

Elektrochemische DNA-Detektion mit Hilfe eines Hybridisierungsassays: Effekte von Temperatur und Fehlpaarungen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock



von:
Katarzyna Maria Biała

Rostock, Juli 2016

Gutachter:

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. habil. Gerd-Uwe Flechsig
Department of Chemistry,
University at Albany SUNY
2. Gutachter: Prof. Dr. Frank-Michael Matysik
Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik,
Universität Regensburg

Datum der Einreichung: 05. Juli 2016

Datum der Verteidigung: 10. Januar 2017

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	5
2.	ZIELSETZUNG	8
3.	THEORETISCHER TEIL.....	10
3.1	Desoxyribonukleinsäure (DNA)	10
3.1.1	Strukturelle Eigenschaften der DNA	11
3.1.2	Denaturierung und Renaturierung von DNA.....	14
3.2	DNA-Fehlpaarungen	18
3.2.1	Einfluss von Fehlpaarungen auf die DNA-Stabilität	20
3.2.2	Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP).....	21
3.3	Elektrochemische DNA-Sensoren	22
3.3.1	Immobilisierung der DNA-Sonden auf Goldelektroden	24
3.3.2	Elektrochemische Detektion von Einzelbasenfehlpaarungen	28
3.4	DNA-Analyse bei erhöhten Temperaturen	32
3.4.1	Geheizte Elektroden	34
3.4.2	Thermodiffusion	36
4.	ELEKTROCHEMISCHES STRANGVERDRÄNGUNGSASSAY FÜR DIE SNP-DETEKTION	37
4.1	Einleitung.....	37
4.2	Experimentelles	38
4.3	Ergebnisse und Diskussion	44
4.4	Zusammenfassung	56
5.	EINFLUSS DER TEMPERATUR UND DER NUKLEOTIDSEQUENZ AUF DIE KINETIK DER DNA-STRANGVERDRÄNGUNG AUF GOLDELEKTRODEN	58
5.1	Einleitung.....	58
5.2	Experimentelles	58
5.3	Ergebnisse und Diskussion	62
5.4	Zusammenfassung	74
6.	ELEKTROCHEMISCHES SANDWICH-HYBRIDISIERUNGSASSAY FÜR DIE DETEKTION VON EINZELBASENFEHLPAARUNGEN.....	75
6.1	Einleitung.....	75
6.2	Experimentelles	75

6.3	Ergebnisse und Diskussion	79
6.4	Zusammenfassung	85
7.	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	86
8.	DANKSAGUNG.....	88
9.	LITERATURVERZEICHNIS	89

Abkürzungen

A	präexponentieller Faktor
ACV	Alternating Current Voltammetry
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CV	cyclic voltammetry (zyklische Voltammetrie)
d. h.	das heißt
dist	distal
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTPA	Dithiol-Phosphoramidite
E_a	Aktivierungsenergie
EIS	elektrochemische Impedanzspektroskopie
FM	full-matched target (komplementäres Target)
K_D	Dissoziationskonstante
MCH	6-Mercapto-1-hexanol
MM	mismatched target (Target mit einer Fehlpaarung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
prox	proximal
pT	protected thymine (geschütztes Thymin)
R_{CT}	charge transfer resistance (Durchtrittswiderstand)
SAM	self-assembled monolayer (selbstorganisierende Monoschicht)
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
ssDNA	single-stranded DNA (einzelnsträngige DNA)
SWV	Square-Wave-Voltammetrie
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
T_{hybr}	Hybridisierungstemperatur
u. a.	unter anderem
uT	ungepaartes Thymin
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Seit der vollständigen Entschlüsselung des menschlichen Genoms im Jahre 2001 im Rahmen des internationalen Humangenomprojektes (HGP) und gleichzeitig durch die US-amerikanische Firma Celera Genomics [1,2] steht die Bestimmung der Funktion einzelner Gene und Genomabschnitte im Fokus. Die erstmalige Sequenzierung im Rahmen des HGP dauerte ca. 11 Jahre und kostete ungefähr 3 Milliarden US Dollar. Seit 2001 sind sowohl die Kosten als auch der Zeitaufwand der Sequenzierung durch die Einführung der Next-Generation Sequenzierungstechnologien (engl. Next Generation Sequencing, NGS) enorm gesunken [3]. Dies eröffnete die Möglichkeit zur Identifizierung einer großen Anzahl der am häufigsten auftretenden genetischen Variationen - der Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) und deren phänotypischen Auswirkungen [4]. Diese Variationen in einzelnen Basenpaaren in der DNA spielen eine große Rolle sowohl für die medizinische Diagnostik als auch für die forensische Molekulargenetik und Anthropologie [5]. Durch die zahlreichen Erkenntnisse in diesen Bereichen wächst der Bedarf nach schnellen und unkomplizierten Biosensoren zur sequenzspezifischen Detektion der Desoxyribonukleinsäure. Dabei ist es wichtig, eine einzige Fehlpaarung in der DNA zuverlässig zu erkennen.

Zu den routinemäßig eingesetzten Verfahren zum Nachweis bekannter Einzelbasen-Polymorphismen gehören die fluoreszenzbasierende Microarray-Technologie, die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) unter Verwendung von Hydrolisierungs sonden im TaqMan-Assay oder von Hybridisierungs sonden in der LightCycler-Technologie [6] sowie die NGS [4].

Neben vielen Vorteilen der etablierten Untersuchungsmethoden haben sie doch einige Schwachpunkte. Die qRT-PCR-Methoden benötigen stets zwei Primer: einen Forward- und Reverse-Primer sowie eine innerhalb der Sequenz lokalisierte fluoreszenzmarkierte Sonde. Ein Nachteil der fluoreszenzmarkierten Sonden besteht in ihren begrenzten Haltbarkeiten [6] sowie in hohen Kosten für die Fluoreszenzfarbstoffe selbst und deren kovalente Anbindung an die DNA.

Sequenziergeräte erzeugen enorm große Datenmengen. Die Datenanalyse ist daher mit hohen Ausrüstungskosten sowie apparativem Aufwand verbunden. Die klinische Diagnostik

erfordert jedoch normalerweise die Analyse spezifischer Marker und keine umfangreichen Screenings, welche die angesprochenen Datenmengen produzieren [7]. Darüber hinaus gestaltet sich die Miniaturisierung der optischen Messgeräte als schwierig.

Die elektrochemischen Methoden zur Detektion des Hybridisierungsvorgangs, der auf sequenzspezifischer Wechselwirkung zweier komplementärer DNA-Stränge basiert, stellen daher eine gute Alternative dar. Bei elektrochemischen DNA-Sensoren wird der apparative Aufwand der Messung und Auswertung reduziert, da ein elektronisches Signal direkt ohne Notwendigkeit zusätzlicher und kostenaufwendiger Signalwandlung gemessen werden kann. Zudem ermöglichen die elektrochemisch basierten Methoden die Miniaturisierung und Vereinfachung des Nachweisverfahrens und daher eine Vor-Ort-Analytik [8].

Bei der sequenzspezifischen DNA-Analyse spielt die Temperatur eine sehr wichtige Rolle. Viele gegenwärtig routinemäßig eingesetzte Methoden zur DNA-Analyse, die vorwiegend auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion beruhen, basieren auf der Temperaturabhängigkeit der reversiblen Hybridisierungs- und Denaturierungseigenschaften der Desoxyribonukleinsäure. Auch bei der elektrochemischen DNA-Detektion ist die Temperatur ein sehr wichtiger Faktor. Eine beträchtliche Erhöhung eines voltammetrischen Signals wurde während der Hybridisierungsdetektion immobilisierter DNA-Sonden mit komplementären redoxaktiven ssDNA-Targetsträngen bei optimaler Hybridisierungstemperatur beobachtet [9, 10]. Die Abhängigkeit des Temperaturverhaltens einer DNA-Sequenz von ihrer Nukleotidabfolge wurde jedoch bisher nicht genau untersucht. Daher sind die Aspekte des Temperaturverhaltens bezogen auf die Sequenzabfolge ein Bestandteil dieser Dissertation. Weiterhin wird die Temperatur oft zur Detektion von Basenfehlpaarungen mittels elektrochemischer Schmelzkurvenanalysen eingesetzt [11, 12, 13, 14, 15]. Der Unterschied in den Schmelztemperaturen untersuchter DNA ergibt sich u. a. aus der Destabilisierung der doppelsträngigen Desoxyribonukleinsäure durch fehlgepaarte Basenpaare. Anhand der Schmelztemperaturdifferenz ist die Unterscheidung zwischen perfekt komplementärer und fehlgepaarter dsDNA möglich. Die destabilisierenden Einflüsse einer einzigen Basenfehlpaarung können jedoch, besonders im Falle relativ stabiler Basenfehlpaarungen wie dem G-T-Wobble-Paar, nur schwach ausgeprägt sein. Dies kann in beschränkter Sensitivität des Verfahrens resultieren. In der vorliegenden Arbeit wird bei der elektrochemischen SNP-Detektion der Unterschied thermischer Stabilitäten aufgrund der

destabilisierenden Auswirkungen von Einzelbasenfehlpaarungen mit kompetitiven Effekten während der Strangverdrängungsreaktionen kombiniert. Im Vergleich mit einfachen Schmelzkurvenanalysen können die kompetitiven Faktoren die SNP-Differenzierung unter Verwendung eines optimierten Assay-Designs deutlich verbessern. Daher werden im Rahmen dieser Arbeit die Effekte von auf verschiedene Arten fehlgepaarten DNA-Doppelsträngen innerhalb eines Assays auf die Kinetik der Hybridisierungsvorgänge untersucht.

2. Zielsetzung

Im Fokus der vorliegenden Dissertation steht die Erforschung der Effekte von Temperatur, Fehlpaarungen sowie der DNA-Sequenzabfolge auf die Kinetik der Hybridisierungsvorgänge. Ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit sind die Untersuchungen zur thermischen Diskriminierung von Einzelbasenunterschieden in den pathologisch relevanten DNA-Sequenzen unter Verwendung von elektrochemischen Strangverdrängungsassays.

Für die Detektion der für Autoimmunerkrankungen relevanten SNPs wurde ein kompetitives Hybridisierungsassay unter Verwendung von Schutzsträngen und $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ -markierten Targetsequenzen eingesetzt. Die Effekte der Anzahl, Art und Lage von Fehlpaarungen auf den Strangverdrängungsprozess wurden mit Hilfe der Square-Wave-Voltammetrie bei verschiedenen Temperaturen untersucht. Zusätzlich sollten die möglichen Auswirkungen der Position des Markers, am proximalen (5'-) oder distalen (3'-) Ende des Targets bezüglich der Elektrodenoberfläche, auf die SWV-Signale geprüft werden (Kapitel 4).

Eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit bestand in der Durchführung der Detektion von Einzelbasenfehlpaarungen mit Hilfe eines kompetitiven Sandwich-Hybridisierungsassays. Das Sandwich-Hybridisierungsassay ermöglicht die DNA-Detektion ohne die Notwendigkeit direkter Modifizierung des Targets. Das Markierungsverfahren unter Verwendung von Schutzsträngen wurde dabei eingesetzt, um $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ -markierte Reporterstränge herzustellen (Kapitel 6).

Die oben genannten grundlegenden Untersuchungen wurden mit Hilfe einer Goldscheibenelektrode in einer geheizten Hybridisierungslösung durchgeführt. Da eine Miniaturisierung des Detektionssystems im Bereich der DNA-Analyse sehr erwünscht ist, stellen die direkt geheizten Elektroden eine gute Alternative zum Heizen der gesamten Analysenlösung dar. Dadurch könnten direkt geheizte elektrochemische DNA-Microarrays zum Einsatz kommen, wobei mehrere Sequenzen gleichzeitig auf einer kleinen Chip-Fläche auf verschiedene Temperaturen geheizt werden könnten. Dafür sollten im Vorfeld die komplexen Auswirkungen der Oberflächenumgebung der direkt geheizten Elektrode auf die Kinetik des Strangverdrängungsprozesses sowie auf das sequenzspezifische Hybridisierungsverhalten untersucht werden. In diesem Zusammenhang wurden

unterschiedliche DNA-Sequenzen an direkt und indirekt geheizten Elektroden untersucht und deren Temperaturverhalten sowie Hybridisierungseffizienz anhand der SWV-Signale miteinander verglichen (Kapitel 5).

3. Theoretischer Teil

3.1 Desoxyribonukleinsäure (DNA)

DNA ist eines der wichtigsten Biomoleküle, das für die Speicherung und Weitergabe der genetischen Information verantwortlich ist.

Die menschliche DNA liegt im Zellkern als sogenanntes Chromatin (Struktur aus DNA, Histonen und anderen Proteinen) verpackt vor. Der Grundbaustein des Chromatins (Nucleosom) besteht aus einem Abschnitt der DNA, der um einen Kern aus Histonproteinen gewickelt ist. Diese kompakte Chromatinstruktur ermöglicht die Verpackung der enormen Länge (2 m) der DNA im Zellkern. Das Chromatin wird während der Mitose in dicht gepackten Chromosomen angeordnet.

Die DNA-Stränge bestehen aus kodierenden Sequenzen (Genen) und langen nichtkodierenden Abschnitten. Letztere liegen zwischen den Genen und werden als Intergensequenzen bezeichnet. Die Gene selbst bestehen aus proteinkodierenden Sequenzen (Exons), die durch nichtkodierende Abschnitte (Introns) unterbrochen werden. Dabei bildet der kodierende Teil der DNA lediglich 1-2 % des ganzen menschlichen Genoms [16]. Die nichtkodierenden Bereiche zeichnen sich durch sich wiederholende Abschnitte, die sogenannten repetitiven Sequenzen, aus. Die autosomalen STRs (Short Tandem Repeats), die sich in den nichtkodierenden Bereichen befinden, werden zur Identifizierung von menschlichen Individuen genutzt [17].

3.1.1 Strukturelle Eigenschaften der DNA

Desoxyribonukleinsäure ist ein Biopolymer, das sich aus vier unterschiedlichen Monomeren, den so genannten Nukleotiden, zusammensetzt. Jedes Nukleotid besteht wiederum aus drei Einzelbausteinen:

- einer 2'-Desoxyribose (eine Ribose, an der die Hydroxylgruppe am C-2-Atom durch Wasserstoff ersetzt ist, Abbildung 1),
- einer Phosphatgruppe, die über eine Phosphoesterbindung am 5'-Kohlenstoffatom der 2'-Desoxyribose verknüpft ist,
- einer Purin- (Adenin/Guanin) oder Pyrimidinbase (Cytosin/Thymin) (Abbildung 2), die mit der C-1'-Position der 2'-Desoxyribose verbunden ist.

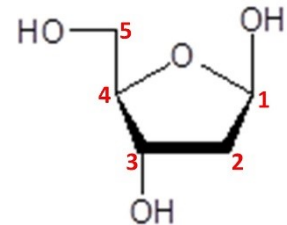


Abbildung 1: 2'-Desoxyribose

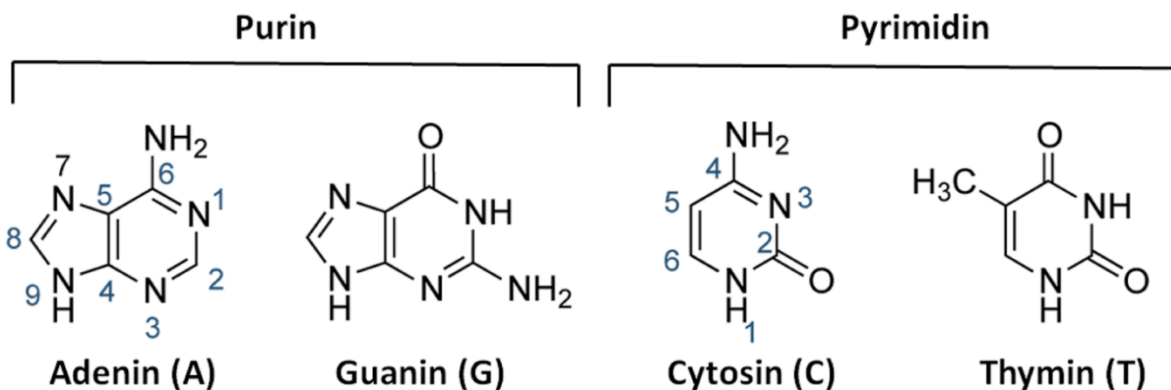


Abbildung 2: Strukturen der vier verschiedenen Nukleinbasen der DNA.

Jede der vier Basen kommt in einer von zwei verschiedenen tautomeren Formen vor, wobei die beiden Strukturisomere miteinander im Gleichgewicht stehen. Die im Adenin am C-6 und im Cytosin am C-4 gebundenen Aminogruppen können auch in der Iminoform vorliegen. Das Gleichgewicht ist jedoch sehr stark in Richtung der Aminoform verschoben. Im Fall des Thymins und Guanins tritt Keto-Enol-Tautomerie auf, wobei das Ketotautomer

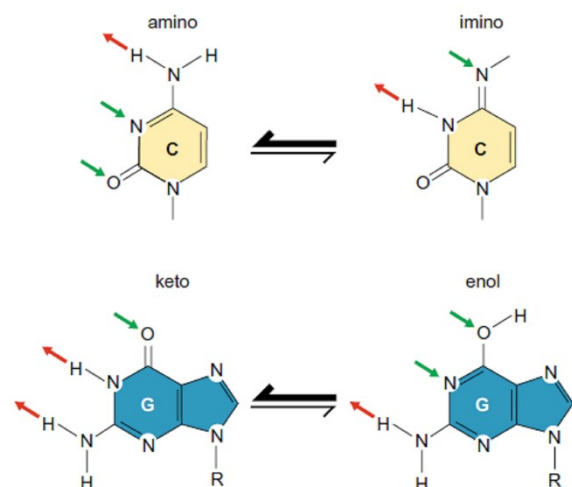


Abbildung 3: Die Amino/Imino- und die Keto/Enol-Tautomerie der Nukleinbasen (übernommen mit Genehmigung von [18]).

im Gleichgewichtszustand überwiegt (Abbildung 3) [18]. Das Auftreten verschiedener tautomerer Formen kann zu Fehlern bei der DNA-Replikation führen.

In einem Polynukleotid sind die einzelnen Nukleotide jeweils über Phosphodiesterbindungen zwischen den 3'-Hydroxylgruppen des einen Nukleotids und den 5'-Phosphatgruppen eines benachbarten Nukleotids miteinander verbunden (Abbildung 4, links) [19]. Somit sind zwei von drei Hydroxylgruppen der Phosphorsäure verestert und können kein Proton mehr freisetzen. Für den sauren Charakter der DNA ist die dritte ungebundene Hydroxylgruppe verantwortlich. Sie agiert als Protonendonator bzw. liegt in der Zelle deprotoniert vor. Unter physiologischen Bedingungen (pH 7.4) ist die Nukleinsäure daher insgesamt negativ geladen (Abbildung 4, links).

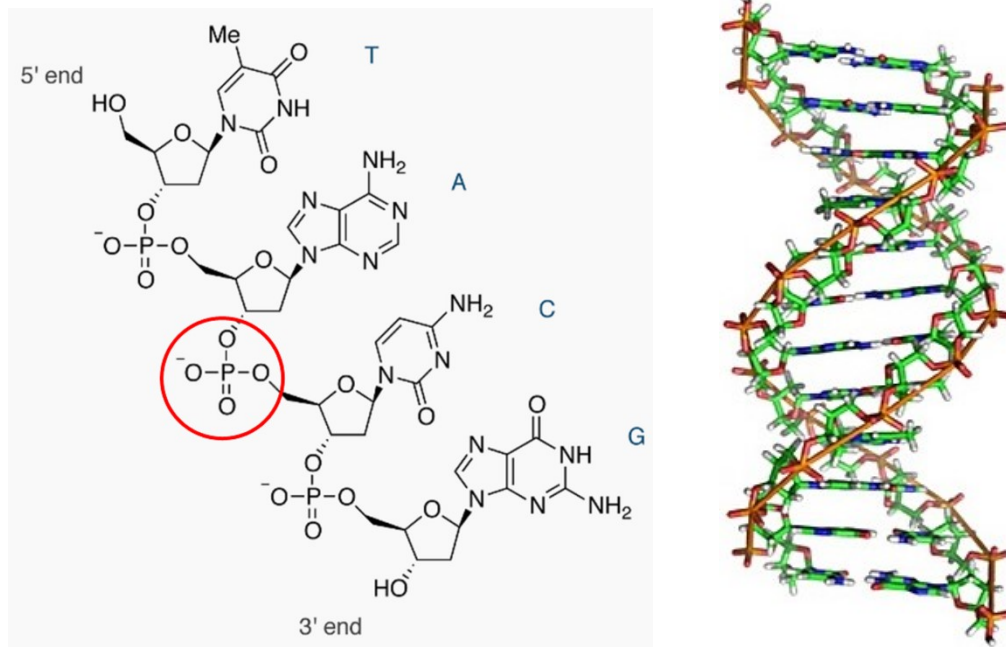


Abbildung 4: Links: Ein Ausschnitt eines DNA-Einzelstranges; Rechts: Doppelhelikale Struktur der DNA (entnommen von [20]).

Desoxyribonukleinsäure liegt in ihrer natürlichen Form als Doppelstrang helikal vor, wobei der größte Teil der DNA in der Zelle eine B-Konformation annimmt [21] (Abbildung 4, rechts). Die Doppelhelix der B-DNA ist rechtsgängig und umfasst zehn Basenpaare pro Umdrehung. Dabei verlaufen die zwei Polynukleotidstränge antiparallel und werden durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen sich gegenüberliegenden komplementären Basen zusammengehalten. Diese sogenannten Watson-Crick-Basenpaarungen erfolgen jeweils zwischen den Basen Adenin des einen und Thymin des anderen Stranges (über zwei

Wasserstoffbrücken) sowie zwischen Guanin und Cytosin (über drei Wasserstoffbrücken) (Abbildung 5).

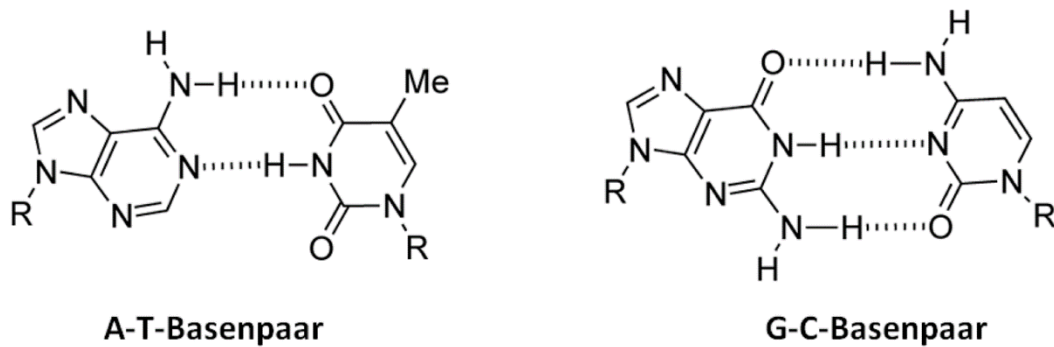


Abbildung 5: Watson-Crick-Basenpaarungen.

