der POCT-Diagnose.

Trotz der durch den Miniaturisierungsprozess entstandenen Verluste konnte die erforderliche Nachweisempfindlichkeit durch verschiedenste Optimierungen des

Nachweisverfahrens erreicht werden. Mit einem LOD von 5-10 pM (0,1 - 0,2 fmol bzw. $7,8 \log_{10}$ Moleküle) konnten realistisch geartete 5 kbp Fragmente mit einem linearen Detektionsbereich von drei Größenordnungen nachgewiesen und quantifiziert werden. Damit ist die vorgestellte Methode nicht gleichsam empfindlich wie PCR-basierte Methoden, jedoch erfüllt sie alle zuvor gesetzten Bedingungen an Verarbeitungszeit, Funktionalität und Anwendbarkeit. Typische Pathogen-Konzentrationen von beispielsweise $7,5 \log_{10}$ RNA-Kopien des Influenza-A-Virus pro mL Aspirat des Nasenrachenraums [de Jong et al., 2006; Ngaosuwanikul et al., 2010] könnten somit erfolgreich identifiziert werden. Mit einer Gesamtverarbeitungszeit von 17 Minuten ist die vorgestellte Methode folglich geeignet, um erfolgreich in LOC-basierte POC-Geräte integriert zu werden.

Literaturverzeichnis

- Abràmoff, M. D., Magalhães, P. J., and Ram, S. J. (2004). Image processing with imagej. *Biophotonics international*, 11(7):36–42.
- Archer, M. J., Lin, B., Wang, Z., and Stenger, D. A. (2006). Magnetic bead-based solid phase for selective extraction of genomic dna. *Anal. Biochem.*, 355(2):285–97.
- Arora, A., Kaur, H., Wengel, J., and Maiti, S. (2008). Effect of locked nucleic acid (lna) modification on hybridization kinetics of dna duplex. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, (52):417–8.
- Avery, O. T., MacLeod, C. M., and McCarty, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type iii. *The Journal of experimental medicine*, 79(2):137–158.
- Bissonnette, L. and Bergeron, M. G. (2012). Infectious disease management through point-of-care personalized medicine molecular diagnostic technologies. *Journal of Personalized Medicine*, 2(2):50–70.
- Bjerre, L. M., Verheij, T., and Kochen, M. M. (2009). Antibiotics for community acquired pneumonia in adult outpatients. *Cochrane Database Syst Rev*, 4.
- Bonner, J., Kung, G., and Bekhor, I. (1967). A method for the hybridization of nucleic acid molecules at low temperature*. *Biochemistry*, 6(12):3650–3653.
- Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M., and van der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.*, 28(3):495–503. Boom, R Sol, C J Salimans, M M Jansen, C L Wertheim-van Dillen, P M van der Noordaa, J United states Journal of clinical microbiology J Clin Microbiol. 1990 Mar;28(3):495-503.
- Broude, N. E., Zhang, L., Woodward, K., Englert, D., and Cantor, C. R. (2001). Multiplex allele-specific target amplification based on pcr suppression. *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. U S A*, 98(1):206–11. Broude, N E Zhang, L Woodward, K Englert, D Cantor, C R United States Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Jan 2;98(1):206-11.
- Cao, Y. C., Jin, R., and Mirkin, C. A. (2002). Nanoparticles with raman spectroscopic fingerprints for dna and rna detection. *Science*, 297(5586):1536–1540.
- Chou, C. C., Chen, C. H., Lee, T. T., and Peck, K. (2004). Optimization of probe length and the number of probes per gene for optimal microarray analysis of gene expression. *Nucleic Acids Res*, 32(12):e99.
- Cirino, N. M., Musser, K. A., and Egan, C. (2004). Multiplex diagnostic platforms for detection of biothreat agents. *Expert review of molecular diagnostics*, 4(6):841–857.
- Collins, T. J. et al. (2007). Imagej for microscopy. *Biotechniques*, 43(1 Suppl):25–30.
- de Jong, M. D., Simmons, C. P., Thanh, T. T., Hien, V. M., Smith, G. J., Chau, T. N., Hoang, D. M., Chau, N. V., Khanh, T. H., Dong, V. C., Qui, P. T., Cam, B. V., Ha do, Q., Guan, Y., Peiris, J. S., Chinh, N. T., Hien, T. T., and Farrar, J. (2006). Fatal outcome of human influenza a (h5n1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med*, 12(10):1203–7.
- Eggeling, C., Ringemann, C., Medda, R., Schwarzmann, G., Sandhoff, K., Polyakova, S., Belov, V. N., Hein, B., von Middendorff, C., Schonle, A., and Hell, S. W. (2009). Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature*, 457(7233):1159–62.
- Egholm, M., Buchardt, O., Christensen, L., Behrens, C., Freier, S. M., Driver, D. A., Berg, R. H., Kim, S. K., Norden, B., Nielsen, P. E., et al. (1993). Pna hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the watson-crick hydrogen-bonding rules. *Nature*, 365(6446):566–568.
- Eichert, A., Behling, K., Betzel, C., Erdmann, V. A., Fürste, J. P., and Förster, C. (2010). The crystal structure of an 'all locked' nucleic acid duplex. *Nucleic Acids Res*, 38(19):6729–6736.
- Ellis, M. E. (1998). *Infectious diseases of the respiratory tract*. Cambridge University Press.