Unter physiologischen Bedingungen neigen die Nukleinbasen einer DNA-Helix zur Ausbildung von innenliegend, parallel angeordneten Stapeln (Abbildung 4, rechts). Diese sogenannten Basenstapelungen (engl. base stacking) werden durch hydrophobe Wechselwirkungen und Van-der-Waals-Kräfte zwischen übereinanderliegenden Basenpaaren beeinflusst ^[21].

Einige Atome der Nukleinbasen, hauptsächlich an Stickstoff bzw. an Kohlenstoff gebundene Wasserstoffatome, können in ihrer unmittelbaren Nähe eine partiell positive Ladung erzeugen. An anderen Atomen wiederum, wie Sauerstoff- oder Stickstoffatomen, kann eine partiell negative Ladung induziert werden (Abbildung 6). Infolgedessen entstehen anziehende Van-der-Waals-Kräfte zwischen den Ober- und Unterseiten vertikal benachbarter aromatischer Nukleinbasen. Wie man Abbildung 6 entnehmen kann, weist Cytosin eine dichte Ansammlung positiver Ladungen auf, während im Guanin eine konzentrierte lokale negative Ladung auftritt. Diese stark konzentrierten Ladungen der übereinander gestapelten Doppelpaare GC/GC führen zu den stärksten auftretenden

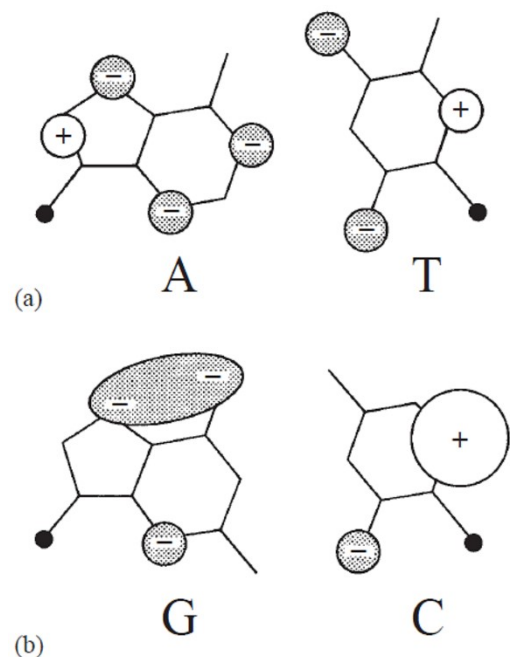


Abbildung 6: Bereiche der Partialladungen von Nukleinbasen in den Watson-Crick-Basenpaarungen (übernommen mit Genehmigung von ^[22]).

Stapelkräften. Im Gegensatz zu Guanin und Cytosin, haben Adenin und Thymin statt stark konzentrierter, kleinere über das Molekül verstreute Ladungen und weisen daher schwächere Stapelkräfte auf. Die Sequenzabhängigkeit der Stapelwechselwirkungen trägt wahrscheinlich dazu bei, dass GC-reiche DNA-Abschnitte thermodynamisch stabiler als AT-reiche Sequenzen sind [22]. Darüber hinaus tragen die beschriebenen Stapelwechselwirkungen möglicherweise den größten Beitrag zur Stabilisierung der Doppelhelix bei [23].

3.1.2 Denaturierung und Renaturierung von DNA

Wasserstoffbrückenbindungen gehören zu den schwachen chemischen Bindungen, die mit geringem Energieaufwand gelöst werden können. Dies stellt eine Voraussetzung für die wichtigen Funktionen der DNA, wie Replikation und Transkription dar [24]. Unter physiologischen Bedingungen ist dsDNA jedoch ein sehr stabiles Molekül [18]. Erst durch Erhitzen der dsDNA deutlich über die physiologische Temperatur bzw. durch Erhöhen des pH-Wertes beträchtlich über 7 lösen sich die Wasserstoffbrücken, was im Resultat zur Trennung (Dissoziation) des Doppelstrangs in zwei Einzelstränge führt. Dieser Vorgang wird als Denaturierung, Schmelzen oder Dehybridisierung bezeichnet.

Beobachten lässt sich der Schmelzvorgang u. a. durch die Aufzeichnung einer temperaturabhängigen Absorptionsänderung bei 260 nm mittels UV-Spektroskopie. Bei dieser Wellenlänge wird das UV-Licht durch die π -Elektronensysteme der Basen absorbiert. Während der Temperaturerhöhung kommt es zu einer Zunahme der UV-Absorption, da die Einzelstränge mehr UV-Licht als der Doppelstrang absorbieren. Die Ursache dafür liegt in der Basenstapelung innerhalb der dsDNA, die in einer geringeren Übergangswahrscheinlichkeit der π -Elektronen in den angeregten Zustand resultiert. Die Zunahme der Absorption ist daher ein Maß für den Anteil an ssDNA. Trägt man die Änderung der UV-Absorption einer DNA-Lösung in Abhängigkeit von der Temperatur in ein Diagramm ein, ergibt sich eine Schmelzkurve, an deren Wendepunkt die Schmelztemperatur (T_m) abgelesen werden kann (Abbildung 7).

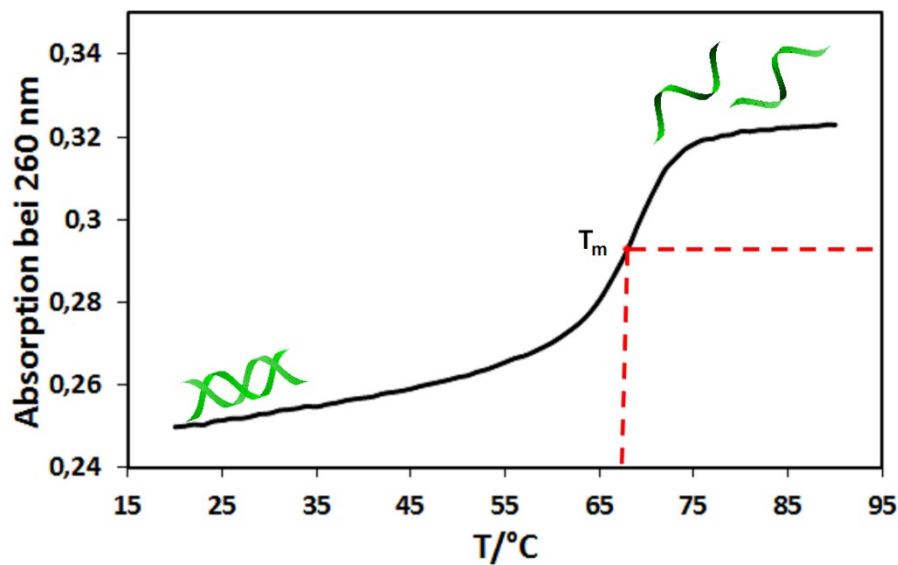


Abbildung 7: Beispiel einer spektroskopisch ermittelten Schmelzkurve.

Die T_m ist als die Temperatur definiert, bei der 50 % der DNA-Moleküle einzelsträngig vorliegen. Sie ist charakteristisch für eine bestimmte DNA-Sequenz und liefert Aussagen über ihre Stabilität [21]. Die Schmelztemperatur ist dabei abhängig von:

- der Basenzusammensetzung bzw. dem Anteil an G-C-Basenpaaren. Aufgrund der energetisch günstigeren Stapelwechselwirkungen zwischen aufeinanderfolgenden G-C-Paarungen sowie der größeren Anzahl von Wasserstoffbrücken, im Vergleich mit A-T-Basenpaaren, wird mehr Energie benötigt um G-C-reiche Doppelstränge zu trennen. Deswegen tragen G-C-Basenpaare zur stärkeren Stabilisierung und höheren Schmelztemperatur der DNA-Doppelhelix bei (Abbildung 8).
- der Salzkonzentration in der DNA-Lösung. Die negativen Ladungen der Phosphorylgruppen des Helixrückgrats, die nahe beieinanderliegen, erzeugen gegenseitige Abstoßungskräfte. Dadurch wird eine Trennung der Stränge begünstigt. Bei hohen Salzkonzentrationen bewirken die in Lösung vorhandenen Kationen eine Abschirmung der negativen Rückgratladung. Dies führt zur Stabilisierung der Doppelhelix und zur Erhöhung des T_m -Wertes (Abbildung 8).
- dem pH Wert. Durch Erhöhung des pH-Wertes auf über 10 kommt es wegen der Deprotonierung der Nukleinbasen zu einer Auflösung der Wasserstoffbrückenbindungen [25].

- der Anzahl, Art und Lage der Fehlpaarungen. Ein DNA-Duplex, das in seiner Struktur Fehlpaarungen beinhaltet, ist im Vergleich mit einem völlig komplementären weniger stabil, was zur Senkung der T_m führt [13].
- der Länge der DNA-Sequenz. Die Stabilität der Doppelhelix und dadurch auch die T_m nehmen im Allgemeinen mit zunehmender Länge des DNA-Stranges zu. Dies wird u. a. durch die steigende Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungen verursacht.

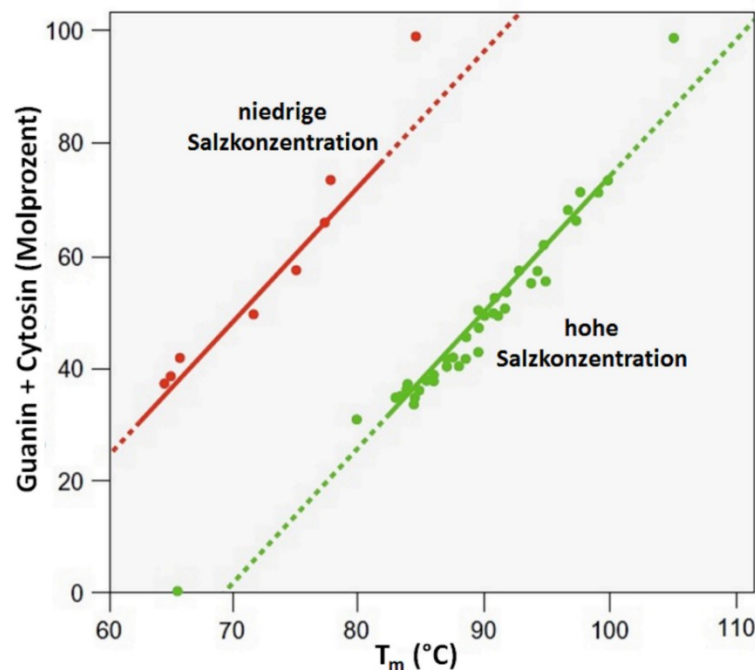


Abbildung 8: Abhängigkeit der Schmelztemperatur (T_m) von dem GC-Gehalt und der Salzkonzentration der DNA-Lösung (übernommen mit Genehmigung von [18]).

Neben der konventionellen Methode der UV-Spektroskopie können zur Aufzeichnung von DNA-Schmelzkurven auch elektrochemische Methoden eingesetzt werden. Die Denaturierung der Desoxyribonukleinsäure wird dabei mit Hilfe einer auf der Elektrodenoberfläche immobilisierten DNA-Sonde detektiert. Die Sonde formt mit einem sogenannten Targetstrang ein Duplex. Wenn das immobilisierte Duplex mit steigender Temperatur schmilzt, ändert sich die gemessene Signalstärke. Je nach Hybridisierungsassay-Design wird entweder die Sonde [15] oder das Target [14] mit einem elektroaktiven Marker, wie Osmiumtetroxidbipyridin ($[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$) oder Methylenblau (MB), markiert. Das Schmelzen von DNA kann auch ohne jegliche Markierung, aber in Anwesenheit von MB als

elektroaktivem Indikator, detektiert werden [26]. Wenn direkt geheizte Elektroden zum Einsatz kommen, können die Erhöhung der Temperatur sowie die elektrochemische Messung gleichzeitig erfolgen [13]. Eine simultane Temperaturänderung und Aufzeichnung der elektrochemischen Schmelzkurven ermöglichen auch die von Shen et al. [14] vorgeschlagene Mikroplattform mit einer eingebauten Pt-Heizung und eine Echtzeit-Schmelzkurvenanalyse mithilfe eines geheizten mikrofluidischen Systems von Yang et al. [15]. Die elektrochemischen Schmelzkurven erhält man durch das Auftragen der gemessenen Signalhöhen gegen die Temperatur.

Das Schmelzen ist ein reversibler Vorgang. Das heißt, wenn die Temperatur langsam gesenkt wird, kommt es zur vollständigen Rückbildung des DNA-Doppelstrangs. Diesen Prozess bezeichnet man als Renaturierung bzw. Reassoziaton [27].

3.2 DNA-Fehlpaarungen

Fehlpaarungen entstehen u. a. durch Fehler bei der DNA-Replikation oder durch Mutagene, das heißt schädigende Wirkungen von chemischen Verbindungen oder Strahlung. Eine häufige Ursache für Replikationsfehler ist das Auftreten von tautomeren Formen der Nukleinbasen (siehe Abschnitt 3.1.1). Obwohl das Gleichgewicht sehr stark in Richtung der Keto- und Amino-Formen verschoben ist, sind die selteneren Enol- und Imino-Varianten jedoch gelegentlich existent. Dies ermöglicht die passende Positionierung unkorrekter Basenpaare während der Replikation. Der Grund dafür liegt darin, dass die seltene Enol-Form von Thymin eher mit Guanin als mit Adenin ein Basenpaar bildet. Im Falle des Imino-Cytosins wird Adenin anstelle von Guanin gebunden. Wechselt Adenin von der Amino- in die Imino-Form so wird Cytosin statt Thymin gebunden, während Enol-Guanin bevorzugt mit Thymin anstatt mit Cytosin eine Basenpaarung eingeht ^[28] (Abbildung 9).

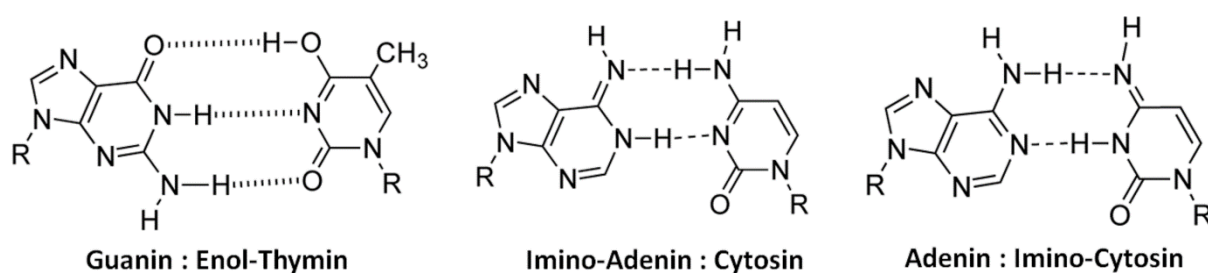


Abbildung 9: Beispiele von Fehlpaarungen, die infolge der Tautomerie entstehen.

Die Ausbildung von Fehlpaarungen zwischen den überwiegend auftretenden Tautomeren ist ebenfalls möglich. So kann Thymin ein sehr stabiles Wobble-Basenpaar mit Guanin bilden. Das G-T-Wobble-Basenpaar hat eine Struktur, die Francis Crick vorgeschlagen hat, um die G-U-Fehlpaarung am 5'-Ende des Anticodons mit Basen am 3'-Ende eines Codons während der tRNA:mRNA Wechselwirkung zu erklären ^[29]. Die Struktur einer Adenin-Cytosin-Fehlpaarung ist der G-T-Struktur ähnlich, wobei die Entstehung der Wasserstoffbrückenbindungen durch Protonierung des Adenins eingeleitet wird ^[30] (Abbildung 10).

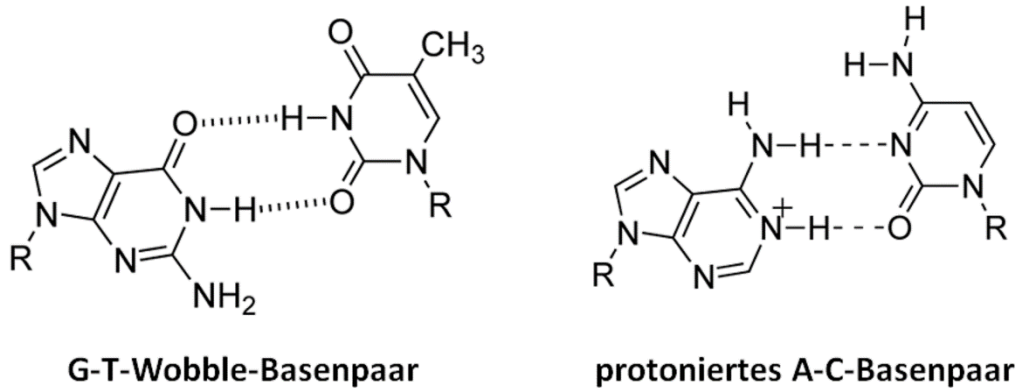


Abbildung 10: Beispiele von Fehlpaarungen.

Die Entstehung einer Fehlpaarung während der Replikation ist die Ursache für sogenannte Punktmutationen. Dabei wird das falsch eingebaute Nukleotid Bestandteil des Matrizenstrangs der nachfolgenden Replikationsrunde. Das heißt, in einem neu synthetisierten Strang wird sein komplementäres Nukleotid eingebaut. Im Doppelstrang der Tochter-DNA wird also an der Stelle keine Fehlpaarung mehr vorhanden sein, sondern eine dauerhafte Veränderung – eine DNA-Mutation.

Punktmutationen können in zwei Formen auftreten: der Transition sowie der Transversion. Bei der Transition kommt es zu einer Substitution von einer Purin- gegen eine andere Purinbase bzw. einer Pyrimidin- gegen eine andere Pyrimidinbase. Bei der Transversion wird eine Purinbase gegen eine Pyrimidinbase ausgetauscht oder umgekehrt [31]. Die Transversion-Mutation wird durch Purin-Purin- (A-A, G-G und A-G) und Pyrimidin-Pyrimidin- (C-C, T-T und C-T) Fehlpaarungen verursacht, während die Purin-Pyrimidin-Fehlpaarungen (A-C und G-T) zu Transition-Mutationen führen [32]. Insgesamt ergeben sich acht mögliche Fehlpaarungen im DNA-Duplex [33].

Obwohl einerseits viele Krankheiten im Einbau von Fehlpaarungen in die dsDNA ihren Ursprung haben, ermöglicht die Entstehung der Fehlpaarungen andererseits die genetischen Variationen, welche die Grundlage für die Evolution bilden.

3.2.1 Einfluss von Fehlpaarungen auf die DNA-Stabilität

Fehlpaarungen sind thermodynamisch instabiler als die komplementären Basenpaare, da sie nicht in der Lage sind, die typischen Watson-Crick-Bindungen und die stabilen Basenstapelungen innerhalb der DNA-Helix zu bilden.

Das Ausmaß der thermodynamischen bzw. strukturellen Destabilisierung der DNA durch eine Fehlpaarung ist abhängig von:

- der Art der inkompatiblen Basen: Folgende Stabilitätsreihe der Fehlpaarungen wurde von Aboul-ela et al. berichtet: $G-T > G-G > G-A > C-T > A-A = T-T > A-C = C-C$. Dabei treten einige Abweichungen von der Reihenfolge auf, welche mit der die Fehlpaarung umgebenden Sequenzabfolge verbunden sind [34]. Dennoch ist das G-T-Wobble-Paar die thermodynamisch stabilste von allen Fehlpaarungen. Der Grund dafür ist, dass zwischen Guanin und Thymin zwei Wasserstoffbrücken ausgebildet werden; sie damit eine ähnliche Struktur wie die G-C- und A-T-Watson-Crick-Paare aufweisen.
- Stapelwechselwirkungen mit direkt benachbarten Basenpaaren [35]: Die Stabilität der Fehlpaarungen ist sequenzabhängig. Die Fehlpaarungen, die einem G-C-Basenpaar direkt benachbart sind, weisen eine größere Stabilität auf als solche, die in A-T Nachbarschaft liegen.
- der Position einer Fehlpaarung innerhalb der DNA-Doppelhelix: Fehlpaarungen, die zentral in einer DNA-Sequenz liegen, erhöhen die dsDNA-Denaturierungsgeschwindigkeit und destabilisieren das Duplex erheblich mehr als Fehlpaarungen, die sich nahe an einem Ende der DNA-Sequenz befinden. Darüber hinaus verbessert die minimale Anzahl von sieben komplementären Basenpaaren in einer Reihe die Stabilität der dsDNA beträchtlich im Vergleich zu nur sechs oder weniger komplementären Basen, die einer Basenfehlpaarung benachbart sind [36].
- der Anzahl aller im Duplex vorhandenen Basenfehlpaarungen: Je mehr Fehlpaarungen innerhalb einer DNA-Sequenz, desto instabiler ist das DNA-Duplex.

3.2.2 Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP)

Einzelnukleotid-Polymorphismus (eng. single nucleotide polymorphism – SNP) ist eine genetische Variation, die durch Punktmutationen entsteht und 90 % aller Polymorphismen im menschlichen Genom darstellt [37]. SNPs sind als Einzelbasenpaar-Unterschiede an bestimmten Positionen der DNA definiert, wobei die seltenste Variante in zumindest 1 % der menschlichen Population vertreten sein muss, um als SNP eingestuft werden zu können. Die verschiedenen Sequenzvarianten, die sich am gleichen Genort befinden, werden als Allele bezeichnet. Grundsätzlich kann ein SNP di-, tri- oder tetraallelisch auftreten. Im menschlichen Genom sind die tri- und tetraallelischen Varianten jedoch extrem selten. Daher wird ein SNP vorwiegend als ein biallelischer Marker betrachtet [38].

SNPs sind über das ganze menschliche Genom verteilt. Die in kodierenden DNA-Abschnitten auftretenden Einzelnukleotid-Polymorphismen (cSNPs) können eine Veränderung oder Inaktivierung eines Genproduktes hervorrufen. Die meisten SNPs liegen jedoch in nicht kodierenden Bereichen. Sie können mit Hilfe genomweiter Assoziationsstudien (GWAS) Aufschluss über genetische Grundlagen von Erkrankungen geben und somit als Marker eingesetzt werden. Anhand der SNP-Marker sind sowohl Prognosen bestimmter Krankheitsprädispositionen als auch Voraussagen über personalisierte Wirksamkeiten von Arzneimitteln denkbar [39]. Darüber hinaus sind SNPs vielversprechende genetische Werkzeuge für die forensische Analyse von besonders stark degradierten DNA-Proben [40, 41]. Im Vergleich zu Short Tandem Repeat-Systemen, bei denen längere Sequenzbereiche (100 - 400 bp) für die Analyse unerlässlich sind, können für die Untersuchung von SNPs kurze Sequenzbereiche von nur 50 bp amplifiziert werden [42]. Des Weiteren finden SNPs eine Verwendung bei der Humanidentifizierung [43] sowie in der Ahnenforschung [44, 45].

3.3 Elektrochemische DNA-Sensoren

Elektrochemische DNA-Sensoren basieren auf dem Hybridisierungskonzept. Hierzu werden einzelsträngige DNA-Fängersonden auf der Sensoroberfläche immobilisiert. Durch den Kontakt mit der komplementären Targetsequenz erfolgt die Hybridisierung, welche dann mittels eines elektrochemischen Signals detektiert wird. Als Sonde werden meistens künstliche Oligonukleotide verwendet. Die elektrochemische Detektion der Hybridisierungsvorgänge kann markierungsfrei erfolgen oder unter Verwendung von elektroaktiven DNA-Interkalatoren, die sich in den Doppelstrang einlagern (wie Daunomycin, Methylenblau, $[\text{Ir}(\text{bpy})(\text{phen})(\text{phi})]^{3+}$ ^[86]; von Groove-Bindern (z. B. $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]^{2+}$ ^[86]; von nicht kovalent gebundenen Redoxindikatoren, die sich elektrostatisch an die Phosphatgruppen der Nukleinsäuren binden (z. B. $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$ ^[46]; von kovalent gebundenen Redoxmarkern (wie Ferrocen, Methylenblau ^[47], Osmiumtetroxidkomplexen ^[48, 49]); von Enzymen ^[50, 51] sowie Metall-Nanopartikeln ^[52, 53].

Osmiumtetroxidkomplexe gehören zu den erwähnten kovalenten Redoxmarkern. $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ reagiert mit Pyrimidinbasen in einer einzelsträngigen DNA durch Addition an die Doppelbindung zwischen zwei Kohlenstoffatomen in den Pyrimidinringen (Abbildung 11) ^[54] und formt auf diese Weise einen markierten DNA-Strang, den man elektrochemisch detektieren kann. Dabei reagiert Thymin etwa 10-mal schneller als Cytosin ^[55]. Die so markierten DNA-Einzelstrangabschnitte können keine Doppelstränge mehr ausbilden. Durch den Einsatz von DNA-Schutzsträngen, die während der Markierungsreaktion eingesetzt werden, kann jedoch die Hybridisierungsfähigkeit der geschützten Erkennungssequenz des Targets mit der immobilisierten Sonde aufrechterhalten werden ^[10]. Ein Vorteil dieses Redoxmarkers besteht in der einfachen Durchführung der Markierung, die in jedem Labor eingesetzt werden kann ohne die Notwendigkeit des Erwerbs von kommerziell-modifizierter DNA. Darüber hinaus liefert der Osmiumtetroxid-Komplex-Marker höhere voltammetrische Signale als Ferrocen oder Methylenblau ^[56].

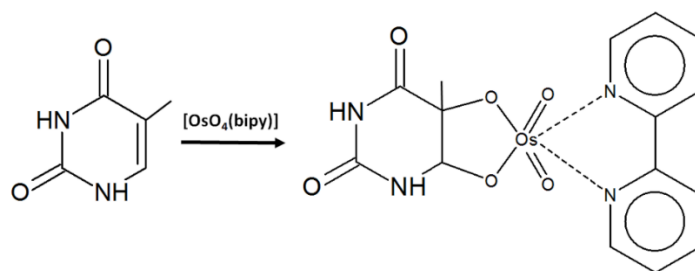


Abbildung 11: Markierung des Thymins mit [OsO₄(bipy)].

Eine sensitive Detektion der DNA-Hybridisierung ist wie angedeutet ebenfalls mit Hilfe eines Enzyms möglich. Dabei wird das betreffende Enzym mit Avidin oder Streptavidin modifiziert und mit einem biotinylierten Target gebunden. Das auf diese Weise gebundene Enzym katalysiert die Umwandlung eines in Lösung vorhandenen Substrats in eine redoxaktive Verbindung. Diese kann dann nach der Hybridisierung des Targets mit der immobilisierten Sonde detektiert werden [51].

Die oben genannte markierungsfreie Detektion basiert auf der Elektroaktivität der Purinbasen und erfolgt z. B. durch Oxidation des Guanins in einem DNA-Target. Dabei können die Guaninbasen in der Sonde durch Inosinbasen ersetzt werden, da letztere erst bei wesentlich höheren Potentialwerten im Vergleich zu Guaninbasen oxidiert werden. So kann der Oxidationsstrom erst nach erfolgreicher Hybridisierung gemessen werden [57].

Eine weitere Methode der markierungsfreien Detektion bietet die elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS). Dabei werden, in Anwesenheit von reversiblen Redoxpaaren in Lösung, die Durchtrittswiderstands- oder Kapazitätsänderungen an der Sensoroberfläche, vor und nach der Hybridisierung der Sonde mit dem DNA-Target, verfolgt [58, 59].

Die elektrochemischen Verfahren zur Detektion der DNA-Hybridisierung stellen eine gute Alternative für die aktuell am meisten verwendeten optischen Methoden, wie die fluoreszenzbasierten DNA-Microarrays, dar. Auf deren extrem kleinen Flächen wird eine große Anzahl verschiedener einzelsträngiger DNA-Sequenzen aufgebracht. Das zu untersuchende DNA-Target wird mit einem Fluorophor gekoppelt, das mit einem Laser angeregt wird. Die beim Auslesen detektierten Fluoreszenzsignale zeigen, dass an einer bestimmten Stelle auf dem Microarray eine Hybridisierung stattgefunden hat. Das Auslesen

der Daten und die dabei entstehenden Datenmengen erfordern jedoch einen hohen apparativen Aufwand und sind somit mit hohen Kosten verbunden. Bei elektrochemischen DNA-Sensoren dagegen wird der apparative Aufwand der Messung und der Auswertung reduziert, da ein elektronisches Signal direkt gemessen wird und daher keine kostspielige Signalübertragungsausrüstung notwendig ist. Zudem ermöglichen die elektrochemisch basierten Methoden die Miniaturisierung des Nachweisverfahrens und daher eine Point-of-Care-Diagnostik. Die optischen Methoden sind dagegen ausschließlich an spezialisierten Laboratorien durchführbar [60].

3.3.1 Immobilisierung der DNA-Sonden auf Goldelektroden

Die Immobilisierungsart der ssDNA-Sonde auf einer Sensoroberfläche ist ein sehr wichtiger Faktor in einem Biosensor-Design. Die Stabilität der immobilisierten Sonde und die Minimierung unspezifischer Adsorption stellen eine Voraussetzung für hohe Sensitivität und Selektivität des DNA-Sensors dar. Die Stabilität der Immobilisierungsbindung spielt eine besonders große Rolle, wenn ein Sensor für eine Schmelzkurvenanalyse, immobilisierte PCR oder Mutationsdetektion, in einem möglichst großen Temperaturbereich, eingesetzt wird [61]. Die vielen entwickelten Immobilisierungsmethoden basieren auf drei wichtigen Mechanismen: Adsorption, kovalente Bindung und Biotinylierung (Avidin/Streptavidin-Biotin-Bindung) (Abbildung 12) [62].

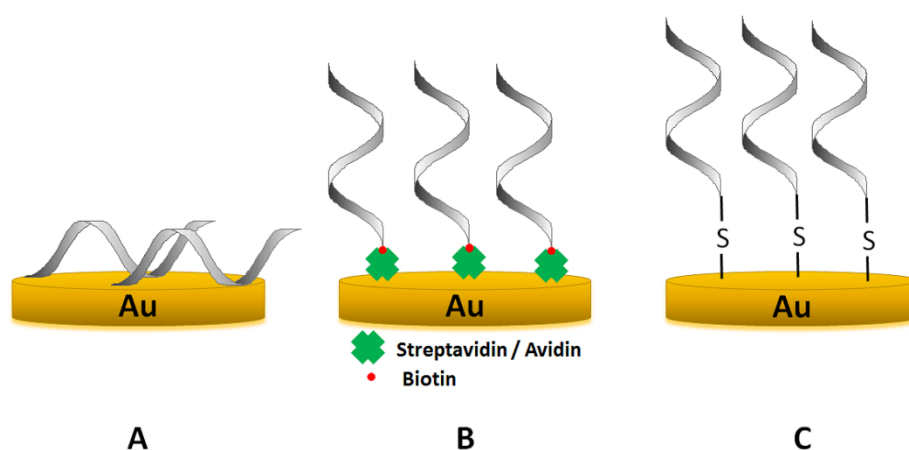


Abbildung 12: Schematische Darstellung der verschiedenen Immobilisierungsmethoden; A: Physisorption, B: Affinitätsbindung des biotinylierten Oligonukleotids auf der Avidin/Streptavidin-modifizierten Elektrode, C: kovalente Bindung der thiolmodifizierten Sonden auf der Goldoberfläche.

Die Physisorption von DNA auf Goldoberflächen ist die einfachste Methode der Sonden-Immobilisierung, da keine Modifizierung des DNA-Stranges erforderlich ist. Sie erfolgt durch Zusammenwirkung von unterschiedlichen non-kovalenten Kräften, wie elektrostatische Wechselwirkungen und spezifische Bindungen zwischen DNA-Basen und Gold. Die DNA-Gold-Wechselwirkungen sind stark sequenzabhängig. Guanin, Thymin und Cytosin binden durch Physisorption an die Goldoberfläche. Adenin hingegen besitzt aufgrund der exocyclischen Aminogruppe an 6-Position und des Ringstickstoffatoms an 7-Position eine außergewöhnlich starke Adsorptionsaffinität zu Gold, die der Bindungsstärke von Chemisorption entspricht [63]. Da die Adsorption jedoch durch experimentelle Bedingungen, wie pH-Wert und Salzkonzentration beeinflusst wird, besteht der schwerwiegende Nachteil der Methode in der Möglichkeit der DNA-Desorption unter stringenten Hybridisierungs- bzw. Dehybridisierungsbedingungen. Darüber hinaus kann die Mehrpunktbindung des auf der Goldoberfläche horizontal adsorbierten DNA-Strangs die spezifische Hybridisierung einer komplementären Targetsequenz verhindern und dadurch zu einer niedrigen Hybridisierungseffizienz führen [64]. Dieses Problem konnte jedoch von Opdahl et al. und Schreiner et al. durch Modifizierung der ssDNA mit poly-A- und poly-T-Sequenzen an einem Strangende behoben werden. Da Adenin eine besonders starke Affinität gegenüber Gold aufweist, adsorbiert der poly-A-Strang auf der Goldoberfläche und wirkt dabei wie ein Anker, wobei die poly-T-Sequenz eine Funktion eines vertikalen Spacers erfüllt. Das poly-T-Distanzstück hält die restliche Sondensequenz in einer aufrechten Position und ermöglicht dadurch eine effektive Hybridisierung des Targets [65, 66].

Die Avidin-Biotin-Bindung findet eine breite Anwendung im Bereich der DNA-Biosensoren. Avidin und Streptavidin sind tetramere Proteine, die bis zu vier Biotin-Moleküle binden können. Biotin dagegen ist ein kleines Vitamin-Molekül, das sehr hohe Affinität zu den Bindungsstellen des Avidins oder Streptavidins besitzt ($K_a = 10^{15} \text{ M}^{-1}$). Die Stärke der Bindung ist mit der Stärke einer kovalenten Bindung vergleichbar und wird somit durch extreme Temperaturen bzw. pH-Werte oder Denaturierungsmittel kaum beeinflusst [64]. Normalerweise wird als erstes das Avidin bzw. Streptavidin auf der Elektrodenoberfläche immobilisiert und das biotinylierte Oligonukleotid wird daraufhin an das immobilisierte Avidin gebunden. Avidin selbst kann an der Goldoberfläche entweder kovalent gebunden oder physikalisch adsorbiert werden [67].

Zu den am weitesten verbreiteten Methoden der Immobilisierung auf Goldoberflächen gehört jedoch die Ausbildung selbstorganisierender Monoschichten von Thiol- oder Disulfid-funktionalisierten ssDNA-Strängen. Die Thiolgruppe hat eine hohe Affinität zu Gold, was dazu führt, dass sich eine hochgeordnete Monoschicht von Thiolen spontan bildet, wenn eine Goldoberfläche in eine Thiollösung eingebracht wird. Dabei reagieren die SH-Gruppen mit der Goldoberfläche und formen eine starke kovalente Bindung nach folgender Reaktionsgleichung: $\text{ssDNA-S-H} + \text{Au} \rightarrow \text{ssDNA-S-Au} + \text{H}^+ + \text{e}^-$ [67].

Um eine besonders stabile Befestigung der Oligonukleotide an den Goldelektroden zu erhalten, wurden in der vorliegenden Arbeit drei Dithiol-Phosphoramidite (DTPA)-Einheiten am 3'-Ende der DNA-Sonde als Thiolinker verwendet (Abbildung 13). Jede Disulfid-Bindung der DTPA-Einheit wird während der Immobilisierung aufgespalten. Dabei bildet jedes der beiden Schwefelatome jeweils eine Au-S-Bindung aus, was insgesamt in sechs Gold-Schwefel-Bindungen zur Immobilisierung eines Sondenmoleküls auf der Goldelektrode resultiert [68].

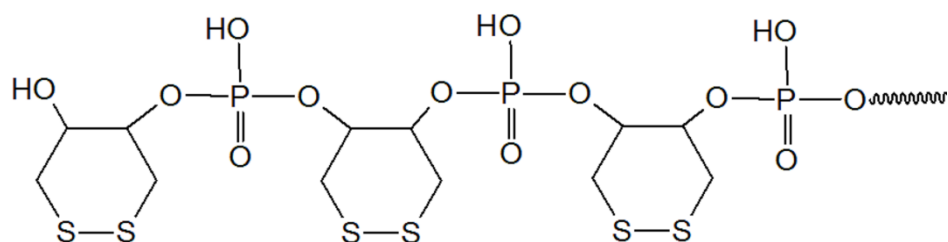


Abbildung 13: Drei Dithiol-Phosphoramidite (DTPA)-Einheiten.

Die Dichte der auf einer Elektrodenoberfläche immobilisierten DNA-Sonde hat einen beträchtlichen Einfluss auf die spätere Hybridisierungseffizienz. Der optimale Abstand zwischen den ssDNA-Strängen ist unerlässlich, um sterische Hinderung und abstoßende Wechselwirkungen zwischen den Sonden- und Targetsträngen während der Hybridisierung auf der Elektrodenoberfläche zu vermeiden [69]. Andererseits führen die unbedeckten Goldelektrodenoberflächen bei niedriger Sondendichte zu unspezifischen Wechselwirkungen zwischen dem Gold und der DNA. Durch Anwendung gemischter, selbstorganisierender Monoschichten von Thiol-funktionalisierter ssDNA und einfachen Alkanthiolen, wie 6-Mercapto-1-hexanol, lassen sich die unerwünschten Effekte verhindern.

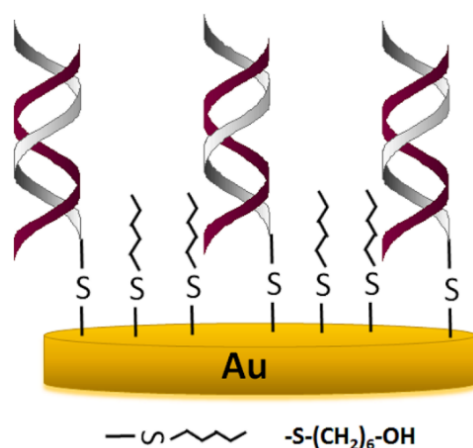


Abbildung 14: Gemischte, selbstorganisierende Monoschichten.

Herne und Tarlov haben für die Immobilisierung der gemischten Monoschichten eine Zwei-Schritt-Methode vorgeschlagen: als Erstes wird die Elektrode mit der thiolmodifizierten DNA inkubiert, danach erfolgt die Nachbelegung mit MCH [70]. Das sekundär aufgebrachte Thiol verdrängt die unspezifisch adsorbierten Sonden-Moleküle und die verbliebenden gebundenen Sondenstränge werden auf der Elektrode aufgerichtet, was zu einer verbesserten Hybridisierungseffizienz führt (Abbildung 14). Darüber hinaus füllt das MCH die Lücken in SONDENSCHICHT und verhindert dadurch die unspezifische Adsorption des Targets auf der Goldoberfläche während der Hybridisierung. Die optimale Sondendichte lässt sich dabei während der Immobilisierung durch das Variieren der Immobilisierungsdauer [71], der Konzentration der DNA-Sonde [72] oder des Salzgehaltes [70] in der auf die Elektrodenoberfläche aufgetragenen Pufferlösung kontrollieren. Die gemischten Monoschichten von thiolmodifizierter ssDNA und MCH können auch gleichzeitig immobilisiert werden. Die Einbeziehung von MCH während der Immobilisierung thiolmodifizierter DNA-Sonden verhindert die unspezifische DNA-Adsorption bereits während des Immobilisierungsprozesses, richtet die DNA auf der Elektrode auf und ermöglicht dadurch das Erreichen von größeren Sondendichten im Vergleich zu der Zwei-Schritt-Methode. Die Sondendichte kann dabei durch Anpassung des Verhältnisses der DNA-zur Gesamt-Thiol-Konzentration während der Koimmobilisierung [73] optimiert werden.

Die Stabilität sowie das Hybridisierungsverhalten der auf einer Festkörperoberfläche immobilisierten dsDNA unterscheiden sich deutlich vom Hybridisierungsverhalten und den Eigenschaften derselben dsDNA in der Lösung [74]. Die Hybridisierung auf der

Elektrodenoberfläche wird u. a. durch Wechselwirkungen mit anderen immobilisierten DNA-Strängen beeinflusst [75]. Die destabilisierenden Auswirkungen, die mit der DNA-Immobilisierung verbunden sind, wurden bisher nicht ausreichend erforscht. Es wurde jedoch neulich von Zhou et al. gezeigt, dass die Schmelztemperatur der auf einer Sensoroberfläche immobilisierten dsDNA um ca. 20 °C reduziert wird im Vergleich mit der Schmelztemperatur des gleichen, in einer Lösung frei diffundierenden, DNA-Duplex [76]. Zudem haben Presciotta et al. die Hybridisierungsstärke von Oligonukleotiden in einer Lösung und an Oberflächen mittels BSI (Back-Scattering Interferometry) direkt verglichen. Sie beschreiben, dass die Dissoziationskonstante (K_D) eines auf einer Oberfläche immobilisierten Duplex um ca. 50 % größer ist als die des in Lösung befindlichen ungebundenen Duplex [77].

3.3.2 Elektrochemische Detektion von Einzelbasenfehlpaarungen

Der elektrochemische Nachweis von SNPs erfolgt vorwiegend über die Detektion von Einzelbasenfehlpaarungen in doppelsträngiger DNA. Die Auswirkung einer einzelnen Basenfehlpaarung auf die Struktur und die Stabilität eines Doppelstranges ist jedoch relativ begrenzt und hängt von mehreren Faktoren ab (siehe Abschnitt 3.2.1). Daher ist der Einzelnukleotid-Polymorphismus, bezogen auf dessen Detektion, eine der anspruchsvollsten unter allen vorkommenden Mutationen. Es wurden zahlreiche Strategien zur elektrochemischen Detektion von Einzelbasenfehlpaarungen entwickelt. Bisher jedoch haben nur wenige davon eine kommerzielle Anwendung gefunden. Das große Hindernis ist diesbezüglich oft der Bedarf sorgfältiger und umfangreicher Optimierungen von Parametern des Massentransports und der Kinetik, die am Prozess der DNA-Hybridisierung beteiligt sind [78].

Man unterscheidet zwischen markierungsfreier Detektion mittels Impedanzspektroskopie, markierungsbasierter Detektion durch direkte DNA-Hybridisierung mit spezifischen Sonden, Detektion durch Ladungstransport sowie den Ansätzen, die auf der thermischen Denaturierung des DNA-Doppelstrangs beruhen.

Das typische Verfahren zur Detektion durch direkte DNA-Hybridisierung setzt einen immobilisierten linearen Einzelstrang ein, der mit einem redox- bzw. enzymmarkierten Target hybridisiert [50]. Die Hybridisierung resultiert in einem, zur Targetkonzentration

proportionalen, elektrochemischen Signal. Die SNP-Detektion durch die direkte Hybridisierung von zwei komplementären Einzelsträngen erweist sich jedoch oft als schwierig, da der destabilisierende Einfluss eines einzelnen Fehlpaars bei diesen Assays relativ klein ist. Um erfolgreich zu sein, müssen zahlreiche Parameter, wie Temperatur und Salzkonzentration, für jede Sequenz angepasst werden.

Ein anderes Hybridisierungsassay, das zur SNP-Detektion eingesetzt werden kann, ist das Sandwich-Assay (Abbildung 34). Hierzu werden eine immobilisierte lineare Sonde, ein redoxmarkierter Reporterstrang und ein unmarkiertes DNA-Target verwendet. Die immobilisierte Sonde hybridisiert spezifisch mit einem komplementären Sequenzteil des Targets und der markierte Reporter mit dem anderen Targetabschnitt [79]. Der Vorteil der Methode liegt darin, dass keine Modifizierung des Targets im Vorfeld der SNP-Detektion notwendig ist.

Ein Verfahren, das sich bzgl. der Detektion einzelner Basenfehlpaarungen als besonders sensitiv erwiesen hat und dabei keine Markierung des Targets verlangt, ist das der sogenannten Molecular Beacons. Ein klassisches Molecular Beacon ist eine haarnadelförmige einzelsträngige Oligonukleotidsonde, die aus einem selbstkomplementären Stamm und einer Schleife besteht. Die Schleife beinhaltet eine zum Target komplementäre DNA-Sequenz. Die Sonde wird mit einem Ende an der Elektrodenoberfläche immobilisiert und am zweiten Ende markiert. In Abwesenheit des Targets formt die markierte Sonde eine Haarnadelstruktur. In dieser Konformation befindet sich das redoxmarkierte Ende in der Nähe der Elektrodenoberfläche. Die Hybridisierung des Targets resultiert in einem „Aufklappen“ der Haarnadel. Dadurch wird das selbstkomplementäre Duplex aufgelöst. Das wiederum führt zur Vergrößerung der Entfernung zwischen dem elektroaktiven Molekül und der Elektrodenoberfläche. Dadurch wird eine Abnahme des Elektronentransfers und des elektrochemischen Signals hervorgerufen (Abbildung 15) [80]. Bei diesem Verfahren wird die Hybridisierung des Targets mit der Haarnadelstruktur der Sonde, wie beschrieben, nur durch den vorherigen Bruch der Wasserstoffbrücken des selbstkomplementären Stammes möglich. Dies ist thermodynamisch ungünstiger als die direkte Hybridisierung. In Anwesenheit eines fehlgepaarten Targets wird die thermodynamische Triebkraft gegenüber dem Prozess der Haarnadelstrukturöffnung zusätzlich vermindert. Dies trägt zur Verbesserung der Selektivität

der Methode im Vergleich zu linearen DNA-Sonden bei [81]. Der Nachteil der Methode liegt jedoch in dem unerwünschten ON/OFF-Modus des elektrochemischen Signals. Dieses nimmt nach erfolgreicher Hybridisierung ab, was zu falsch positiven Ergebnissen (z. B. durch Desorption der Sonde von der Elektrodenoberfläche) führen kann. Um das Problem zu lösen, wurde dieses Verfahren von Xiao et al. durch Eingliederung von drei komplementären Stämmen modifiziert. Damit war die Verwendung des mehr erwünschten OFF/ON-Modus möglich [82].