- Fan, Z. H., Mangru, S., Granzow, R., Heaney, P., Ho, W., Dong, Q., and Kumar, R. (1999). Dynamic dna hybridization on a chip using paramagnetic beads. *Anal Chem*, 71(21):4851–9.
- Franklin, R. E. and Gosling, R. G. (1953). Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature*, 171:740–741.
- Fredriksson, S., Baner, J., Dahl, F., Chu, A., Ji, H., Welch, K., and Davis, R. W. (2007). Multiplex amplification of all coding sequences within 10 cancer genes by gene-collector. *Nucleic Acids Res.*, 35(7):e47.
- Fuchs, J., Dell’Atti, D., Buhot, A., Calemczuk, R., Mascini, M., and Livache, T. (2010). Effects of formamide on the thermal stability of dna duplexes on biochips. *Analytical biochemistry*, 397(1):132–134.
- Gillespie, S. and Gillespie, D. (1971). Ribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in aqueous solutions and in solutions containing formamide. *Biochem. J*, 125:481–487.
- Gnarpe, J., Lundbäck, A., Gnarpe, H., and Sundelöf, B. (1997). Comparison of nasopharyngeal and throat swabs for the detection of chlamydia pneumoniae and mycoplasma pneumoniae by polymerase chain reaction. *Scand J Infect Dis Suppl*, 104:11–12.
- Greene, G., Hood, K., Little, P., Verheij, T., Goossens, H., Coenen, S., and Butler, C. C. (2011). Towards clinical definitions of lower respiratory tract infection (lrti) for research and primary care practice in europe: an international consensus study. *Prim Care Respir J*, 20(3):299–306.
- Haes, A. J., Terray, A., and Collins, G. E. (2006). Bead-assisted displacement immunoassay for staphylococcal enterotoxin b on a microchip. *Anal Chem*, 78(24):8412–8420.
- Hamaguchi, K. and Geiduschek, E. P. (1962). The effect of electrolytes on the stability of the deoxyribonucleate helix. *Journal of the American Chemical Society*, 84(8):1329–1338.
- Heilemann, M., van de Linde, S., Schüttpehl, M., Kasper, R., Seefeldt, B., Mukherjee, A., Tinnefeld, P., and Sauer, M. (2008). Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(33):6172–6176.

- Hess, B. C., Okhrimenko, I. G., Davis, R. C., Stevens, B. C., Schulzke, Q. A., Wright, K. C., Bass, C. D., Evans, C. D., and Summers, S. L. (2001). Surface transformation and photoinduced recovery in cdse nanocrystals. *Phys Rev Lett*, 86(14):3132–3135.
- Hill, H. D., Vega, R. A., and Mirkin, C. A. (2007). Nonenzymatic detection of bacterial genomic dna using the bio bar code assay. *Anal. Chem.*, 79(23):9218–23.
- Holm, T., Klein, T., Löschberger, A., Klamp, T., Wiebusch, G., van de Linde, S., and Sauer, M. (2013). A blueprint for cost-efficient localization microscopy. *ChemPhysChem*, (DOI: 10.1002/cphc.201300739).
- Holmberg, A., Blomstergren, A., Nord, O., Lukacs, M., Lundeberg, J., and Uhlén, M. (2005). The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures. *ELECTROPHORESIS*, 26(3):501–510.
- Horejsh, D., Martini, F., Poccia, F., Ippolito, G., Caro, A. D., and Capobianchi, M. R. (2005). A molecular beacon, bead-based assay for the detection of nucleic acids by flow cytometry. *Nucleic Acids Res.*, 33(2):e13.
- IDT (2013). Integrated dna technologies, oligo analyzer: Online tool for oligo thermodynamics calculations on basis of [mc-tigue et al., 2004]. [Online; accessed 1-August-2013], URL: <https://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>.
- Jaiswal, J. K., Mattoussi, H., Mauro, J. M., and Simon, S. M. (2003). Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates. *Nat Biotechnol*, 21(1):47–51.
- Jungell-Nortamo, A., Syvänen, A. C., Luoma, P., and Söderlund, H. (1988). Nucleic acid sandwich hybridization: enhanced reaction rate with magnetic microparticles as carriers. *Mol Cell Probes*, 2(4):281–288.
- Junker, R., Schlebusch, H., and Luppä, P. B. (2010). Point-of-care testing in hospitals and primary care. *Dtsch Arztebl Int*, 107(33):561–7. Junker, Ralf Schlebusch, Harald Luppä, Peter B Review Germany Deutsches Arzteblatt international Dtsch Arztebl Int. 2010 Aug;107(33):561-7. Epub 2010 Aug 20.
- Kabra, S. K., Lodha, R., and Pandey, R. M. (2010). Antibiotics for community-acquired pneumonia in children. *Cochrane Database Syst Rev*, (3):CD004874.

- Kaur, H., Wengel, J., and Maiti, S. (2008). Thermodynamics of dna-rna heteroduplex formation: effects of locked nucleic acid nucleotides incorporated into the dna strand. *Biochemistry*, 47(4):1218–1227.
- Kavanagh, P. and Leech, D. (2006). Redox polymer and probe dna tethered to gold electrodes for enzyme-amplified amperometric detection of dna hybridization. *Anal. Chem.*, 78(8):2710–2716.
- Keijser, B. J. F., Zaura, E., Huse, S. M., van der Vossen, J. M. B. M., Schuren, F. H. J., Montijn, R. C., ten Cate, J. M., and Crielaard, W. (2008). Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *J Dent Res*, 87(11):1016–1020.
- Kim, Y., Kim, B., Lee, J., Kim, J., and Gu, M. (2006). Specific detection of dna using quantum dots and magnetic beads for large volume samples. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 11(5):449–454.
- Klamp, T., Camps, M., Nieto, B., Guasch, F., Ranasinghe, R. T., Wiedemann, J., Petràšek, Z., Schwille, P., Klenerman, D., and Sauer, M. (2013). Highly rapid amplification-free and quantitative dna imaging assay. *Sci Rep*, 3:1852.
- Koshkin, A. A., Singh, S. K., Nielsen, P., Rajwanshi, V. K., Kumar, R., Meldgaard, M., Olsen, C. E., and Wengel, J. (1998). Lna (locked nucleic acids): Synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition. *Tetrahedron*, 54(14):3607–3630.
- Kukol, A., Li, P., Estrela, P., Ko-Ferrigno, P., and Migliorato, P. (2008). Label-free electrical detection of dna hybridization for the example of influenza virus gene sequences. *Anal. Biochem.*, 374(1):143–153.
- Kumar, A., Roberts, D., Wood, K. E., Light, B., Parrillo, J. E., Sharma, S., Suppes, R., Feinstein, D., Zanotti, S., Taiberg, L., Gurka, D., Kumar, A., and Cheang, M. (2006). Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Critical care medicine*, 34(6):1589–96. Comparative Study Journal Article Multicenter Study Research Support, Non-U.S. Gov't 0355501 United States.
- Lehr, H. P., Reimann, M., Brandenburg, A., Sulz, G., and Klapproth, H. (2003). Real-time detection of nucleic acid interactions by total internal reflection fluorescence. *Anal. Chem.*, 75(10):2414–2420.