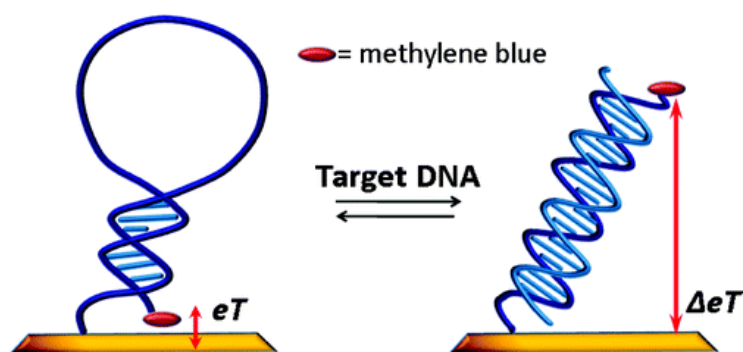


Abbildung 15: Schematische Darstellung eines elektrochemischen Molecular Beacons (übernommen mit Genehmigung von [83]).

Für die Detektion von Einzelbasenfehlpaarungen werden ebenfalls kompetitive Strangverdrängungsassays eingesetzt. Die Kinetik der Strangverdrängung kann dabei durch Anwendung des sogenannten Toeholds kontrolliert werden. Als Toehold wird ein komplementärer, einzelsträngiger Überhang bezeichnet, der den Strangverdrängungsprozess initiiert. Je nach Länge und Zusammensetzung des Toeholds kann die Geschwindigkeit der Strangverdrängung um den Faktor 10^6 variiert werden [84]. Dabei wird die Beschleunigung der Strangverdrängung durch GC-reiche Toeholds am effizientesten. Die Auswirkungen von Toeholds könnten sich besonders für die SNP-Differenzierung unter Verwendung von kompetitiven Assays zu Nutze machen. Eine Toehold-basierte SNP-Differenzierung wurde von Zhan et al. beschrieben [85].

Da die destabilisierenden Einflüsse von Einzelbasenfehlpaarungen zu einer Schmelztemperatursenkung führen, wird eine Schmelzkurvenanalyse häufig für die SNP-Detektion eingesetzt. So wurden zum Beispiel Schmelzkurven von Shen et al. aufgenommen, um ein komplementäres Duplex von einem einzelfehlgepaarten und einem mit zwei Fehlpaarungen

zu unterscheiden. Die Schmelzkurve wurde mittels SWV auf einer Mikroplattform mit integrierter Pt-Heizung aufgenommen [14]. Eine Echtzeit-Schmelzkurvenanalyse mithilfe der Wechselstrom-Voltammetrie in einem geheizten mikrofluidischen System wurde von Yang et al. durchgeführt. Dabei zeigten die temperaturabhängigen Änderungen des elektrochemischen Signals die Unterschiede in T_m des perfekt komplementären und des fehlgepaarten Targets. In beiden Studien wurde Methylenblau als elektroaktiver Marker eingesetzt [15].

Weiterhin beeinflussen die Einzelbasenfehlpaarungen die elektronische Struktur der Basenstapelungen in der dsDNA. Somit können die SNPs durch Verfolgung der Ladungsübertragung durch den DNA-Basenstapel unter Verwendung verschiedener redoxaktiver Interkalatoren detektiert werden. Der Elektronentransfer zwischen der Elektrode und den Interkalatoren ist in der perfekt komplementären DNA-Doppelhelix am effizientesten. In Anwesenheit von Fehlpaarungen nimmt der Elektronentransport ab, was durch das Absinken des elektrochemischen Signals widerspiegelt wird. Kelley et al. haben verschiedene Fehlpaarungen anhand des Ladungstransfers durch die auf der Elektrodenoberfläche immobilisierte DNA-Doppelhelix mittels zyklischer Voltammetrie untersucht. Die Methode erwies sich als sensitiv gegenüber der Anwesenheit von Einzelbasenfehlpaarungen sowie unabhängig von der Art der inkompatiblen Basen und der sie umgebenden Sequenz [86].

Eine völlig markierungsfreie Methode zur Detektion von Basenfehlpaarungen basiert auf dem Verfahren der elektrochemischen Impedanzspektroskopie. Kraatz et al. haben die auf einer Goldelektrode immobilisierte dsDNA-Monoschicht in einer Lösung von $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ vor (B-DNA) und nach der Zuführung von Zn^{2+} -Kationen (M-DNA) mittels EIS untersucht. In Anwesenheit einer Fehlpaarung im B-DNA-Duplex wurde eine deutliche Reduzierung des Durchtrittswiderstandes (R_{CT} - charge transfer resistance) im Vergleich mit der komplementären B-DNA festgestellt [87]. Zudem konnte eine gute Differenzierung zwischen einem komplementären Target, einem Target mit mittiger Fehlpaarung und einem Target mit endständiger Fehlpaarung durch Bestimmung von ΔR_{CT} zwischen B-DNA und M-DNA für das komplementäre und fehlgepaarte Duplex erreicht werden [88].

3.4 DNA-Analyse bei erhöhten Temperaturen

Bei der sequenzspezifischen DNA-Analyse spielt die optimale Temperatur eine sehr wichtige Rolle. Viele gegenwärtig routinemäßig eingesetzte Methoden zur Analyse der Desoxyribonukleinsäure basieren auf der Temperaturabhängigkeit der dsDNA-Denaturierung und Bildung eines Doppelstrangs aus zwei komplementären Einzelsträngen. Am Anfang des diagnostischen bzw. forensischen Analyseprozesses steht meistens ein Amplifikationsschritt der oft nur spurenweise vorhandenen DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR). Dabei werden alle drei Schritte: Denaturierung (bei ca. 95 °C), Primer-Anlagerung (annealing, zwischen 50 °C und 72 °C) und Verlängerung (elongation, bei ca. 72 °C), jedes PCR-Zyklus, durch entsprechende Temperaturen präzise gesteuert [89]. Die so genannte asymmetrische PCR ermöglicht zudem die Gewinnung der einzelsträngigen DNA, die ohne zusätzliche Vorbehandlung direkt zur Detektion mit Sonden verwendet werden kann [90]. In der Real-Time-PCR erfolgen die Vervielfältigung und die Detektion von DNA durch den Einsatz fluoreszenzmarkierter Primersonden gleichzeitig.

Sowohl bei der klassischen Sequenzierung nach Sanger (einer PCR-basierten Kettenabbruchmethode zur Bestimmung der Abfolge von Nukleotidbasen in DNA-Fragmenten) als auch bei den nach der Sanger-Methode entwickelten Sequenzierungsverfahren der zweiten Generation ist die Anwendung erhöhter Temperaturen unabdingbar. Beim Southern-Blotting erfolgt der Hybridisierungsschritt ebenfalls bei erhöhter Temperatur, um eine verbesserte Hybridisierungseffizienz zu gewährleisten. Das Southern-Blotting dient dabei zum direkten Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen, wie Deletionen oder Insertionen, in einem komplexen DNA-Gemisch, wie dem Genom.

Die sequenzspezifische Detektion von Hybridisierungsreaktionen an immobilisierten Sonden ist ebenfalls stark temperaturabhängig. Bei erhöhten Temperaturen wird die unspezifische Adsorption sowie die unspezifische Hybridisierung reduziert und dadurch die spezifische Bindung begünstigt [91]. Dies führt zu einer verbesserten Selektivität der Hybridisierungssensoren. Besonders im Hinblick auf die Detektion von Basenfehlpaarungen durch thermische Diskriminierung spielt die Temperatur die entscheidende Rolle. Während der elektrochemischen Detektion der enzymmarkierten DNA-Targets führen die erhöhten

Temperaturen zusätzlich zur Verbesserung der Enzymaktivität und dadurch zur größeren voltammetrischen Signalen [51, 92].

Darüber hinaus beeinflusst die Temperatur die Reaktionskinetik. Die Geschwindigkeit der meisten chemischen Reaktionen steigt exponentiell mit der Temperatur an. Arrhenius beschreibt den Zusammenhang zwischen Geschwindigkeit und Temperatur mit folgender Gleichung [93]:

$$k = A \cdot e^{\frac{-E_a}{RT}},$$

worin k die Geschwindigkeitskonstante, E_a die Aktivierungsenergie, A der präexponentielle Faktor, R die Gaskonstante und T die Temperatur sind. Der präexponentielle Faktor entspricht dabei der Stoßfrequenz unter Berücksichtigung sterischer Hinderung.

Eine extreme Beschleunigung von Strangverdrängungsreaktionen mit großen Aktivierungsenergien wurde bei höheren Temperaturen beobachtet (siehe Kapitel 5) [94].

Weiterhin wurde von Wohlgamuth et al. eine Zunahme des Ladungstransfers durch dsDNA bei steigender Temperatur durch erhöhte SWV-Signale festgestellt. Der elektrochemische Ladungstransfer erfolgte durch die auf der Elektrodenoberfläche immobilisierte und mit Nilblau markierte DNA-Doppelhelix. Zudem wurde eine Verringerung des Abstandes zwischen Oxidations- und Reduktionspeak im zyklischen Voltammogramm beobachtet, was auf eine beschleunigte Kinetik der Redoxreaktion hindeutet [95].

Des Weiteren bewirkt ein Temperaturgradient eine Wanderung von Molekülen in flüssigen Medien. Dadurch kann DNA an bestimmten Stellen gezielt angereichert werden. Diese sogenannte Thermophorese wurde kürzlich von Yu und Chen erfolgreich zur DNA-Detektion eingesetzt [96]. Das Prinzip der Thermophorese wird genauer in Kapitel 3.4.2 erläutert.

3.4.1 Geheizte Elektroden

Häufig wird die elektrochemische DNA-Detektion nur bei Raumtemperatur durchgeführt, oder aber es wird die gesamte Lösung in einer elektrochemischen Zelle samt aller Elektroden aufwendig erhitzt. Neben dem Nachteil der langen Wartezeiten bis zur Einstellung der gewünschten Elektrodentemperatur können die längeren Heizzeiten zusätzlich eine ungewünschte Änderung der Lösungskonzentration durch Evaporation der Lösungskomponenten verursachen [97].

Eine gute Alternative stellen in diesem Zusammenhang geheizte Elektroden (z. B. dünne Drähte oder Schichten) dar, deren Nutzung die Temperaturkontrolle ausschließlich am Reaktionsort ermöglicht. Dabei werden nur die Elektrode sowie eine dünne Lösungsmittelschicht an der Elektrodenoberfläche geheizt. Auf diese Weise lässt sich die Elektrodentemperatur, unabhängig von der umgebenden Lösung und im Gegensatz zu isothermalen Messsystemen, extrem schnell variieren. Man unterscheidet zwischen direkt und indirekt geheizten Elektroden. Darüber hinaus können die Elektroden gepulst oder kontinuierlich geheizt werden. Das gepulste Heizen ermöglicht Messungen über dem Siedepunkt der entsprechenden Lösung [98]. Das kontinuierliche Heizen hingegen besitzt den Vorteil eines Mikrorühreffekts durch thermische Konvektion, der für einen starken Transport von Edukten an und Produkten von der Elektrode sorgt und somit mechanisches Rühren ersetzt [99].

Die direkt geheizte Elektrode ist, in ihrer symmetrischen Anordnung, gleichzeitig Teil zweier Stromkreise - eines Heizstromkreises und eines Messstromkreises (Abbildung 16). Dabei wird ein Wechselstrom zur Elektrodenheizung verwendet, der durch seine Nullphase am Ort der Gleichstrommessung, keinen störenden Einfluss auf letzteren hat. Auf diese Weise kann die Arbeitselektrode während der Messung mit Wechselspannung auf die gewünschte Temperatur geheizt, während Gleichströme im Mikroampere- bzw. Nanoamperebereich gemessen werden.

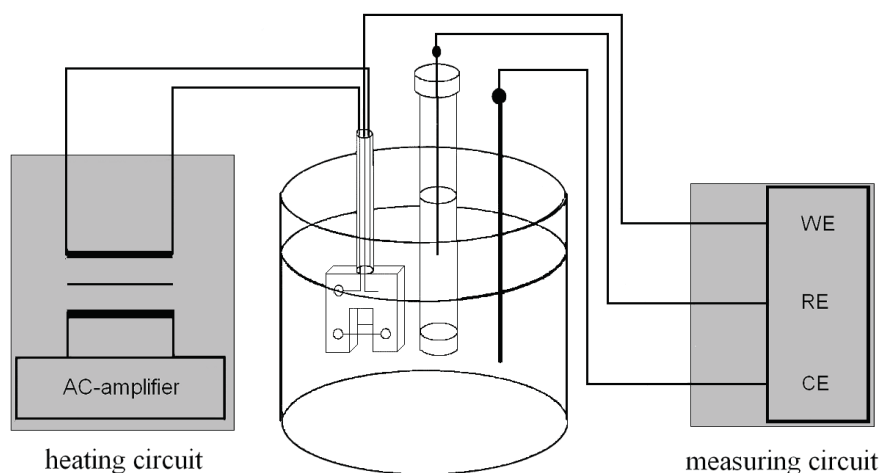


Abbildung 16: Direkte Wechselstromheizung einer symmetrisch angeordneten Drahtelektrode (entnommen aus [100]).

Die Temperatur geheizter Elektroden kann anhand der Temperaturabhängigkeit des Gleichgewichts eines Redoxpaares, z. B. der von Kaliumhexacyanoferrat-(II)/(III), $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$, bestimmt werden. Bei Temperaturänderung stellt sich das Gleichgewicht mit veränderten Konzentrationen der Redoxpartner neu ein. Das wiederum führt zur Änderung des Arbeitselektrodenpotentials. Durch eine stromlose Potentialdifferenzmessung zwischen der Arbeitselektrode und einer Referenzelektrode wird die Elektrodentemperatur in einer Lösung eines reversiblen Redoxpaares mit bekanntem Temperaturkoeffizient bestimmt.

Der Temperaturkoeffizient ist ein Maß dafür, wie stark sich das Potential an einer Arbeitselektrode im Vergleich zu einem identischen Bezugssystem, das auf einer konstanten Temperatur gehalten wird, bei Änderung der Temperatur um 1 K, ändert. Für eine äquimolare Lösung von $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$ in 0.1 M KCl beträgt der Temperaturkoeffizient 1.56 mV/K [101]. Die Potentialverschiebung ΔE kann dann mit Hilfe des Temperaturkoeffizienten β in eine Temperaturverschiebung ΔT ($\Delta E/\beta$) umgerechnet werden. Daraus lässt sich wiederum die Temperatur der Elektrode bestimmen:

$$T_{Elektrode} = T_{Lösung} + \frac{\Delta E}{\beta}$$

3.4.2 Thermodiffusion

Thermodiffusion beschreibt eine Bewegung von Molekülen entlang eines Temperaturgradienten. Der Effekt ist auch als Soret-Effekt oder Thermophorese bekannt [102]. DNA-Moleküle wandern entlang eines solchen Gradienten überwiegend in Richtung des kälteren Lösungsbereiches. Damit weisen sie einen positiven Soret-Effekt auf [103]. Je nach Temperatur sowie Art des umgebenden Mediums kann sich dieser Effekt auch umkehren, sodass sich die Moleküle an der wärmeren Seite der Lösung anreichern (negativer Soret-Effekt). Dies wurde in wissenschaftlichen Studien zur Thermophorese mit DNA-Molekülen und laserinduzierten Temperaturgradienten von Duhr und Braun [104] sowie Yu und Chen [96] präsentiert.

Das Ausmaß der Thermodiffusion und die damit verbundenen Konzentrationsunterschiede sowie die Richtung der Molekülmigration in Gegenwart eines Temperaturgradienten im stationären Zustand werden durch den Soret-Koeffizient beschrieben. Entsteht innerhalb einer Lösung eine ungleichmäßige Temperaturverteilung, so fangen die Moleküle an, sich entlang der gegebenen Temperaturgradienten zu bewegen. Aufgrund der temperaturinduzierten Konzentrationsunterschiede diffundieren die Moleküle daraufhin in Gegenrichtung. Im Gleichgewicht führen die beiden entgegengesetzten Prozesse zu einer stationären Molekülverteilung.

Der Soret-Koeffizient wird als Quotient definiert: $S_T = \frac{D_T}{D}$. Dabei ist D_T - der Koeffizient der Thermodiffusion und D - der Koeffizient der Diffusion, die infolge der aus der Thermodiffusion resultierenden Konzentrationsgradienten wirkt.

Obwohl die Thermodiffusion bereits im 19. Jahrhundert von Carl Ludwig und Charles Soret beschrieben wurde, sind die theoretischen Grundlagen des Effektes in einem flüssigen Medium bis heute umstritten und nicht vollständig verstanden. Die praktische Anwendung der Thermophorese in der Analyse von Biomolekülen ist jedoch vielversprechend. Vor kurzem wurde eine Thermodiffusion basierte Methode zur DNA-Detektion vorgestellt [96]. Darüber hinaus wurde die Thermophorese auch für die Analyse von DNA-Stabilität mittels einer Schmelzkurve eingesetzt [105].

4. Elektrochemisches Strangverdrängungsassay für die SNP-Detektion

4.1 Einleitung

Elektrochemische Messverfahren zum Nachweis von Einzelbasenvariationen werden in den letzten Jahren intensiv erforscht. Der Einsatz dieser Methoden bietet ein großes Potential zur Entwicklung von kostengünstigen, schnellen und sensitiven Biosensoren [60], die weitestgehend miniaturisiert werden können.

Für die SNP-Detektion wurde in der vorliegenden Arbeit ein elektrochemisches Hybridisierungsassay unter Verwendung von Schutzsträngen und [OsO₄(bipy)]-markierten Targets eingesetzt. Mit Hilfe des Schutzstrangverdrängungsassays wurden vier unterschiedliche DNA-Sequenzen untersucht. Für jede der Sequenzen gab es jeweils zwei Target-Varianten die sich in einer einzelnen Base voneinander unterscheiden. Diese Einzelbasenpaar-Varianten in den untersuchten Targetsequenzen entsprechen SNPs, die mit einigen Autoimmunerkrankungen, wie Multiple Sklerose, assoziiert sind. Die Unterscheidung der SNP-Varianten fand über die Detektion von Einzelbasenfehlpaarungen in den untersuchten DNA-Doppelsträngen statt (Tabelle 1).

Bezeichnung des Gens und der untersuchten Sequenz	SNP Allele	Art von SNP	Fehlpaarung im Sonde/Target-Duplex	Medizinische Auswirkung von SNP
PTPN22	rs2476601	A/G	A-C	assoziiert mit der rheumatoide und Juvenile idiopathische Arthritis [106]
CD58	rs2300747	A/G	A-C	Pathogenese der Multiple Sklerose (MS) [107]
HLA-DPB1	rs9277535	A/G	A-C	assoziiert mit MS [108]
IRF8	rs17445836	G/A	G-T	assoziiert mit MS [109]

Tabelle 1: Die vier untersuchten SNPs.

4.2 Experimentelles

4.2.1 Materialien

Die verwendeten DNA-Oligonukleotide wurden von biomers.net GmbH (Ulm, Deutschland) und Friz Biochem GmbH (Neuried, Deutschland) synthetisiert. Der Sondenstrang beinhaltet an seinem 3'-Ende zusätzlich 15 Thyminbasen als Spacer, um eine effiziente Hybridisierung an der Elektrodenoberfläche zu gewährleisten, sowie einen [DTPA]₃-Linker, um eine stabile Befestigung der Sonde auf der Goldelektrode zu ermöglichen. Die für die Target-Markierung verwendete Osmiumtetroxidlösung (4 % wt. in H₂O) und das 2,2'-Bipyridin stammten von der Firma Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Die Lösung von 10 mM TRIS-Puffer und 0.5 M Na₂SO₄ wurde mit Schwefelsäure auf einen pH-Wert von 7.5 eingestellt. Die Herstellung der Lösungen erfolgte mit Reinstwasser. Alle elektrochemischen Messungen wurden mittels einer Dreielektrodenanordnung durchgeführt. Dabei diente eine Ag/AgCl (3 M KCl)-Elektrode (Metrohm-Autolab) als Referenzelektrode und eine Glaskohlenstoffelektrode als Gegenelektrode. Eine modifizierte Goldscheibenelektrode (Durchmesser 2 mm, Metrohm) kam als Arbeitselektrode zum Einsatz. Für die voltammetrischen Messungen wurde ein Autolab PGSTAT 128N der Firma Metrohm-Autolab B.V. (Utrecht, Netherlands) benutzt.

Die genauen Sequenzen aller untersuchten Oligonukleotide, die Verteilung der Basenfehlpaarungen im Sonde/Target- und Schutzstrang/Target-Duplex sowie Ausrichtung der fünf zu markierenden Thyminbasen sind im Folgenden dargestellt:

PTPN22

Sonde PTPN22: 5'-CAGGTGTCCATACAGGAAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT[DTPA]₃-3'

Schutzstrang PTPN22: 5'-GAGCAGTCCATACAGGAACA-3'

Target PTPN22_FM_dist: 3'-tttttGTCCACAGGATATGCCTTCA-5'

Schutzstrang PTPN22: 5'-GAGCAGTCCATACAGGAACA-3'

Target PTPN22_MM_dist: 3'-tttttGTCCACAGGCATATGCCTTCA-5'

Schutzstrang PTPN22: 5'-GAGCAGTCCATACAGGAACA-3'

Target PTPN22_FM_prox: 3'-GTCCACAGGATATGCCTTCAttttt-5'

Schutzstrang PTPN22: 5'-GAGCAGTCCATACAGGAACA-3'

Target PTPN22_MM_prox: 3'-GTCCACAGGCATATGCCTTCAttttt-5'

CD58

Sonde CD58: 5'-TGCTGACCTATATTTCCCATTTTTTTTTTTTTTTT[DTPA]₃-3'

Schutzstrang CD58: 5'-AGGAGACCTATATTTCCGAA-3'
Target CD58_FM_dist: 3'-ttttACGACTGGATATAAAGGGTA-5'

Schutzstrang CD58: 5'-AGGAGACCTATATTTCCGAA-3'
Target CD58_MM_dist: 3'-ttttACGACTGGACATAAAGGGTA-5'

Schutzstrang CD58: 5'-AGGAGACCTATATTTCCGAA-3'
Target CD58_FM_prox: 3'-ACGACTGGATATAAAGGGTAtttt-5'

Schutzstrang CD58: 5'-AGGAGACCTATATTTCCGAA-3'
Target CD58_MM_prox: 3'-ACGACTGGACATAAAGGGTAtttt-5'

HLA-DPB1

Sonde HLA-DPB1: 5'-GATAGGACCCATATTCCCACTTTTTTTTTTTTTTT[DTPA]₃-3'

Schutzstrang HLA-DPB1: 5'-CAAAGGACCCATATTCGGAG-3'
Target HLA-DPB1_FM_dist: 3'-ttttCTATCCTGGGTATAAGGGTG-5'

Schutzstrang HLA-DPB1: 5'-CAAAGGACCCATATTCGGAG-3'
Target HLA-DPB1_MM_dist: 3'-ttttCTATCCTGGGCATAAGGGTG-5'

Schutzstrang HLA-DPB1: 5'-CAAAGGACCCATATTCGGAG-3'
Target HLA-DPB1_FM_prox: 3'-CTATCCTGGGTATAAGGGTGtttt-5'

Schutzstrang HLA-DPB1: 5'-CAAAGGACCCATATTCGGAG-3'
Target HLA-DPB1_MM_prox: 3'-CTATCCTGGGCATAAGGGTGtttt-5'

IRF8 uT

Sonde IRF8: 5'-ATCCCAGCTGCGGGCTCACCTTTTTTTTTTTTTTTT[DTPA]₃-3'

Schutzstrang IRF8_uT: 5'-AAGGCAGCTGCGGGCTCAGG-3'
Target IRF8_FM_dist: 3'-ttttTAGGGTCGACGCCGAGTGG-5'

Schutzstrang IRF8_uT: 5'-AAGGCAGCTGCGGGCTCAGG-3'
Target IRF8_MM_dist: 3'-ttttTAGGGTCGACGTCCGAGTGG-5'

Schutzstrang IRF8_uT: 5'-AAGGCAGCTGCGGGCTCAGG-3'
Target IRF8_FM_prox: 3'-TAGGGTCGACGCCGAGTGGtttt-5'

Schutzstrang IRF8_uT: 5'-AAGGCAGCTGCGGGCTCAGG-3'
Target IRF8_MM_prox: 3'-TAGGGTCGACGTCCGAGTGGtttt-5'

IRF8 pT

Schutzstrang IRF8_pT:	5'-AT <u>GGC</u> CAGCTGC <u>AGG</u> CTCAGG-3'
Target IRF8_FM_dist:	3'-ttttTAGGGTCGACG <u>CCC</u> GAGTGG-5'
Schutzstrang IRF8_pT:	5'-AT <u>GGC</u> CAGCTGCAGGCTCAGG-3'
Target IRF8_MM_dist:	3'-ttttTAGGGTCGACG <u>TCC</u> GAGTGG-5'
Schutzstrang IRF8_pT:	5'-AT <u>GGC</u> CAGCTGC <u>AGG</u> CTCAGG-3'
Target IRF8_FM_prox:	3'-TAGGGTCGACG <u>CCC</u> GAGTGGtttt-5'
Schutzstrang IRF8_pT:	5'-AT <u>GGC</u> CAGCTGCAGGCTCAGG-3'
Target IRF8_MM_prox:	3'-TAGGGTCGACG <u>TCC</u> GAGTGGtttt-5'

Die Position des SNP ist in den Target- und Sondensequenzen jeweils mit blauer Schrift gekennzeichnet. Fehlpaarungen im Schutzstrang, die eingeführt wurden, um die Schutzstrangverdrängung und anschließende Hybridisierung des Targets an die immobilisierte Sonde zu begünstigen, sind unterstrichen. Fehlpaarungen im Schutzstrang, die durch Anwesenheit von SNP in der Targetsequenz entstehen, sind unterstrichen und mit roter Schrift gekennzeichnet.

In der Sondensequenz wurde eine SNP-Variante verwendet. Für das Target dagegen gab es zwei SNP-Varianten, d. h. zwei Targetsequenzen, die sich in einer Base voneinander unterscheiden. Eine der beiden Target-Varianten ist dabei perfekt komplementär und die andere beinhaltet eine mittige Basenfehlpaarung gegenüber der Sonde. Die Abkürzungen „FM“ und „MM“ stehen, in der hier verwendeten Bezeichnung der Targetsequenzen, für ein komplementäres (full-matched: FM) und ein fehlgepaartes (mismatched: MM) Target gegenüber der Sonde.

Jede Targetsequenz wurde entweder am proximalen (5'-) oder am distalen (3'-) Ende, bezüglich der Elektrodenoberfläche, markiert. Die Bezeichnungen „prox“ und „dist“ deuten auf die Lage der fünf, mit [OsO₄(bipy)]-markierten, terminalen Thyminbasen hin, die sich entweder in direkter Nähe zur Elektrodenoberfläche (prox) oder aber in einer Entfernung von 20 bp (dist) befinden.

Die Targetsequenzen wurden im Vorfeld der Markierung mit partiell komplementären Schutzsträngen geschützt. Diese Schutzsequenzen verhindern die Modifizierung der Pyrimidinbasen in der Erkennungssequenz des Targets. Um die spätere

Schutzstrangverdrängung während des Hybridisierungsschrittes an der Elektrodenoberfläche zu erleichtern, beinhalten die Schutzstrangsequenzen den Targets gegenüber ein paar Fehlpaarungen. Der Schutzstrang ist für beide Target-Varianten gleich. Daher beinhaltet das MM-Target/Schutzstrang-Duplex eine zusätzliche, mittige Basenfehlpaarung im Vergleich zum FM-Target/Schutzstrang-Duplex.

Der fehlgepaarte IRF8-Targetstrang (IRF8_MM) beinhaltet in seiner Sequenz, im Gegensatz zu den anderen MM-Targetsequenzen (PTPN22, CD58 und HLA-DPB1), eine mittige Thyminbase als eine der beiden SNP-Varianten. Während der Markierung mit [OsO₄(bipy)] ist die Reaktion des ungeschützten Thymins, das sich innerhalb der Erkennungssequenz des Targets befindet, denkbar. Dies ermöglichte eine sekundäre Untersuchung von Effekten der Osmiumtetroxid-Markierung an Thymin, das sich mittig im Sequenzstrang befindet und während der Markierungsreaktion keine Watson-Crick-Basenpaarung ausbildet. Dafür wurden zwei unterschiedliche Schutzsequenzen für das IRF8-Target konstruiert. Der Schutzstrang IRF8_uT (uT – nach „ungepaartes Thymin“) kann aufgrund der Abwesenheit von Adenin keine Watson-Crick-Basenpaarung mit dem IRF8_MM-Target an der SNP-Stelle ausbilden. Die zweite Variante des Schutzstrangs schützt das mittige Thymin des MM-Targets mit dem entsprechenden Watson-Crick-Basenpaar, nämlich mit Adenin. Der Schutzstrang wird hier als IRF8_pT (pT - nach Watson-Crick „gepaartes Thymin“) bezeichnet.

Im Gegensatz zum IRF8_uT-Schutzstrang, beinhaltet die IRF8_pT-Schutzsequenz eine zusätzliche, mittige Basenfehlpaarung gegenüber der komplementären IRF8-Targetsequenz (IRF8_FM). Dies ergibt im Gegensatz zu allen anderen hier untersuchten Assays mehr Basenfehlpaarungen im FM-Target/Schutzstrang-Duplex als im MM-Target/Schutzstrang-Doppelstrang. Dies ermöglichte zusätzlich einen Vergleich zwischen den zwei möglichen Hybridisierungsassays.

4.2.2 Vorbereitung des Targets

Das DNA-Target wurde mit einem [OsO₄(bipy)]-Komplex modifiziert. Die Erkennungssequenz des Targets wurde während der Markierungsreaktion durch einen partiell komplementären Schutzstrang geschützt, damit nur die fünf ungeschützten Thyminbasen an einem Ende des Targetstranges markiert werden. Dafür wurden 100 µM Target- und 100 µM Schutzstrang-Lösung zusammengegeben, um die Zusammenlagerung der Einzelstränge zu ermöglichen.

Nach zwei Stunden bei Raumtemperatur wurde 10 mM [OsO₄(bipy)]-Lösung zugegeben, um die 5 Thyminbasen zu markieren. Nach weiteren zwei Stunden wurde der überschüssige Komplex durch Dialyse aus der Analysenlösung entfernt. Dies erfolgte in Dialysegefäßen Slide-A-Lyser MINI Dialysis Units der Firma Thermo Scientific (Rockford, USA) in 10 mM TRIS-Puffer/0.5 M Na₂SO₄-Lösung in zwei Schritten: zuerst für eine Stunde und dann nach Auffrischung des Puffers, über Nacht bei 4 °C. Im Anschluss wurde die Lösung von markiertem Target/Schutzstrang-Duplex auf eine Konzentration von 0.2 µM verdünnt und für die Hybridisierungsexperimente mit der immobilisierten Sonde verwendet.

4.2.3 Vorbereitung der modifizierten Elektrode

Vor jeder Immobilisierung der Sonde wurde die Goldscheibenelektrode zunächst mechanisch mit Aluminiumoxidpulver mit einer Korngröße von 0.3 µm (Buehler, Deutschland) und anschließend elektrochemisch mit Hilfe der zyklischen Voltammetrie (25 Scans, von -0.3 bis 1.7 V, Scan Rate 100 mV/s) in 0.5 M Schwefelsäure poliert. Als nächstes wurden 5 µl der 30 µM Sondenlösung in 10 mM TRIS-Puffer und 0.5 M Na₂SO₄ (pH 7.5) auf die vorbehandelte Elektrode als Tropfen aufgebracht und über Nacht in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre inkubiert. Währenddessen bilden sich die selbstorganisierenden Monoschichten der 3'-[DTPA]₃-modifizierten Sonden auf der Goldelektrodenoberfläche. Im Anschluss wurde die Elektrode eine Stunde in einer 1 mM Lösung von 6-Mercapto-1-hexanol inkubiert, um eine geordnete ssDNA-SAM Schicht auszubilden. Damit war die Elektrode für die anschließenden Hybridisierungsexperimente mit dem Target einsatzfähig.

4.2.4 Hybridisierungsschritt und elektrochemische Messungen

Das für die SNP-Detektion eingesetzte kompetitive Schutzstrangverdrängungsassay mit proximaler sowie distaler Markierung des Targets ist in Abbildung 17 schematisch dargestellt. Während des Hybridisierungsschrittes wurde die modifizierte Goldscheibenelektrode für 15 Minuten in die temperierte Lösung von markiertem Target/Schutzstrang-Duplex eingetaucht. Die Targetlösung wurde mit Hilfe eines mit Wasser temperierbaren doppelwandigen Glasgefäßes und eines Kälte-/Wärmethermostats (Kryostat) Anova, Model R10 (Houston, TX USA) thermostatiert. Dabei wurde die Lösung mit einem Magnetrührer gerührt. Währenddessen findet die thermodynamisch bevorzugte Hybridisierung des komplementären oder einzelfehlgepaarten Targets an die Sonde unter

Verdrängung des Schutzstrangs statt. Nach jeder Hybridisierung wurde die Elektrode mit TRIS-Puffer/ Na_2SO_4 -Lösung gespült, um die unspezifisch adsorbierte DNA zu verdrängen. Anschließend wurde die Elektrode in eine elektrochemische Zelle mit TRIS-Puffer/ Na_2SO_4 -Lösung eingetaucht. Hier erfolgte dann die SWV-Messung bei Raumtemperatur. Dafür wurden folgende Parameter eingestellt: Anfangspotential -0.55 V , Endpotential 0.1 V , Amplitude 40 mV und Frequenz 200 Hz . Nach der Messung wurde die Elektrode für 60 Sekunden in 50°C warmes Wasser getaucht, um das markierte Target von der immobilisierten Sonde zu trennen. Nach der Dehybridisierung und der darauffolgenden Messung des Blank-Signals wurde die Elektrode für weitere Hybridisierungen bei anderen Temperaturen und die anschließenden Messungen verwendet. Die peakförmigen voltammetrischen Signale wurden mittels der NOVA 2.0.1-Software (Metrohm-Autolab B.V.) nach Savitzky und Golay geglättet und Baseline korrigiert. Je drei separate Hybridisierungsserien wurden für jede Targetsequenz aufgenommen.

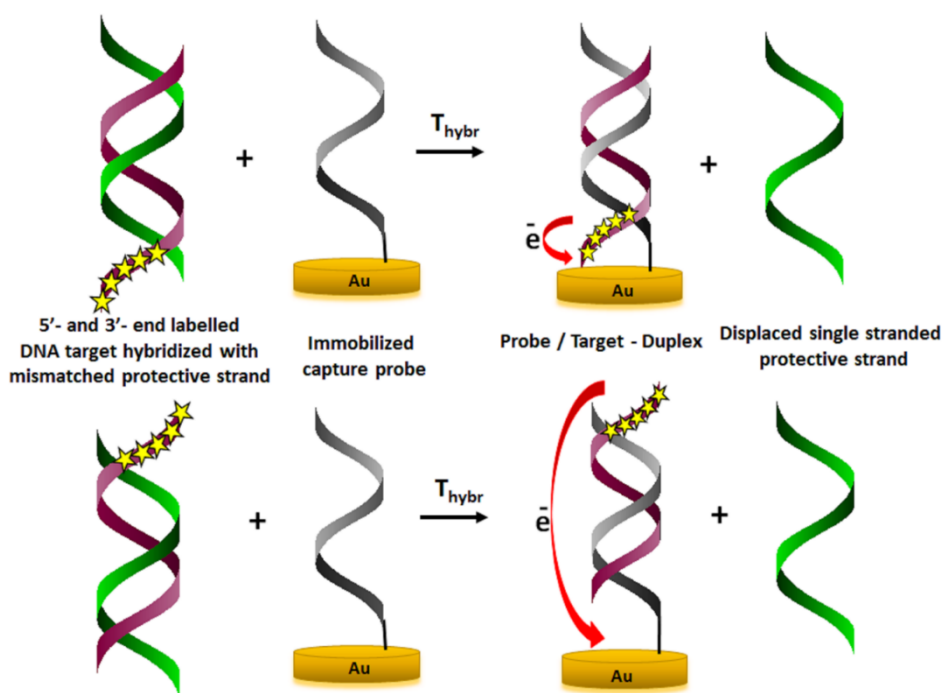


Abbildung 17: Das Schema einer Hybridisierung der $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ -markierten Targetsequenzen (an dem proximalen 5'- bzw. distalen 3'-Ende) mit der auf einer Elektrodenoberfläche immobilisierten DNA-Sonde unter Verdrängung des Schutzstrangs.

4.2.5 UV-VIS Spektroskopische Messungen

Alle spektroskopischen Messungen wurden mittels eines CARY 300 Scan UV-Visible Spektrophotometers (Agilent Technologies) bei einer Wellenlänge von 260 nm, einer spektralen Bandbreite von 1 nm, 2 s average time, einem Datenintervall von 1 °C und 1 °C/min rate time durchgeführt. Der Temperaturscan wurde von 20 °C bis 90 °C vor- und rückwärts durchgeführt. Die Messungen erfolgten mit 2 ml Lösung von 500 nM Sonde/Target- (ohne [DTPA]₃-Linker) oder Schutzstrang/Target-Duplex der CD58-Sequenz in 10 mM TRIS-Puffer/0.5 M Na₂SO₄. Die Schmelztemperatur wurde aus dem Peak-Maximum der ersten Ableitung der Schmelzkurve mit Hilfe der Cary WinUV Software (Thermal Application) berechnet.

4.3 Ergebnisse und Diskussion

Hybridisierung auf der Goldoberfläche: Square-Wave-Voltammetrie

4.3.1 Sequenzen mit einer A-C-Fehlpaarung im Sonde/Target-Duplex

In Abbildung 18 ist das thermische Hybridisierungsverhalten von drei Sequenzen: CD58, PTPN22 und HLA-DPB1, jeweils mit proximaler und distaler Markierung, dargestellt. Die Untersuchungen der Targetsequenzen mit proximaler Markierung ergaben einheitliche Ergebnisse für alle drei Sequenzen. Bei niedrigen Temperaturen von weniger als 35 °C weisen die fehlgepaarten Targets (MM) tendenziell größere Signale als die perfekt komplementären Sequenzen (FM) auf. Bei einer Hybridisierungstemperatur von über 45 °C tritt das Gegenteil ein. Die komplementären Targets liefern nämlich deutlich höhere SWV-Signale als die mit einer Fehlpaarung.

Die Experimente mit distal markierten Targets ergeben teilweise inkonsistente Ergebnisse. Das fehlgepaarte CD58-Target liefert bei allen untersuchten Hybridisierungstemperaturen höhere voltammetrische Signale als das komplementäre Target. Für das HLA-DPB1-Target tritt die entgegengesetzte Situation auf. Die PTPN22-Sequenz hingegen liefert höhere Signale für das FM-Target erst bei über 50 °C. Ein solches Verhalten kann teilweise anhand der Schmelztemperaturwerte der Doppelstränge innerhalb des Strangverdrängungsassays erklärt werden und wird an späterer Stelle in diesem Kapitel diskutiert.

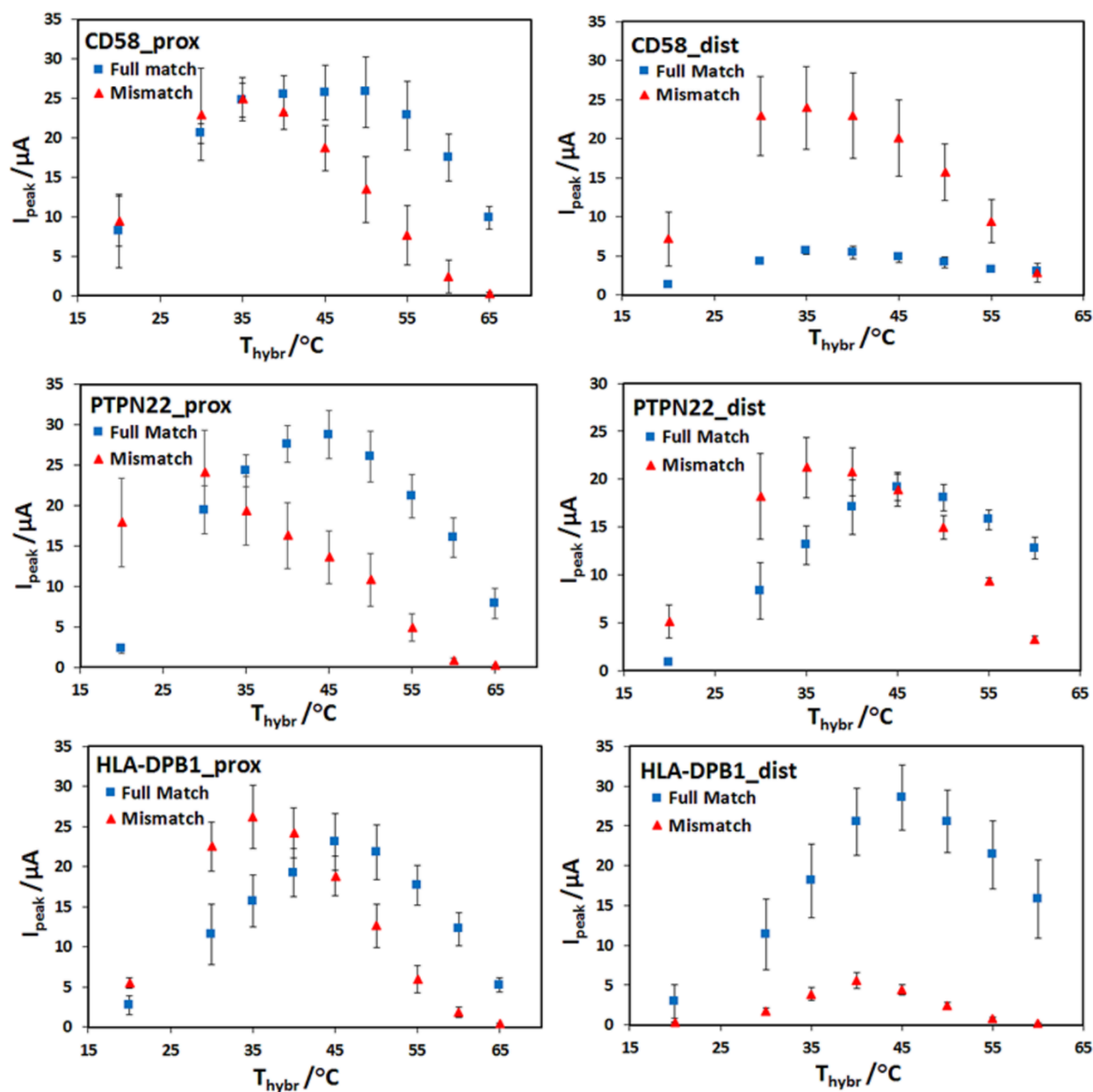


Abbildung 18: Einfluss der Hybridisierungstemperatur auf SWV-Signale nach 15 Minuten Hybridisierung auf einer Goldelektrode in 0.2 μM Lösung von komplementärem Target (Quadrate) und dem Target mit einer Fehlpaarung (Dreiecke). Die Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen der drei unabhängigen Messungen mit einer neu immobilisierten Sonde.

4.3.2 Sequenz mit einer G-T-Fehlpaarung im Sonde/Target-Duplex

Das gegenüber der Sonde einzelfehlgepaarte IRF8-Target (IRF8_MM_prox/dist) beinhaltet in seiner Sequenz ein mittiges Thymin, das während der Markierung mit [OsO₄(bipy)]-Komplex und unter Verwendung des IRF8_uT-Schutzstrangs nicht mit Adenin gepaart war. Stattdessen wurde möglicherweise eine G-T-Basenpaarung gebildet. Da es sich dabei um ein stabiles Wobble-Basenpaar handelt, wird das Thymin während der Markierung höchstwahrscheinlich trotzdem geschützt. Dafür spricht die Tatsache, dass keine signifikante Signalabnahme für die IRF8_MM-Sequenz (die mit dem IRF8_uT-Strang geschützt war) sowohl mit distaler als auch mit proximaler Markierung, im Vergleich mit Signalen anderer Sequenzen, zu beobachten ist (Abbildung 19). Es ist auch, im Vergleich zu der durch den IRF8_pT-Schutzstrang geschützten IRF8_MM-Targetsequenz, keine Verschiebung des Signalmaximums nach links (das mit der Schmelztemperatur korreliert) zu erkennen. Genaugenommen liefert das proximal markierte IRF8_MM-Target mit dem ungepaarten Thymin im Target/Schutzstrang-Duplex bei fast allen Temperaturen ein etwas höheres Signal als das komplementäre Target. Für das distal markierte IRF8_MM-Target wird ein höheres Signal bis 55 °C gemessen. Bei 65 °C tritt das Gegenteil ein.