- Li, H., Ying, L., Green, J. J., Balasubramanian, S., and Klenerman, D. (2003). Ultrasensitive coincidence fluorescence detection of single dna molecules. *Anal. Chem.*, 75(7):1664–70. Li, Haitao Ying, Liming Green, Jeremy J Balasubramanian, Shankar Klenerman, David Research Support, Non-U.S. Gov't United States Analytical chemistry *Anal Chem.* 2003 Apr 1;75(7):1664-70.
- Liu, C.-H., Li, Z.-P., Du, B.-A., Duan, X.-R., and Wang, Y.-C. (2006). Silver nanoparticle-based ultrasensitive chemiluminescent detection of dna hybridization and single-nucleotide polymorphisms. *Anal. Chem.*, 78(11):3738–3744.
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., and Law, M. (2012). Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012.
- Liu, Y.-J., Yao, D.-J., Chang, H.-Y., Liu, C.-M., and Chen, C. (2008). Magnetic bead-based dna detection with multi-layers quantum dots labeling for rapid detection of escherichia coli o157:h7. *Biosens Bioelectron*, 24(4):558–565.
- Loens, K., Ursi, D., Goossens, H., and Ieven, M. (2003). Molecular diagnosis of mycoplasma pneumoniae respiratory tract infections. *Journal of clinical microbiology*, 41(11):4915–4923.
- Mahony, J. B. (2008). Detection of respiratory viruses by molecular methods. *Clinical microbiology reviews*, 21(4):716–747.
- Mandell, G.L., B. J. D. R. (2000). Mandell, douglas and bennett's principles and practice of infectious diseases. *Chemotherapy*, 46(6):445–446.
- Markham, N. R. and Zuker, M. (2005). Dinamelt web server for nucleic acid melting prediction. *Nucleic acids research*, 33(suppl 2):W577–W581.
- Maskos, U. and Southern, E. M. (1993). A study of oligonucleotide reassociation using large arrays of oligonucleotides synthesised on a glass support. *Nucleic acids research*, 21(20):4663–4669.
- Mauldin, P. D., Salgado, C. D., Hansen, I. S., Durup, D. T., and Bosso, J. A. (2010). Attributable hospital cost and length of stay associated with health care-associated infections caused by antibiotic-resistant gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54(1):109–15. Mauldin, Patrick D Salgado, Cassandra D Hansen, Ida Solhoj Durup, Darshana T Bosso, John A Research Support, Non-U.S. Gov't United States Antimicrobial agents and chemotherapy *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Jan;54(1):109-15. Epub 2009 Oct 19.

- Mayr, T., Moser, C., and Klimant, I. (2009). Performance of fluorescent labels in sedimentation bead arrays—a comparison study. *J Fluoresc*, 19(2):303–310.
- McTigue, P. M., Peterson, R. J., and Kahn, J. D. (2004). Sequence-dependent thermodynamic parameters for locked nucleic acid (lna)-dna duplex formation. *Biochemistry*, 43(18):5388–5405.
- Merkoçi, A., Aldavert, M., Tarrasòn, G., Eritja, R., and Alegret, S. (2005). Toward an icpms-linked dna assay based on gold nanoparticles immunocconnected through peptide sequences. *Anal. Chem.*, 77(19):6500–6503.
- Micek, S. T., Welch, E. C., Khan, J., Pervez, M., Doherty, J. A., Reichley, R. M., Hoppe-Bauer, J., Dunne, W. M., and Kollef, M. H. (2011). Resistance to empiric antimicrobial treatment predicts outcome in severe sepsis associated with gram-negative bacteremia. *Journal of Hospital Medicine*, 6(7):405–410.
- Minunni, M., Mannelli, I., Spiriti, M. M., Tombelli, S., and Mascini, M. (2004). Detection of highly repeated sequences in non-amplified genomic dna by bulk acoustic wave (baw) affinity biosensor. *Analytica chimica acta*, 526(1):19–25.
- Minunni, M., Tombelli, S., Fonti, J., Spiriti, M. M., Mascini, M., Bogani, P., and Buiatti, M. (2005). Detection of fragmented genomic dna by pcr-free piezoelectric sensing using a denaturation approach. *J Am Chem Soc*, 127(22):7966–7967.
- Mir, K. U. (1995). *Novel approaches for the analysis of nucleic acids*. PhD thesis, Oxford University.
- Nagl, S., Schaeferling, M., and Wolfbeis, O. S. (2005). Fluorescence analysis in microarray technology. *Microchimica Acta*, 151(1-2):1–21.
- Nam, J. M., Stoeva, S. I., and Mirkin, C. A. (2004). Bio-bar-code-based dna detection with pcr-like sensitivity. *J. Am. Chem. Soc.*, 126(19):5932–3. Nam, Jwa-Min Stoeva, Savka I Mirkin, Chad A Research Support, U.S. Gov’t, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov’t, P.H.S. United States Journal of the American Chemical Society J Am Chem Soc. 2004 May 19;126(19):5932-3.
- Ngaosuwankul, N., Noisumdaeng, P., Komolsiri, P., Pooruk, P., Chokephai-bulkit, K., Chotpitayasunondh, T., Sangsajja, C., Chuchottaworn, C., Farrar, J., and Puthavathana, P. (2010). Influenza a viral loads in respiratory samples collected from patients infected with pandemic h1n1, seasonal h1n1 and h3n2 viruses. *Virol J*, 7:75.

- Nicolau, D. P. (2011). Current challenges in the management of the infected patient. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 24 Suppl 1:S1–10. Nicolau, David P Research Support, Non-U.S. Gov't Review United States Current opinion in infectious diseases *Curr Opin Infect Dis.* 2011 Feb;24 Suppl 1:S1-10.
- Nie, L., Yang, Y., Li, S., and He, N. (2007). Enhanced dna detection based on the amplification of gold nanoparticles using quartz crystal microbalance. *Nanotechnology*, 18:305501.
- Nielsen, P. E., Egholm, M., Berg, R. H., and Buchardt, O. (1991). Sequence-selective recognition of dna by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science*, 254(5037):1497–1500.
- Nielsen, P. E., Egholm, M., and Buchardt, O. (1994). Peptide nucleic acid (pna). a dna mimic with a peptide backbone. *Bioconjugate chemistry*, 5(1):3–7.
- Nielsen, P. E. and Haaima, G. (1997). Peptide nucleic acid (pna). a dna mimic with a pseudopeptide backbone. *Chemical society reviews*, 26(2):73–78.
- Obika, S., Nanbu, D., Hari, Y., Andoh, J.-i., Morio, K.-i., Doi, T., and Imanishi, T. (1998). Stability and structural features of the duplexes containing nucleoside analogues with a fixed n-type conformation, 2 - o, 4 - c-methylenribonucleosides. *Tetrahedron letters*, 39(30):5401–5404.
- Obika, S., Nanbu, D., Hari, Y., Morio, K.-i., In, Y., Ishida, T., and Imanishi, T. (1997). Synthesis of 2 - o, 4 - c-methyleneuridine and-cytidine. novel bicyclic nucleosides having a fixed c< sub> 3</sub>,-endo sugar puckering. *Tetrahedron Letters*, 38(50):8735–8738.
- Petersen, M., Nielsen, C. B., Nielsen, K. E., Jensen, G. A., Bondensgaard, K., Singh, S. K., Rajwanshi, V. K., Koshkin, A. A., Dahl, B. M., Wengel, J., et al. (2000). The conformations of locked nucleic acids (lna). *Journal of Molecular Recognition*, 13(1):44–53.
- Peterson, A. W., Heaton, R. J., and Georgiadis, R. M. (2001). The effect of surface probe density on dna hybridization. *Nucleic Acids Res.*, 29(24):5163–8.
- Reiss, P., Bleuse, J., and Pron, A. (2002). Highly luminescent cdse/znse core/shell nanocrystals of low size dispersion. *Nano letters*, 2(7):781–784.
- Riccelli, P. V., Merante, F., Leung, K. T., Bortolin, S., Zastawny, R. L., Janeczko, R., and Benight, A. S. (2001). Hybridization of single-stranded dna targets