Ein ganz anderes thermisches Hybridisierungsverhalten wurde beobachtet, wenn das mittige SNP-Thymin des fehlgepaarten IRF8-Targets (IRF8_MM) mit komplementärem Adenin (statt mit Guanin) im IRF8_pT-Schutzstrang gepaart war. Durch den Einsatz der IRF8_pT-Schutzsequenz (anstelle der IRF8_uT-Sequenz) entsteht eine zusätzliche mittig lokalisierte Adenin-Cytosin-Fehlpaarung im FM-Target/Schutzstrang-Duplex (Abbildung 20). Dies ergibt mehr Basenfehlpaarungen im Schutzstrang für das FM-Target als für das MM-Target. In diesem Fall liefert das komplementäre Target für beide Varianten der Markierung und bei fast allen untersuchten Temperaturen deutlich höhere Signale als das fehlgepaarte Target, was die eindeutige Differenzierung zwischen den beiden Targetsequenzen gewährleistet (Abbildung 19).

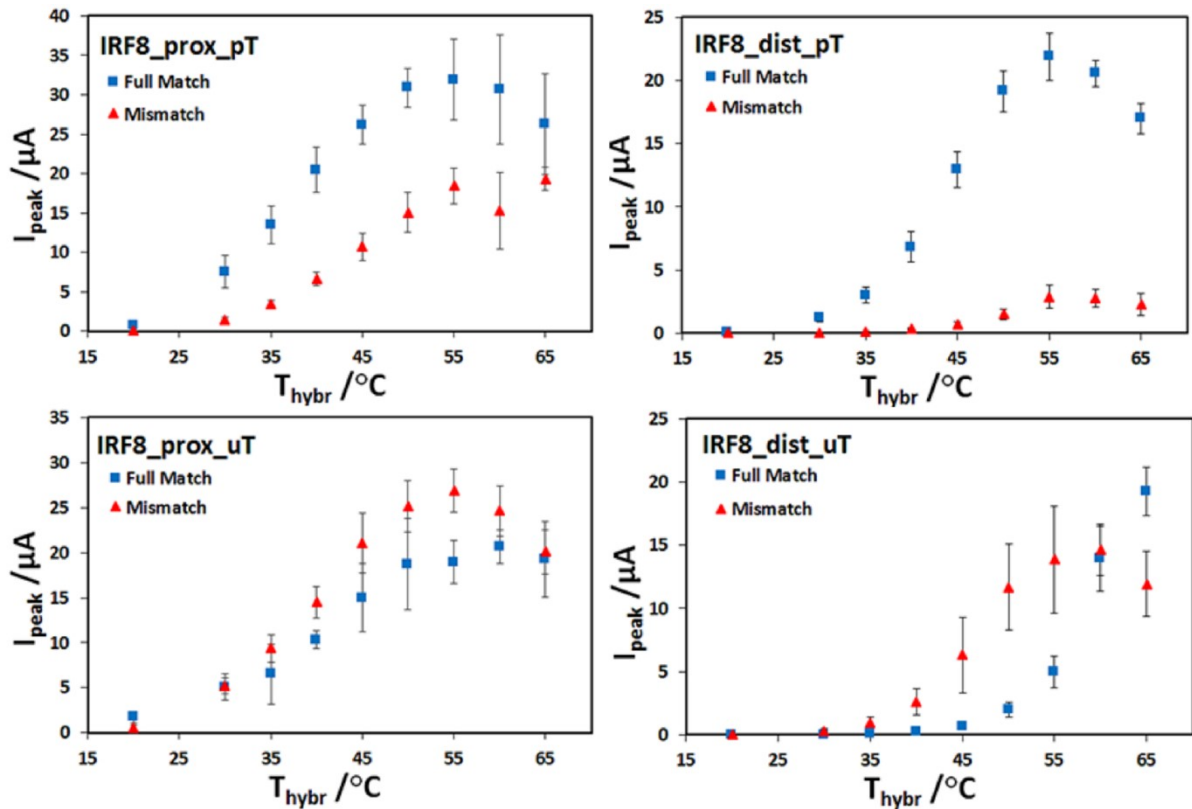


Abbildung 19: Einfluss der Hybridisierungstemperatur auf SWV-Signale des proximal bzw. distal markierten IRF8-Targets, das während der Markierung mit einem IRF8_pT- oder IRF8_uT-Schutzstrang geschützt wurde.

4.3.3 Effekte von Fehlpaarungen und die optimale Hybridisierungstemperatur für die SNP-Detektion bei proximaler Markierung des Targets

Die unterschiedliche Anzahl von Fehlpaarungen und deren Positionen im Schutzstrang/Target- und Sonde/Target-Duplex gehören zu den wichtigsten Einflussfaktoren auf das temperaturabhängige Hybridisierungsverhalten der proximal markierten Targetsequenzen.

Der Einsatz der gleichen Schutzstrangsequenz zur Markierung der beiden Target-Varianten (FM und MM) resultiert in einer höheren Anzahl von Fehlpaarungen im Schutzstrang gegenüber den MM-Targets. Die fehlgepaarten Zielsequenzen beinhalten sechs Basenfehlpaarungen im Target/Schutzstrang-Duplex während die FM-Varianten nur fünf (Abbildung 20 unten). Die Ausnahme stellt hier die IRF8_pT-Schutzsequenz dar, welche mehr Basenfehlpaarungen gegenüber dem FM-Target aufweist. In allen untersuchten Targetsträngen liegt die durch SNP eingeführte zusätzliche Basenfehlpaarung in der Mitte

der Sequenz. Abbildung 20 zeigt die Verteilung von Fehlpaarungen innerhalb des Schutzstrangverdrängungsassays für das IRF8-Target, das entweder mit dem IRF8_pT- oder mit dem IRF8_uT-Schutzstrang gepaart wurde. Die Anordnung der Fehlpaarungen in dem letzteren Assay ist analog für die PTPN22, CD58 und HLA-DPB1 Sequenzen.

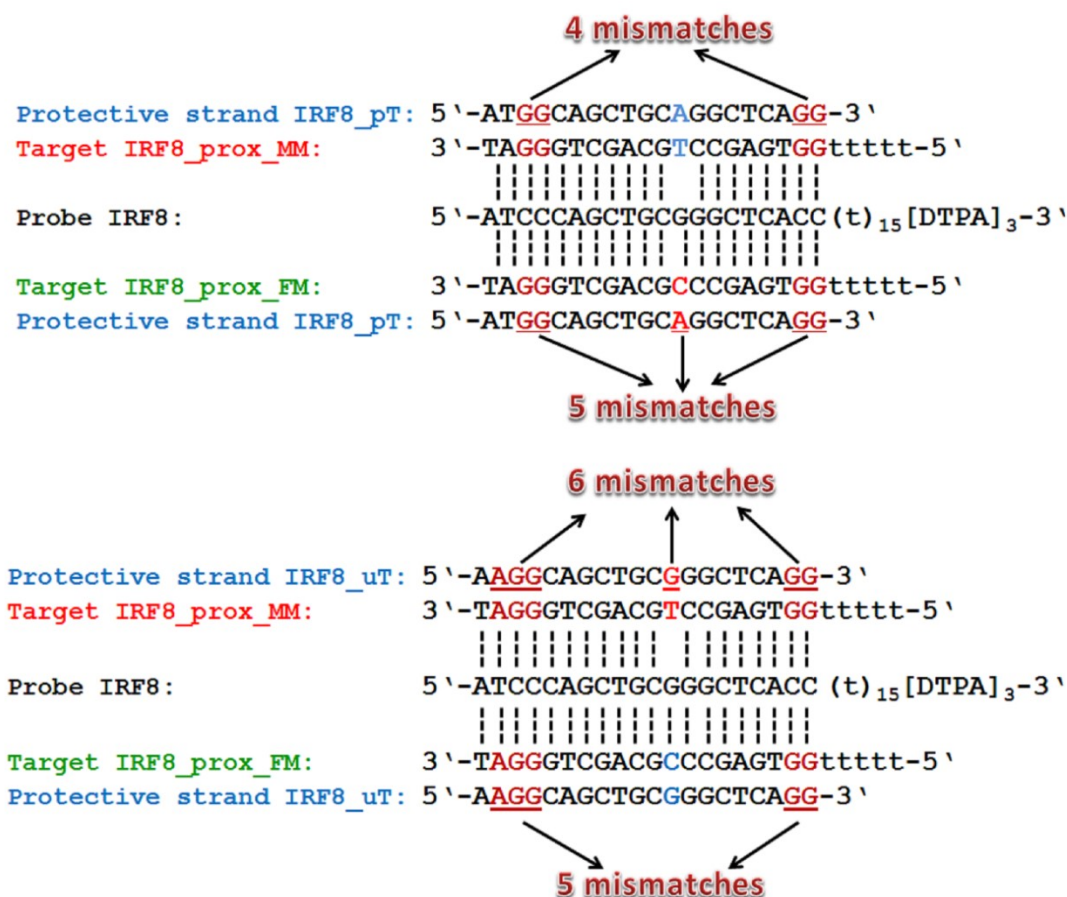


Abbildung 20: Verteilung der Fehlpaarungen zwischen dem IRF8_pT-(oben) bzw. IRF8_uT- (unten) Schutzstrang und zwei Varianten (FM und MM) des IRF8-Targets.

Die fehlgepaarten Targets von PTPN22, CD58 und HLA-DPB1 Sequenzen weisen, wie bereits angedeutet, tendenziell höhere Signale als die FM-Targets bei niedrigen Temperaturen auf (Abbildung 18). Dies deutet darauf hin, dass die starken destabilisierenden Einflüsse der zusätzlichen mittig lokalisierten Basenfehlpaarung in allen MM-Target/Schutzstrang-Doppelsträngen eine Beschleunigung der Schutzstrangverdrängung verursachen. Dies begünstigt die Hybridisierung des MM-Targets an die Sonde. Der beschleunigte Schutzstrangverdrängungsprozess dominiert das Hybridisierungsverhalten besonders bei niedrigen Temperaturen.

Bei höheren Temperaturen liefern die komplementären Targets der oben genannten Sequenzen höhere Signale als die MM-Varianten. Bei 55 °C weisen alle FM-Zielsequenzen (außer dem durch IRF8_uT-Schutzstrang geschützten IRF8_FM-Target) ein deutlich höheres Signal als die mit einer Fehlpaarung auf (Abbildung 21). Der Grund dafür sind die destabilisierenden Auswirkungen der Einzelbasenfehlpaarung im Sonde/MM-Target-Duplex. Diese sind insbesondere bei höheren Temperaturen ausgeprägt und überwiegen den Effekt des beschleunigten Schutzstrangverdrängungsprozesses.

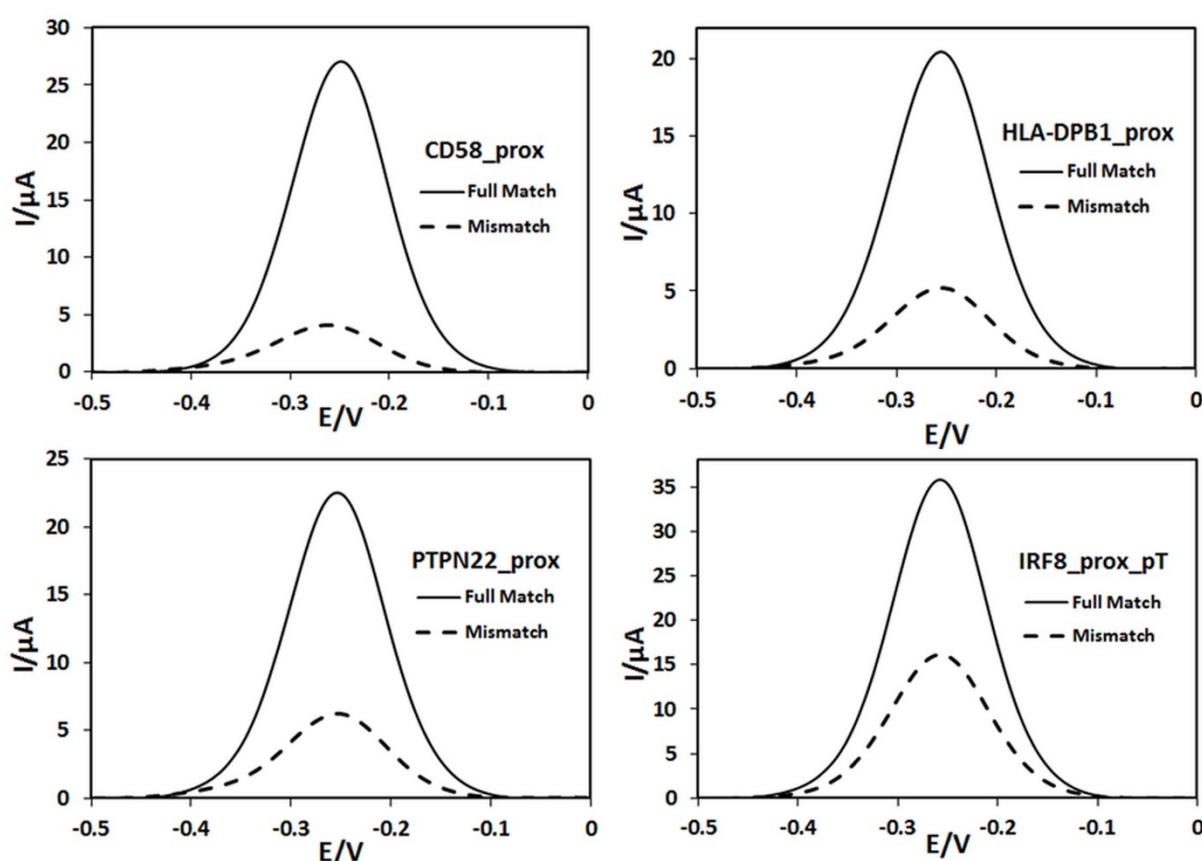


Abbildung 21: Vergleich der Peakhöhen der vier SNP-Sequenzen, die nach der Hybridisierung bei 55 °C gemessen wurden. Die SWV-Signale wurden mit Savitzky-Golay-Filter geglättet, anschließend folgte eine Basislinienkorrektur.

Im Falle der IRF8-Sequenz bildet das einzelfehlgepaarte Target, sowohl mit dem IRF8_uT-Schutzstrang als auch mit der Sonde, ein stabiles G-T-Wobble-Basenpaar an der SNP-Stelle. Dies erschwert deutlich die Unterscheidung zwischen dem komplementären und fehlgepaarten Target bei allen untersuchten Temperaturen (Abbildung 19). Im Gegensatz zu allen anderen Sequenzen liefert das proximal markierte FM-Target bei höheren Temperaturen ein etwas niedrigeres Signal als das fehlgepaarte Target.

Das IRF8_FM-Target, welches mit der IRF8_pT-Schutzsequenz geschützt wurde, liefert bei allen Temperaturen deutlich höhere Signale aufgrund der zusätzlichen A-C-Fehlpaarung im IRF8_pT-Schutzstrang/FM-Target-Duplex. Da das fehlgepaarte Target in Wirklichkeit ein stabiles Wobble-Paar mit der Sonde bildet, ist die Unterscheidung fast ausschließlich aufgrund der zusätzlichen mittigen Fehlpaarung im Schutzstrang möglich. In Anwesenheit einer weniger stabilen Fehlpaarung gegenüber der Sonde, könnte die Differenzierung in diesem Fall noch stärker ausgeprägt sein.

Das optimale Strangverdrängungsassay-Design mit proximaler Markierung, welche die bestmögliche SNP-Differenzierung gewährleistet, wäre daher eins mit einer zusätzlichen mittigen Fehlpaarung im Schutzstrang gegenüber dem FM-Target. Dadurch wird die Verdrängung des Schutzstrangs und somit die Hybridisierung des FM-Targets mit der immobilisierten Sonde beschleunigt. Zusätzlich ist die Hybridisierungsreaktion des komplementären Targets, im Vergleich mit einem fehlgepaarten Target, thermodynamisch begünstigt. Auf diese Weise ist für das perfekt komplementäre Target bei allen Temperaturen mit deutlich höheren Signalen und somit mit eindeutiger Differenzierung zwischen dem FM- und MM-Target zu rechnen.

4.3.4 Schmelztemperaturunterschiede zwischen kompetitiven Doppelsträngen und die SNP-Detektion bei distaler Markierung des Targets

Wie aus den Abbildungen 18 und 19 zu erkennen ist, unterscheiden sich die Ergebnisse für die gleichen Targetsequenzen je nach Position des Markers bezüglich der Elektrodenoberfläche. Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, kann zur Erklärung der Signalantworten von proximal markierten Targets die unterschiedliche Anzahl von Fehlpaarungen in den kompetitiven Doppelsträngen herangezogen werden. Für distal markierte Targets ergibt sich jedoch ein verändertes Bild. Es ist hier sinnvoll die Ergebnisse anhand berechneter Differenzen der Schmelztemperaturwerte und der freien Enthalpien zwischen den Sonde/Target- und Schutzstrang/Target-Doppelsträngen zu erklären. Diese beeinflussen im Wesentlichen das thermische Hybridisierungsverhalten der distal markierten Targetsequenzen.

Sequenz	Duplex	ΔG bei 20 °C (kcal/mol)	ΔG bei 55 °C (kcal/mol)	T_m (°C)
CD58	FM-Target /Schutzstrang	-19.2	-8.5	47.4
	FM-Target /Sonde	-29.7	-15.7	47.8
	Differenz	-10.5	-7.2	0.4
	MM-Target/Schutzstrang	-14.9	-6.6	38.5
	MM-Target /Sonde	-25.4	-13.7	44.6
	Differenz	-10.5	-7.1	6.1
PTPN22	FM-Target/Schutzstrang	-20.3	-10.1	51.6
	FM-Target/Sonde	-31.1	-17.1	48.9
	Differenz	-10.8	-7	-2.7
	MM-Target/Schutzstrang	-15.4	-7.3	40.7
	MM-Target/Sonde	-26.2	-14.3	44.1
	Differenz	-10.8	-7	3.4
HLA-DPB1	FM-Target/Schutzstrang	-19.8	-10.4	52.7
	FM-Target/Sonde	-30.7	-16.1	48.1
	Differenz	-10.9	-5.7	-4.6
	MM-Target/Schutzstrang	-14.9	-7.7	41.0
	MM-Target/Sonde	-25.8	-13.4	43.2
	Differenz	-10.9	-5.7	2.2
IRF8	FM-Target/IRF8_uT-Schutzstrang	-26.9	-15.5	66.8
	FM-Target/Sonde	-37.1	-21.9	61.0
	Differenz	-10.2	-6.4	-5.8
	MM-Target/IRF8_uT-Schutzstrang	-23.2	-12.8	59.6
	MM-Target/Sonde	-33.4	-19.2	56.4
	Differenz	-10.2	-6.4	-3.2
IRF8	FM-Target/IRF8_pT-Schutzstrang	-20.5	-10.8	53.9
	FM-Target/Sonde	-37.1	-21.9	61.0
	Differenz	-16.6	-11.1	7.1
	MM-Target/IRF8_pT-Schutzstrang	-25.5	-14.3	63.5
	MM-Target/Sonde	-33.4	-19.2	56.4
	Differenz	-7.9	-4.9	-7.1

Tabelle 2: Die berechneten freien Enthalpien und Schmelztemperaturen für die untersuchten Doppelstränge. T_m steht für die Schmelztemperatur, die für das Sonde/Target-Duplex den Bedingungen auf der Oberfläche angepasst wurde und die lösungsbasierte Schmelztemperatur für das Schutzstrang/Target-Duplex. Die Differenzen ergeben sich aus den Unterschieden der Schmelztemperaturen und der freien Enthalpien zwischen den entsprechenden Sonde/Target- und Schutzstrang/Target-Doppelsträngen.

Um die angesprochenen Differenzen zu bestimmen, wurden die freien Enthalpien und Schmelztemperaturen für die untersuchten Doppelstränge mit Hilfe des „two-state melting (hybridization)“-Moduls von DINAMelt Applikation des UNAFold Web-Servers (<http://unafold.rna.albany.edu/>) berechnet. Nach Zhou et al. ist dabei zu beachten, dass immobilisierte Doppelstränge im Vergleich zu jenen in Lösung befindlichen deutlich destabilisiert werden. Dies kann zur Herabsetzung der T_m bis zu ca. 20 °C führen [76]. Daher wird hier die lösungsbasierte Schmelztemperatur des Sonde/Target-Duplex durch Subtraktion von 20 °C den Bedingungen auf der Oberfläche angepasst. Für das Schutzstrang/Target-Duplex wird hingegen die lösungsbasierte Schmelztemperatur genutzt. Die freien Enthalpien wurden für beide Doppelstränge bei 20 °C und 55 °C ermittelt (Tabelle 2).

Die berechneten Schmelztemperaturdifferenzen zwischen Sonde/Target- und Schutzstrang/Target-Duplex erwiesen sich in manchen Fällen als sehr klein. Zudem wurden teilweise höhere Schmelztemperaturwerte für das Schutzstrang/Target-Duplex festgestellt. Die den Bedingungen auf der Oberfläche angepasste Schmelztemperatur des immobilisierten Sonde/Target-Doppelstrangs korreliert sehr gut mit den experimentellen Ergebnissen. Für alle distal markierten Targetsequenzen reduziert sich die gemessene Signalthöhe beginnend ab dem berechneten Schmelztemperaturwert.

Die Differenzen der freien Enthalpien zwischen den kompetitiven Doppelsträngen sind für fast alle Sequenzen ähnlich und nicht besonders ausgeprägt. Das mit dem IRF8_pT-Schutzstrang gepaarte, perfekt komplementäre IRF8-Target weist jedoch die größte ΔG -Differenz (von -16.6 kcal/mol bei 20 °C), einen beträchtlichen Schmelztemperaturunterschied zwischen dem Sonde/Target- und dem IRF8_pT-Schutzstrang/Target-Duplex sowie allgemein relativ hohe Schmelztemperaturwerte (von über 50 °C) auf. Die T_m des Sonde/Target-Duplex ist dabei um ca. 7 °C höher als die des Schutzstrang/Target-Duplex. Dies begünstigt die Verdrängung des IRF8_pT-Schutzstrangs und die Hybridisierung des FM-Targets an die immobilisierte Sonde. Infolgedessen konnten relativ hohe SWV-Signale für das IRF8_FM_dist-Target gemessen werden (Abbildung 19). Die ermittelten Parameter erklären zusätzlich das Arrhenius-Verhalten der kompetitiven Hybridisierungsreaktion des komplementären IRF8-Targets. Da die Schmelztemperatur des IRF8_pT-Schutzstrang/FM-Target-Duplex ca. 54 °C beträgt, wird der Doppelstrang während der Hybridisierungen bei

niedrigeren Temperaturen nicht schmelzen. Aufgrund der größeren Differenzen der freien Enthalpien ist die Strangverdrängung in diesem Fall der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für den Prozess. Deswegen nimmt die Hybridisierungskurve eine steile sigmoidale Form an.