- to immobilized complementary dna probes: comparison of hairpin versus linear capture probes. *Nucleic Acids Res*, 29(4):996–1004. Riccelli, P V Merante, F Leung, K T Bortolin, S Zastawny, R L Janeczko, R Benight, A S England Nucleic acids research Nucleic Acids Res. 2001 Feb 15;29(4):996-1004.
- Roeser, T., Heirstraeten, L. V., Spang, P., Schwind, C., Álvarez, B. N., Serra, M. C., Landgraf, B. E., Guasch, F., Corbera, A. H., Goossens, H., et al. (2011). Ca-Irti diagnostik-automatisierte probenvorbereitung zur analyse von abstrichproben. *MikroSystemTechnik*.
- Sadhu, C., Dutta, S., and Gopinathan, K. (1984). Influence of formamide on the thermal stability of dna. *Journal of Biosciences*, 6(6):817–821.
- Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fiddes, C. A., Hutchison, C. A., Slocombe, P. M., and Smith, M. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage phi x174 dna. *Nature*, 265(5596):687–695.
- SantaLucia, J. (1998). A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide dna nearest-neighbor thermodynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(4):1460–1465.
- Saubolle, M. A. and McKellar, P. P. (2001). Laboratory diagnosis of community-acquired lower respiratory tract infection. *Infectious Disease Clinics Of North America*, 15(4):1025–1045.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., and Eliceiri, K. W. (2012). Nih image to imagej: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, 9(7):671–675.
- Schrödinger (2010). The PyMOL molecular graphics system, version 1.3, Schrödinger, LLC.
- Shui, L., Bomer, J. G., Jin, M., Carlen, E. T., and van den Berg, A. (2011). Microfluidic dna fragmentation for on-chip genomic analysis. *Nanotechnology*, 22(49):494013.
- Singh, S. K., Koshkin, A. A., Wengel, J., and Nielsen, P. (1998). Lna (locked nucleic acids): synthesis and high-affinity nucleic acid recognition. *Chemical Communications*, (4):455–456.
- Southern, E., Mir, K., and Shchepinov, M. (1999). Molecular interactions on microarrays. *Nat Genet*, 21(1 Suppl):5–9. Southern, E Mir, K Shchepinov, M Review United states Nature genetics Nat Genet. 1999 Jan;21(1 Suppl):5-9.

- Stanton, N., Francis, N. A., and Butler, C. C. (2010). Reducing uncertainty in managing respiratory tract infections in primary care. *The British Journal of General Practice*, 60(581):e466.
- Steel, A. B., Levicky, R. L., Herne, T. M., and Tarlov, M. J. (2000). Immobilization of nucleic acids at solid surfaces: effect of oligonucleotide length on layer assembly. *Biophys J*, 79(2):975–81.
- Syvanen, A. C. (2005). Toward genome-wide snp genotyping. *Nat. Genet.*, 37 Suppl:S5–10. Syvanen, Ann-Christine Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't United States Nature genetics Nat Genet. 2005 Jun;37 Suppl:S5-10.
- Terpetschnig, E. A., Patsenker, L. D., and Tatarets, A. (2004). Luminescent compounds.
- Tinnefeld, P. and Sauer, M. (2005). Neue wege in der einzelmolekül-fluoreszenzspektroskopie: Herausforderungen für die chemie und einfluss auf die biologie. *Angewandte Chemie*, 117(18):2698–2728.
- Tyagi, S., Kramer, F. R., et al. (1996). Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nature biotechnology*, 14(3):303–308.
- Vainrub, A. and Pettitt, B. M. (2002). Coulomb blockage of hybridization in two-dimensional dna arrays. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 66(4 Pt 1):041905.
- van de Linde, S., Löschberger, A., Klein, T., Heidbreder, M., Wolter, S., Heilemann, M., and Sauer, M. (2011). Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. *Nature protocols*, 6(7):991–1009.
- Vander Stichele, R., Elseviers, M. M., Ferech, M., Blot, S., Goossens, H., et al. (2006). Hospital consumption of antibiotics in 15 european countries: results of the esac retrospective data collection (1997–2002). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(1):159–167.
- Vester, B. and Wengel, J. (2004). Lna (locked nucleic acid): high-affinity targeting of complementary rna and dna. *Biochemistry*, 43(42):13233–41. Vester, Birte Wengel, Jesper Research Support, Non-U.S. Gov't Review United States Biochemistry Biochemistry. 2004 Oct 26;43(42):13233-41.
- Wang, L., Cole, K. D., Gaigalas, A. K., and Zhang, Y.-Z. (2005). Fluorescent nanometer microspheres as a reporter for sensitive detection of simulants

- of biological threats using multiplexed suspension arrays. *Bioconjug Chem*, 16(1):194–199.
- Waring, A. L., Halse, T. A., Csiza, C. K., Carlyn, C. J., Musser, K. A., and Limberger, R. J. (2001). Development of a genomics-based pcr assay for detection of mycoplasma pneumoniae in a large outbreak in new york state. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(4):1385–1390.
- Watson, J. D., Crick, F. H., et al. (1953). Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, 171(4356):737–738.
- WHO (2004). *World Health Organization, the world health report 2004: changing history*. World Health Organization.
- Wolter, S., Löscherger, A., Holm, T., Aufmkolk, S., Dabauvalle, M.-C., van de Linde, S., and Sauer, M. (2012). rapidstorm: accurate, fast open-source software for localization microscopy. *Nature methods*, 9(11):1040–1041.
- Yahiatène, I., Doose, S., Huser, T., and Sauer, M. (2012). Correlation-matrix analysis of two-color coincidence events in single-molecule fluorescence experiments. *Anal Chem*, 84(6):2729–36.
- Yakovchuk, P., Protozanova, E., and Frank-Kamenetskii, M. D. (2006). Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the dna double helix. *Nucleic acids research*, 34(2):564–574.
- Zhang, C.-Y. and Johnson, L. W. (2006). Homogenous rapid detection of nucleic acids using two-color quantum dots. *Analyst*, 131(4):484–488.