Im Gegensatz zum IRF8_Sonde/FM-Target-Duplex ist die Schmelztemperatur des immobilisierten IRF8_Sonde/MM-Target-Doppelstrangs (56.4 °C) um ca. 7 °C niedriger als die T_m des entsprechenden IRF8_pT-Schutzstrang/MM-Target-Duplex (63.5 °C). Das bedeutet, dass der Sonde/Target-Doppelstrang schneller schmilzt als die Schutzstrang/Target-Doppelhelix. Darüber hinaus ist die Differenz der freien Enthalpien die niedrigste im Vergleich mit allen anderen untersuchten Sequenzen. Deswegen wird die Hybridisierungsreaktion der Sonde mit dem MM-Target unterbunden. Dies spiegelt sich sehr gut in deutlich kleinen SWV-Signalen für die distal markierte IRF8_MM-Sequenz, bei allen Temperaturen, wieder.

Im Falle der IRF8-Targetsequenz, die mit dem IRF8_uT-Schutzstrang gepaart war, sind die Unterschiede in ΔG zwischen den konkurrierenden Doppelsträngen für das FM- und das MM-Target gleich groß. Der unterschiedliche Hybridisierungskurvenverlauf für die beiden Target-Varianten lässt sich jedoch anhand der berechneten Schmelztemperaturwerte erklären. Das Duplex zwischen dem perfekt komplementären IRF8-Target und dem IRF8_uT-Schutzstrang schmilzt erst bei ca. 67 °C. Dadurch wird die Hybridisierung des FM-Targets an die Sonde, bei fast allen studierten Temperaturen, benachteiligt. Das IRF8_MM-Target/IRF8_uT-Schutzstrang-Duplex denaturiert dabei eher (bei ca. 60 °C) als der IRF8_FM-Target/IRF8_uT-Schutzstrang-Doppelstrang. Deswegen liefert das fehlgepaarte Target höhere SWV-Signale als das komplementäre Target bei Hybridisierungstemperaturen unterhalb von 60 °C. Bei 65 °C weist das FM-Target ein höheres Signal auf, was sich damit begründen lässt, dass das immobilisierte MM-Target/Sonde-Duplex bei höheren Temperaturen weniger stabil ist als der FM-Target/Sonde-Doppelstrang.

Das fehlgepaarte, distal markierte CD58-Target liefert interessanterweise bei fast allen untersuchten Temperaturen deutlich höhere Signale als das perfekt komplementäre Target. Dabei liefert das FM-Target bei allen Temperaturen sehr niedrige Signale. Die berechneten Differenzen der freien Enthalpien für das FM- und MM-Target sind gleich groß und betragen

-10.5 kcal/mol bei 20 °C. Die Schmelztemperaturwerte für das Sonde/FM-Target- und Schutzstrang/FM-Target-Duplex sind fast identisch und relativ niedrig: 47.8 °C und 47.4 °C. Für die CD58_MM-Sequenz ergibt sich jedoch eine relativ große T_m -Differenz von ca. 6 °C. Der Schutzstrang/Target-Doppelstrang schmilzt dabei eher als das auf der Elektrode immobilisierte Sonde/Target-Duplex. Folglich ergeben sich hohe SWV-Signale für das MM-Target. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine deutlich höhere Schmelztemperatur des Sonde/Target-Duplex, im Vergleich mit der T_m des Schutzstrang/Target-Doppelstrangs, eine effiziente Hybridisierung des Targets an der Sonde zulässt.

Die PTPN22_dist-Sequenz liefert höhere Signale im Temperaturbereich von 20 °C bis 40 °C für das fehlgepaarte und ab 50 °C für das komplementäre Target. Das ΔT_m zwischen kompetitiven Doppelsträngen für das MM-Target beträgt 3.4 °C, wobei die T_m des Sonde/MM-Target-Duplex höher ist. Für das komplementäre Target tritt das Gegenteil ein. Die Schmelztemperatur des Sonde/FM-Target-Doppelstrangs ist um ca. 3 °C niedriger als die T_m des Schutzstrang/FM-Target-Duplex. Deswegen wird in diesem Fall die Hybridisierung des MM-Targers bevorzugt bis die T_m des Sonde/MM-Target-Duplex erreicht wird, nämlich bei ca. 44 °C. Danach liefert das FM-Target größere Signale aufgrund der höheren Schmelztemperatur des Sonde/FM-Target-Duplex.

Für die distal markierte HLA-DPB1-Sequenz beträgt die Schmelztemperatur des Sonde/FM-Target-Duplex 48.1 °C und ist dabei um ca. 4.5 °C niedriger als die T_m des Schutzstrang/FM-Target-Doppelstrangs. Es wurden trotzdem beachtlich hohe Signale gemessen. Eine ähnliche Situation liegt für das distal markierte, komplementäre PTPN22-Target vor. Möglicherweise lassen die nicht allzu großen T_m -Unterschiede zwischen den kompetitiven Doppelsträngen, bei einer Schmelztemperatur des Sonde/Target-Duplex von mehr als 48 °C, trotzdem eine relativ effiziente Target-Hybridisierung an der Sonde zu. Die sehr kleinen Signale des HLA-DPB1_MM-Targers, im Vergleich mit der PTPN22_MM-Sequenz, können mit einer geringeren T_m -Differenz von ca. 2 °C zwischen den konkurrierenden Doppelsträngen zusammenhängen. Darüber hinaus weist das Duplex zwischen dem HLA-DPB1_MM-Target und der Sonde die niedrigste Schmelztemperatur von allen hier studierten Sonde/Target-Doppelsträngen auf.

Das optimale Design des Schutzstrangverdrängungsassays mit distaler Markierung des Targets wäre eins mit einer optimierten Schutzstrangsequenz, deren Duplex mit einem MM-Target eine höhere Schmelztemperatur als die T_m des Sonde/Target-Duplex aufweist. Für die FM-Variante hingegen wäre die optimale Schmelztemperaturdifferenz von mindestens 6 °C von Vorteil, wobei die T_m des Sonde/Target-Duplex höher ist als die des Schutzstrang/Target-Doppelstrangs. Dies lässt eine eindeutige Unterscheidung der beiden Sequenzen in einem breiten Temperaturbereich zu (siehe Sequenz IRF8_pT).

4.3.5 Effekte der Position des Osmiummarkers

Einerseits, könnte eine größere Entfernung zwischen elektroaktivem Marker und der Elektrode eine Abnahme des elektrochemischen Signals verursachen, andererseits ist die distale Ende der doppelsträngigen Helix sterisch weniger gehindert und dadurch flexibler in ihrer Bewegung. Dies gibt dem elektroaktiven Marker die Gelegenheit sich von der Elektrodenoberfläche zu entfernen oder sich in ihre direkte Nähe zu bewegen. Zusätzlich, kann eine Fehlpaarung (je nach ihrer Position und der sie umgebenden Sequenz) eine strukturelle Störung der Helix, wie z. B. Krümmung der DNA (DNA-bending), verursachen [110]. Diese dynamischen Effekte können zu größeren Unterschieden der Signalhöhen und daher zur Verschlechterung der Reproduzierbarkeit führen.

Im Falle der fehlgepaarten, proximal markierten HLA-DPB1-Targetsequenz wurden, im Vergleich mit dem distal markierten MM-Target, deutlich höhere maximale Signale erhalten. Dies weist darauf hin, dass der Einfluss einer Fehlpaarung in diesem Fall keine große Rolle für das DNA-bending zu spielen scheint. Die Signalhöhen der anderen fehlgepaarten Sequenzen, die entweder distal oder proximal markiert wurden, unterscheiden sich nicht wesentlich voneinander. Kein völlig konsistentes Verhältnis von Signalen der proximal vs. distal markierten Targetsequenzen wurde erkannt, wobei in der Regel alle proximal markierten FM- und MM-Sequenzen (außer der HLA-DPB1_FM) ein höheres maximales Signal liefern. Für die Targets: CD58_FM, HLA-DPB1_MM, IRF8_pT_FM, IRF8_pT_MM und IRF8_uT_MM waren die Unterschiede sehr deutlich, für die restlichen Sequenzen dagegen weniger ausgeprägt. Dies deutet darauf hin, dass die Nähe des Osmiummarkers zur Elektrodenoberfläche zwar eine Rolle spielt, aber nicht der einzige Faktor, der die Unterschiede zwischen den beiden Systemen beeinflusst, ist.

Hybridisierung in einer Lösung: UV-Spektroskopie

4.3.6 Einfluss von Fehlpaarungen auf die Schmelztemperatur der DNA

Der Einfluss von Fehlpaarungen auf die Schmelztemperatur des CD58-Duplex in einer homogenen Lösung ist der Tabelle 3 zu entnehmen.

Art des CD58-Duplex	T _m (°C)
FM-Target/Sonde_prox	67.42
FM-Target/Schutzstrang_prox	54.97
FM-Target/Sonde_dist	68.97
FM-Target/Schutzstrang_dist	55.17
MM-Target/Sonde_prox	60.995
MM-Target/Schutzstrang_prox	40.495
MM-Target/Sonde_dist	61.97
MM-Target/Schutzstrang_dist	41.495

Tabelle 3: Schmelztemperaturwerte der CD58-Doppelstränge, gemessen mittels UV-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 260 nm.

Die Schmelztemperatur des Sonde/Target-Doppelstrangs wird in Anwesenheit einer mittigen SNP-Fehlpaarung in der Targetsequenz um ca. 7 °C reduziert. Die gleiche Fehlpaarung im Schutzstrang/Target-Duplex verursacht die Senkung der Schmelztemperatur um ca. 14 °C. Diese Ergebnisse bestätigen, dass das Duplex aus Schutzstrang und Target durch die zusätzliche mittige Fehlpaarung deutlich destabilisiert wird. Dies erklärt, zumindest teilweise, warum die proximal markierten MM-Sequenzen bei niedrigen Temperaturen höhere Signale liefern als die ohne die mittige Einzelbasenfehlpaarung (FM). Die Position der fünf terminalen, in diesem Versuch nicht-markierten, Thyminbasen hatte keinen Einfluss auf die Schmelztemperatur.

4.4 Zusammenfassung

Obwohl sich die Detektion von Einzelbasenfehlpaarungen unter Verwendung einfacher Hybridisierungsassays als schwierig erweisen kann, es ist trotzdem gelungen, mit Hilfe des in der vorliegenden Arbeit eingesetzten kompetitiven Strangverdrängungsassays und eines

optimal konstruierten Schutzstrangs, die kleinen Sequenzvariationen in den untersuchten, klinisch relevanten DNA-Sequenzen voneinander zu unterscheiden.

Bei der SNP-Differenzierung spielen in dem hier verwendeten Hybridisierungsassay zwei kompetitive Faktoren eine wesentliche Rolle. Der erste basiert auf der Differenz in thermischen Stabilitäten der immobilisierten Sonde/Target-Doppelstränge. Das fehlgepaarte Sonde/Target-Duplex wird, im Vergleich zum komplementären Sonde/Target-Doppelstrang insbesondere bei höheren Temperaturen, aufgrund der Anwesenheit mittiger Einzelbasenfehlpaarung, destabilisiert. Der zweite Faktor beruht auf der Einbeziehung einer zusätzlichen mittigen Fehlpaarung im Schutzstrang gegenüber einer der zwei Target-Varianten. Dies beschleunigt die Schutzstrangverdrängung und begünstigt damit die Hybridisierung des Targets an der Sonde. Anhand der gewonnenen Ergebnisse wurde deutlich, dass die Aufgabe des Schutzstrangs nicht nur in der Unterbindung der Markierungsreaktion in der Erkennungssequenz eines Targets liegt, sondern auch in der Verstärkung der SNP-Differenzierung. Das Strangverdrängungsassay-Design mit proximaler Markierung des Targets, in dem der Schutzstrang zusätzlich eine mittig lokalisierte Fehlpaarung gegenüber dem MM-Target beinhaltet, gewährleistet eine eindeutige Differenzierung der SNP-Varianten in den meisten untersuchten Sequenzen und in einem breiten Temperaturbereich. Mit der zusätzlichen Fehlpaarung gegenüber dem FM-Target könnten deutlich höhere Signale für alle komplementären Zielsequenzen (FM), bereits bei niedrigeren Temperaturen, erreicht werden.

Neben der Anzahl und Lage der Fehlpaarungen innerhalb eines DNA-Doppelstrangs hat auch die Art der inkompatiblen Basen sowie der benachbarten Sequenz einen Einfluss auf die Stabilität des Duplex und somit auf dessen Schmelztemperatur. Die T_m -Differenzen zwischen den kompetitiven Doppelsträngen (Sonde/Target vs. Schutzstrang/Target) beeinflussen das thermische Hybridisierungsverhalten des Targets. Die verschiedenen Variationen der Schmelztemperaturen zwischen den konkurrierenden Doppelsträngen ermöglichen eine Manipulation der gemessenen Signalhöhen und somit die Target-Differenzierung. Dies kann besonders hilfreich sein, wenn eine SNP-Variante eine stabile Nicht-Watson-Crick-Basenpaarung mit der Sonde bildet, was in geringen Unterschieden der Duplexstabilität zwischen den beiden Target-Varianten resultiert.

5. Einfluss der Temperatur und der Nukleotidsequenz auf die Kinetik der DNA-Strangverdrängung auf Goldelektroden

5.1 Einleitung

Die Temperatur spielt eine sehr wichtige Rolle in der sequenzspezifischen DNA-Analyse und ist gleichzeitig ein wesentlicher Parameter in der Elektrochemie.

Eine gute Alternative zum Heizen einer gesamten Analysenlösung stellen direkt geheizte Elektroden dar. Um die Auswirkungen der Oberflächenumgebung der direkt geheizten Elektroden auf das sequenzspezifische Hybridisierungsverhalten zu studieren, wurden in der vorliegenden Studie Messungen miteinander verglichen, die mit Hilfe direkt heizbarer Golddrahtelektroden und durch temperierte Lösung indirekt beheizter Goldscheibenelektroden, aufgenommen wurden. Die gewonnenen Erkenntnisse sind insbesondere im Hinblick auf die Detektion der Hybridisierungsvorgänge mit Hilfe direkt heizbarer DNA-Microarrays von großer Bedeutung. Im Rahmen dieses Kapitels werden die Effekte von DNA-Sequenz und Temperaturgradienten in Elektrodennähe auf die Kinetik des Schutzstrangverdrängungsprozesses beschrieben. Die Diskussion wird dabei mit Simulationsergebnissen der Temperaturverteilung und Strömungsgeschwindigkeit in direkter Elektrodennähe unterstützt.*

5.2 Experimentelles

5.2.1 Materialien

Für die in diesem Kapitel vorgestellten Experimente wurden vier unterschiedliche DNA-Sequenzen der Maissorte MON810 verwendet [111,112]. SSIIb (Stärkesynthase-Gen IIb) und ivrp (Invertase-Gen) Sequenzen dienen als Positivkontrolle für das Vorhandensein von Mais. Zwei andere Sequenzen: CRY und 810 lassen die spezifische Detektion von gentechnisch verändertem MON810-Mais zu. Die CRY-Sequenz dient dabei zum Nachweis der cryIa/b-

* Die Ergebnisse dieses Teilprojektes wurden bereits im Rahmen der Publikation „Sequence and Temperature Influence on Kinetics of DNA Strand Displacement at Gold Electrode Surfaces“ ACS Appl Mater Interfaces, 2015;7(36):19948-19959 veröffentlicht. Die Simulation mit Hilfe von COMSOL Multiphysics wurde von A. Sedova (Arbeitskreis Prof. G.-U. Flechsig) durchgeführt.

Transgene in der Probe und die 810 zum Nachweis der Insertion des cryla/b-Transgens an der richtigen Stelle im Maisgenom.

Die verwendeten DNA-Oligonukleotide (siehe unten) wurden von biomers.net GmbH (Ulm, Deutschland) hergestellt. Der Sondenstrang beinhaltet an seinem 3'-Ende zusätzlich 15 Adeninbasen als Distanzstück, um eine effiziente Hybridisierung an der Elektrodenoberfläche zu gewährleisten, sowie einen [DTPA]₃-Linker, um eine stabile Befestigung der Sonde auf der Goldelektrodenoberfläche zu ermöglichen. Die Schutzstrangsequenzen beinhalten vier bis fünf Fehlpaarungen gegenüber dem Target (mit Unterstrich gekennzeichnet), um die Schutzstrangverdrängung während des Hybridisierungsschrittes an der Elektrodenoberfläche zu erleichtern.

Sonde ivrp: 5'-CACGTGAGAATTTCCGTCTACTCGAGCCTaaaaaaaaaaaaaaaaa[DTPA]₃-3' (29 +15a)

Schutzstrang ivrp: 5'-CAGCTGAGAATTTCCGTCTAGTGAGCCT-3' (29)

Target ivrp: 5'-tttttAGGCTCGAGTAGACGGAAATTCTCACGTG-3' (29 + 5t)

Sonde SSIIb: 5'-AGCAAAGTCAGAGCGCTGCAATGCAaaaaaaaaaaaaaaaaa[DTPA]₃-3' (25+15a)

Schutzstrang SSIIb: 5'-ACGAAAGTCAGAGCGCTCGAATGGA-3' (25)

Target SSIIb: 5'-tttttTGATTGCAGCGCTCTGACTTTGCT-3' (25 + 5t)

Sonde CRY: 5'-AGATACCAAGCGGCCATGGACAACAAAAAAAAAAAAAAAAa[DTPA]₃-3' (26+15a)

Schutzstrang CRY: 5'-AGATAGCAAGCGGCCATGCAGAAAGAA-3' (26)

Target CRY: 5'-tttttTTGTTGTCCATGGCCGCTTGGTATCT-3' (26+5t)

Sonde 810: 5'-AACATCCTTTGCCATTGCCCAGCaaaaaaaaaaaaaaaaa[DTPA]₃-3' (23 + 15a)

Schutzstrang 810: 5'-AACATCCTTTGGCATTCCCCACG-3' (23)

Target 810: 5'-tttttGCTGGGCAATGGCAAAGGATGTT-3' (23 + 5t)

Die für die Target-Markierung verwendete Osmiumtetroxidlösung (2 % wt. in H₂O) stammte von der Firma Fluka und das 2,2'-Bipyridin von Merck. Die Pufferlösung enthielt 10 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan und 0.5 M Na₂SO₄ und wurde mit Schwefelsäure auf einen pH-Wert von 7.5 eingestellt. Alle elektrochemischen Messungen wurden mittels einer

Dreielektrodenanordnung durchgeführt. Dabei diente eine Ag/AgCl (3 M KCl)-Elektrode (Metrohm-Autolab) als Referenzelektrode und eine Glaskohlenstoffelektrode als Gegenelektrode. Eine Goldscheibenelektrode von Metrohm (2 mm Durchmesser) und eine selbstentwickelte direkt beheizte Golddrahtelektrode (Durchmesser von 25 µm und 5 mm Länge) [9] kamen als Arbeitselektroden zum Einsatz. Für die voltammetrischen Messungen wurde ein Autolab PGSTAT 12, der Firma Ecochemie B.V. (Utrecht, Netherlands) benutzt. Die Lösungstemperatur wurde während der Hybridisierung an der Goldscheibenelektrode mit Hilfe eines Wärmethermostats (Huber) kontrolliert. Die Golddrahtelektrode wurde mittels eines HF ThermoLab-Heizgenerators (Gensoric GmbH, Rostock, Deutschland) direkt geheizt.

5.2.2 Vorbereitung des Targets

Das DNA-Target wurde mit Osmiumtetroxidbipyridin modifiziert. Während der Markierung wurde die Zielsequenz durch einen Schutzstrang geschützt. Dieser ist partiell komplementär zur Erkennungssequenz des Targets, so dass nur fünf ungeschützte Thyminbasen am 5'-Ende markiert werden. Dafür wurden Target- und Schutzstrang-Lösung zusammengegeben, um die Hybridisierung der Einzelstränge zu ermöglichen. Nach zwei Stunden bei Raumtemperatur wurde [OsO₄(bipy)]-Lösung zugegeben. Nach weiteren zwei Stunden wurde der überschüssige Komplex durch Dialyse aus der Analysenlösung entfernt. Die Dialyse erfolgte wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben. Im Anschluss wurde die Lösung des markierten Target/Schutzstrang-Doppelstrangs auf eine Konzentration von 200 nM verdünnt und für die Hybridisierungsexperimente mit immobilisierter Sonde verwendet.

5.2.3 Vorbereitung der modifizierten Elektrode

Vor der Immobilisierung der Sonde wurden zunächst die Elektroden vorbehandelt. Die Goldscheibenelektrode wurde mechanisch mit Aluminiumoxidpulver mit einer Korngröße von 0.3 µm (Buehler, Deutschland) poliert. Die Golddrahtelektrode wurde mit Gleichstrom an Luft geglüht. Anschließend wurden die beiden Elektroden elektrochemisch mit Hilfe der CV (25 Scans, von -0.3 bis 1.7 V, Scan Rate 100 mV/s) in 0.5 M Schwefelsäure poliert. Folgend wurde 30 µM Sondenlösung in 10 mM TRIS-Puffer und 0.5 M Na₂SO₄ (pH 7.5) auf die vorbehandelten Elektroden aufgebracht und über Nacht in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre inkubiert. Danach wurden die Elektroden für eine Stunde in eine 1 mM Lösung von 6-Mercapto-1-hexanol eingetaucht, um eine geordnete ssDNA-SAM-Schicht auszubilden.

Damit waren die Elektroden für die anschließenden Hybridisierungsexperimente mit dem Target einsatzfähig.

5.2.4 Hybridisierungsschritt und elektrochemische Messungen

Abbildung 22 stellt schematisch das in diesem Kapitel verwendete Detektionsverfahren dar. Zusätzlich wurden die Ausrichtung des Osmiumtetroxidmarkers, Position des Toeholds und Fehlpaarungen in den Schutzstrang/Target-Doppelsträngen der SSIIb und 810 Sequenzen gekennzeichnet.