Publikationen

Folgende Publikationen liegen dieser Arbeit zu Grunde:

Klamp, T., Camps, M., Nieto, B., Guasch, F., Ranasinghe, R. T., Wiedemann, J., Petràšek, Z., Schwille, P., Klenerman, D., and Sauer, M. (2013). Highly rapid amplification-free and quantitative dna imaging assay. *Sci Rep*, 3:1852.

Klamp, T., Yahiatène, I., Lampe, A., Schüttpelz, M., and Sauer, M. (2011). A reliable and sensitive bead-based fluorescence assay for identification of nucleic acid sequences. *Proc. SPIE 7905, Single Molecule Spectroscopy and Imaging IV*, 79050N (February 22, 2011); doi:10.1117/12.874567

Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei allen denen Personen bedanken, die mich für die Zeit der letzten Jahre in unterschiedlichster Form unterstützt und somit einen Teil zu dieser Arbeit beigetragen haben. In erster Linie gilt mein Dank Markus Sauer. Er hat es mir nicht nur ermöglicht in der Arbeitsgruppe für Angewandte Lasersphysik und Laserpektroskopie in Bielefeld mit der Arbeit zu beginnen, sondern auch die Chance gegeben meine Arbeiten am Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik in Würzburg fortzusetzen. Danke für viel Inspiration und Motivation und dafür ein super Chef zu sein!

Für unendlich viel Unterstützung in allen Bereichen, fachlicher und privater Natur danke ich Sebastian van de Linde. Danke für die langen Nächte in Büro und Labor, für viel Spaß in allen Lagen und schweren Zeiten. Auf eine ewig währende Freundschaft - Cheers!

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für Biomolecular Photonics in Bielefeld danke ich für die lange gute Zeit der Zusammenarbeit. Besonders Fabian Humpert, Idir Yahiatène und Simon Hennig für das beste Büro aller Zeiten und ein tolles und bereicherndes Teamwork - Idir, wir haben das Labor gerockt!

Gerd Wiebusch, mein persönlicher Held der Lasertechnik und Optik, sei für viel technische Unterstützung und die Konzeption des fluoreszenzmikroskopischen Aufbaus gedankt, Reinhild Pätzmann dafür das organisatorische Rückgrat zu bilden. Thomas Huser danke ich für den stets netten Empfang in Bielefeld, für viel Verständnis und für die Bereitstellung seiner Räumlichkeiten.

André Lampe sei an dieser Stelle für die alternative Auswertesoftware für die ersten Messungen gedankt. Er war nicht nur ein famoser Padawan und Kollege, sondern auch Freund und Bruder im Geiste.. und so...

Auch die Würzburger Kollegen des Lehrstuhls für für Biotechnologie und Biophysik sollen an dieser Stelle begrüßt sein. Auch dort herrschte stets eine hilfsbereite und nette Arbeitsatmosphäre. Christian Franke danke ich für viele Diskussionen und Anregungen, Teresa Klein für Hilfe bei der Molekularbiologie der BgDNA.

Ich möchte mich ebenso bei den zahlreichen Partnern des TheraEDGE-Konsortiums für eine gute Zusammenarbeit, schöne Abende und herzliche Gastfreund-

Danksagung

schaft an vielen fremden Orten bedanken. Besonders danke ich Rohan T. Ranasinghe für kritische Korrespondenz und Marta Camps für Kontrollmessungen mittels PCR.

Neben allen Kollegen danke ich insbesondere meiner Familie für die Unterstützung und die Rücksicht während der langen Zeit. Gilla, Wolfgang, danke für einfach Alles - W. besonders für die Identifizierung zahlreicher Typos in letzter Sekunde. Vielen Dank Inken für viel Rücksicht und Fürsorge ;)