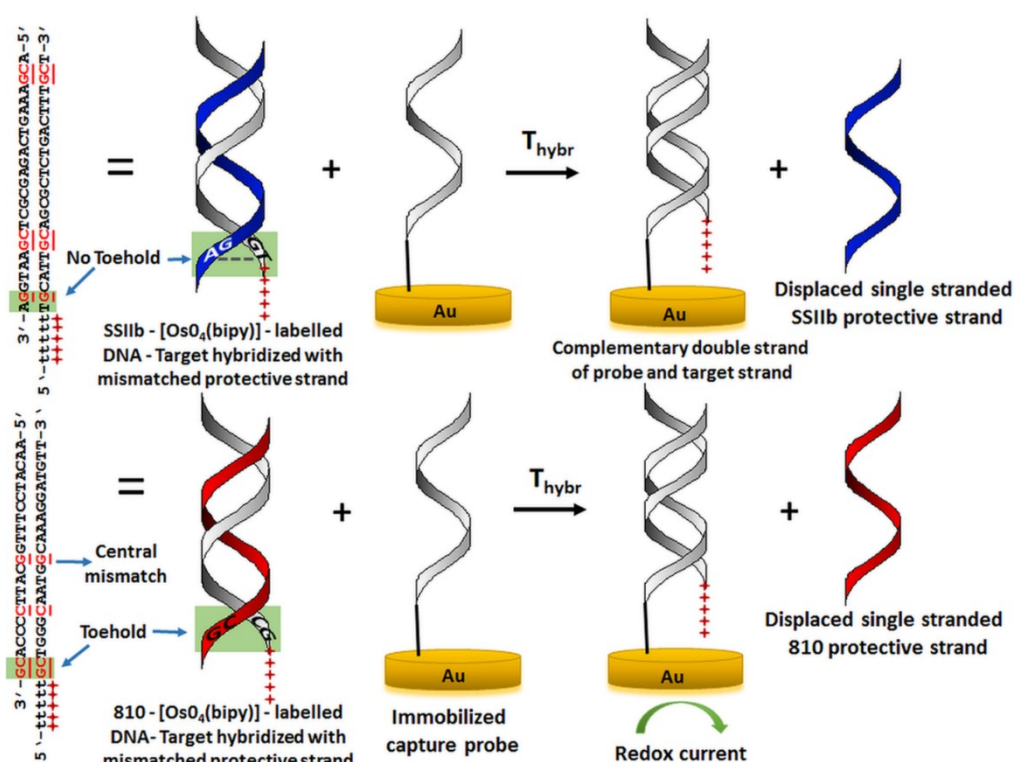


Abbildung 22: DNA-Detektionsverfahren unter Verwendung von Schutzsträngen und $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ -markierten Targets (übernommen mit Genehmigung von [94]).

Während eines Hybridisierungsschrittes wurde die Goldscheibenelektrode für 15 Minuten in eine temperierte Lösung von markiertem Target/Schutzstrang-Duplex eingetaucht. Die Lösung wurde mit Hilfe eines durch Wasser temperierten doppelwandigen Glasgefäßes und eines Wärmethermostats thermostatiert und mit einem Magnetrührer gerührt. Die direkt geheizte Golddrahtelektrode hingegen wurde für 15 Minuten in eine auf 8 °C temperierte Lösung eingetaucht. Dabei wurde der Golddraht mit Hilfe des ThermoLab-Heizgenerators auf die gewünschte Temperatur direkt geheizt. Die potentiometrische Temperaturkalibrierung

einer Golddrahtelektrode sowie ein Versuchsaufbau für das Heizen sind in Kapitel 3.4.1 beschrieben. Nach jeder Hybridisierung wurde die Elektrode mit TRIS-Puffer/ Na_2SO_4 -Lösung gespült, um die unspezifisch adsorbierte DNA zu verdrängen. Anschließend wurde die Elektrode in eine elektrochemische Zelle mit TRIS-Puffer/ Na_2SO_4 -Lösung eingetaucht. Hier erfolgte die SWV-Messung bei Raumtemperatur unter folgenden Parametern: Anfangspotential -0.55 V, Endpotential 0 V, Amplitude 40 mV und Frequenz 200 Hz. Nach der Messung wurde die Goldscheibenelektrode für 60 Sekunden in 50 °C warmes Wasser getaucht. Die Golddrahtelektrode wurde für 60 Sekunden in Wasser bei Raumtemperatur getaucht und elektrisch auf 41 °C geheizt. Dies erlaubte die Dehybridisierung und Regenerierung der SAM. Nach der Dehybridisierung und der darauffolgenden Messung des Blank-Signals wurden die Elektroden für weitere Hybridisierungen und anschließende Messungen verwendet. Die peakförmigen voltammetrischen Signale wurden mittels der GPES 4.9-Software (Ecochemie B.V.) nach Savitzky und Golay geglättet und Baseline korrigiert. Je drei separate Hybridisierungsserien wurden für jede Targetsequenz aufgenommen.

5.3 Ergebnisse und Diskussion

Abbildungen 23 und 24 zeigen den beträchtlichen Einfluss der Temperatur der Target/Schutzstrang-Duplex-Lösung auf den 15-minütigen Hybridisierungsschritt an einer Goldscheibenelektrode. Für die SSIIb-Sequenz wurde eine 319-fache Erhöhung des SWV-Signals bei Änderung der Lösungstemperatur von 25 °C auf 62.5 °C beobachtet. Die CRY- und ivrp-Sequenzen weisen ein ähnlich extremes Temperaturverhalten auf.

5. Einfluss der Temperatur und der Nukleotidsequenz auf die Kinetik der DNA-Strangverdrängung auf Goldelektroden

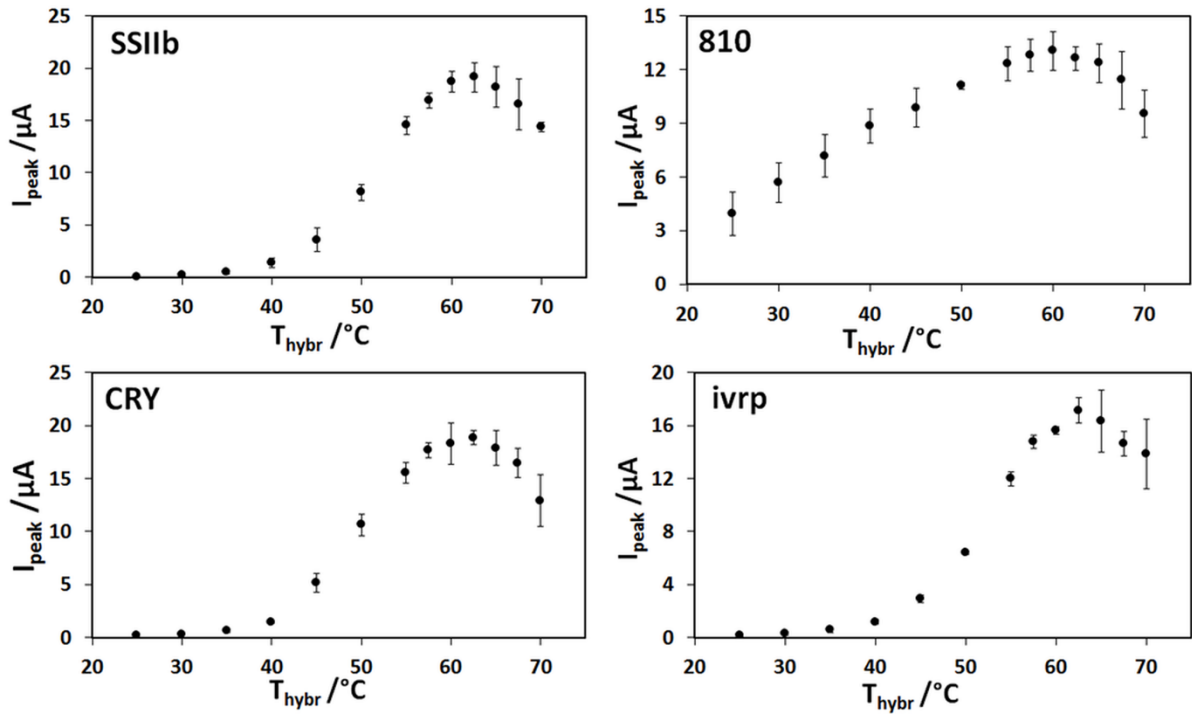


Abbildung 23: Einfluss der Hybridisierungstemperatur auf SWV-Signale von vier MON810-Sequenzen. Die 15-minütige Hybridisierung erfolgte auf einer Goldscheibenelektrode, die in eine 0.2 μM Target-Lösung eingetaucht wurde. Während des Hybridisierungsschrittes wurde die Lösung geheizt und mit einem Magnetrührer gerührt. Die Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen der drei unabhängigen Messungen mit einer neu immobilisierten Sonde (übernommen mit Genehmigung von [94]).

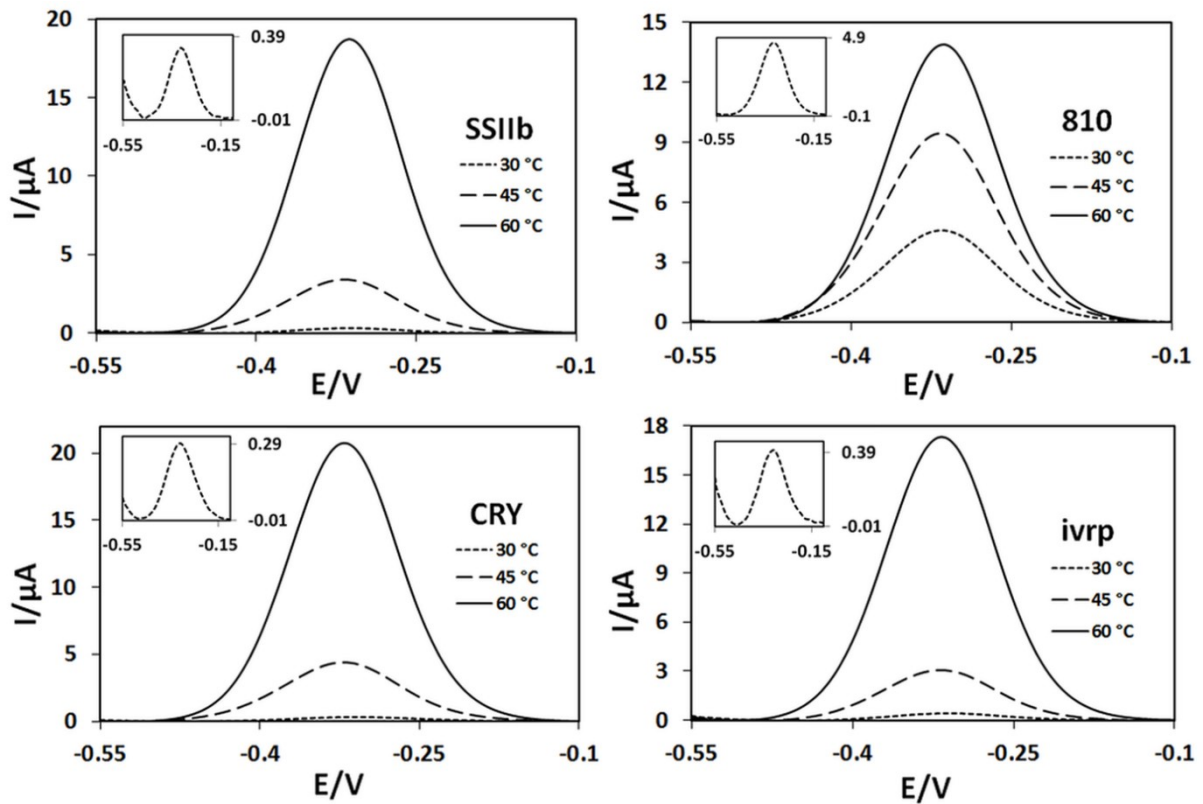


Abbildung 24: SWV-Signale von vier MON810-Sequenzen bei drei unterschiedlichen Hybridisierungstemperaturen. Das Nebenbild zeigt einen vergrößerten Peak bei 30 °C. Signale wurden nach Savitzky und Golay geglättet und Baseline korrigiert (übernommen mit Genehmigung von [94]).

Die exponentiellen Teile der in Abbildung 23 vorgestellten Diagramme wurden als Arrhenius-Graphen dargestellt (Abbildung 25). Zusätzlich wurden die Aktivierungsparameter berechnet. Wie man Tabelle 4 entnehmen kann, weisen die untersuchten Strangverdrängungsreaktionen der ivrp, CRY und SSIIb Sequenzen hohe formale Aktivierungsenergien von jeweils 123.8, 130.8 und 150.9 kJ/mol auf. Auch die präexponentiellen Faktoren sind sehr hoch und liegen im Bereich zwischen 6.07×10^{20} und $1.85 \times 10^{25} \mu\text{A}$. Die berechneten Werte der E_a und A für die 810-Sequenz unterscheiden sich deutlich von Werten der oben genannten Sequenzen. Hier beträgt die Aktivierungsenergie nur 29.72 kJ/mol und der präexponentielle Faktor $7.22 \times 10^5 \mu\text{A}$. Die Herabsetzung der E_a kann man u. a. auf die Anwesenheit von zwei ungepaarten terminalen Nukleotiden im 810-Schutzstrang/Target-Duplex zurückführen. Das sogenannte Toehold ist komplementär gegenüber der Sonde und initiiert den Strangverdrängungsprozess. Dabei kann das aus zwei G/C Nukleotiden bestehende Toehold, wie das in der 810-Sequenz, die Strangverdrängungsreaktion um den Faktor 1000 beschleunigen [84]. Darüber hinaus beinhaltet die 810-Sequenz eine mittige Fehlpaarung im Target/Schutzstrang-Duplex und ist dabei die kürzeste von allen hier studierten Sequenzen. Dies begünstigt zusätzlich die Schutzstrangverdrängung. Die Beschleunigung der Reaktion ist bei niedrigeren Temperaturen (zwischen 25 und 50 °C) zu beobachten, wo die SWV-Signale von 810 deutlich höher sind als die der anderen Sequenzen. Ab 50 °C tritt die entgegengesetzte Situation auf (Abbildung 26). Des Weiteren ist im Gegensatz zu anderen Sequenzen kein sigmoidaler Kurvenverlauf für die 810-Sequenz zu beobachten, weder an Goldscheibenelektroden noch an Golddrahtelektroden (Abbildung 27). Dies deutet darauf hin, dass der Hybridisierungsprozess von 810 mehr als einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt aufweist. Die sequenzabhängigen Effekte beeinflussen sekundäre Prozesse, wie z. B. die Diffusionsgeschwindigkeit und tragen dadurch zur Gesamtgeschwindigkeit der kompetitiven Hybridisierungsreaktion bei.

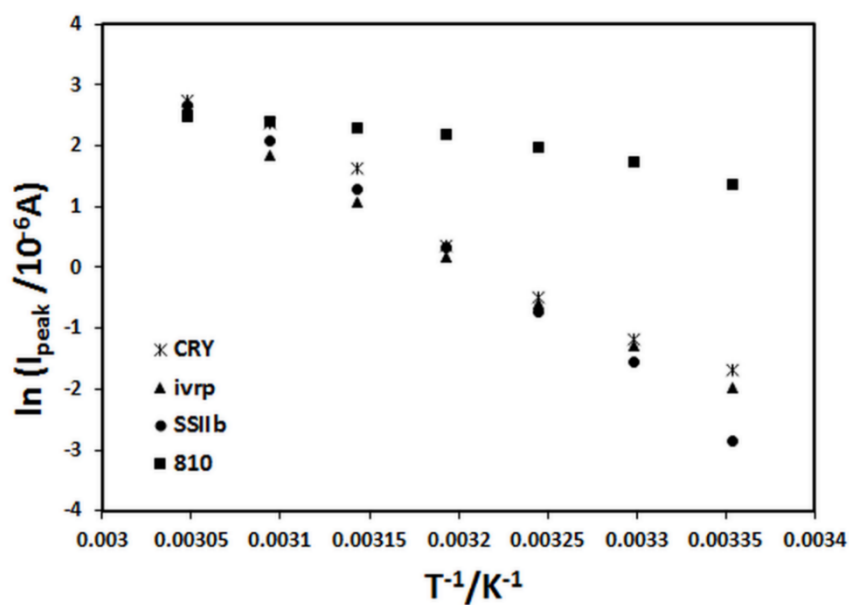


Abbildung 25: Arrhenius-Darstellung der in Abbildung 23 abgebildeten Temperaturabhängigkeit der SWV-Signale (übernommen mit Genehmigung von [94]).

Sequenz	E_a [kJ/mol]	A [μA]
SSIIb	150.9	1.85×10^{25}
CRY	130.8	1.61×10^{22}
ivrp	123.8	6.07×10^{20}
810	29.72	7.22×10^5

Tabelle 4: Aktivierungsenergien und präexponentielle Faktoren, die mit Hilfe der Arrhenius-Darstellung aus Abbildung 25 ermittelt wurden.

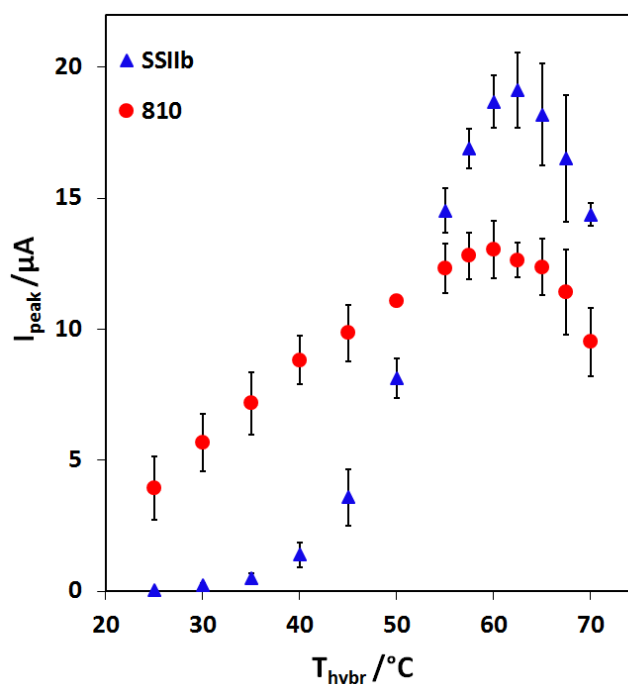


Abbildung 26: Vergleich der temperaturabhängigen Hybridisierungskurven der 810- und SSIIb-Sequenz (übernommen mit Genehmigung von [94]).

Die Sequenzen SSIIb und 810 wurden zusätzlich an direkt geheizten Golddrahtelektroden untersucht (Abbildung 27 und 28). Die dazugehörigen Aktivierungsenergien und präexponentiellen Faktoren sind Tabelle 5 zu entnehmen.

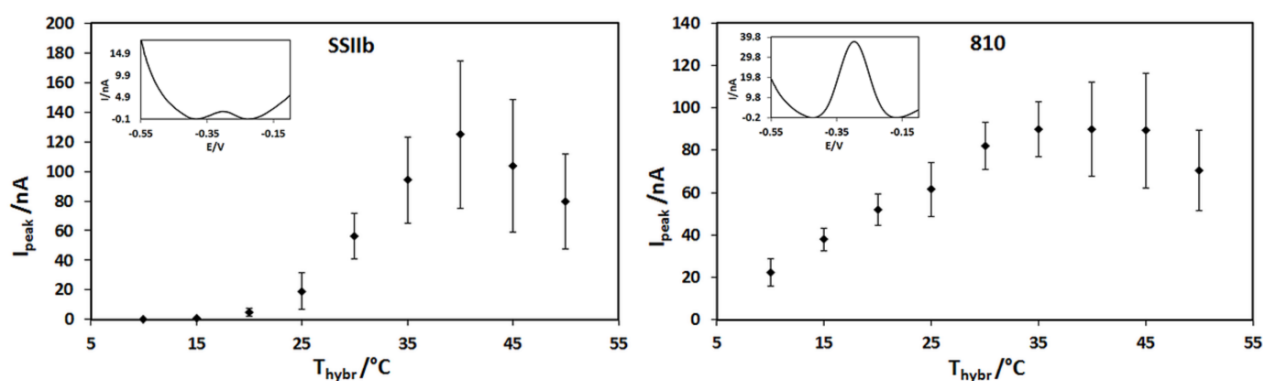


Abbildung 27: Einfluss der Hybridisierungstemperatur auf SWV-Signale von zwei MON810-Sequenzen. Die 15-minütige Hybridisierung erfolgte auf einer Golddrahtelektrode, die in eine auf 8 °C temperierte 0.2 µM Target-Lösung eingetaucht wurde. Während des Hybridisierungsschrittes wurde die Drahtelektrode direkt beheizt. Das Nebenbild zeigt einen SWV-Peak bei 15 °C. Die Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen der drei unabhängigen Messungen mit einer neu immobilisierten Sonde (übernommen mit Genehmigung von [94]).

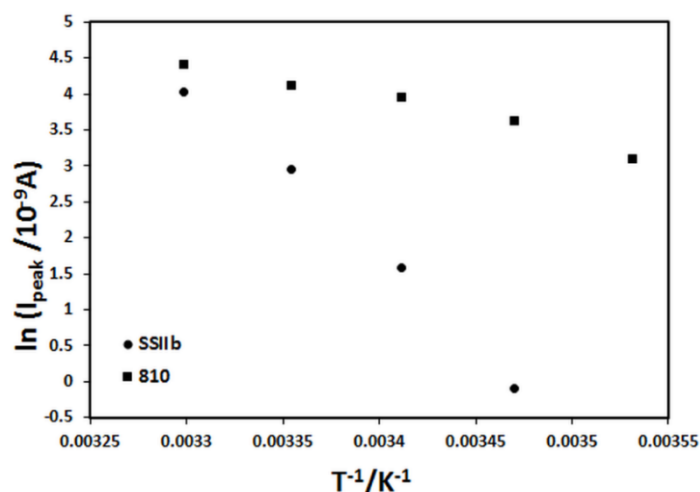


Abbildung 28: Arrhenius-Auftragung der in Abbildung 27 abgebildeten Temperaturabhängigkeit der SWV-Signale (übernommen mit Genehmigung von [94]).

Sequenz	E_a [kJ/mol]	A [μA]
SSIIb	200.0	1.86×10^{33}
810	44.2	3.55×10^6

Tabelle 5: Aktivierungsenergien und präexponentielle Faktoren, die mit Hilfe des Arrhenius-Graphs aus Abbildung 28 ermittelt wurden.

Für die SSIIb-Sequenz wurde eine 137-fache Erhöhung des SWV-Signals bei Änderung der Elektrodentemperatur von 15 °C auf 40 °C beobachtet. Dabei sind die an der Golddrahtelektrode erhaltenen maximalen SWV-Signale ungefähr 150-mal kleiner im Vergleich mit den an der Goldscheibenelektrode gemessenen. Dies lässt sich jedoch nicht lediglich durch unterschiedlich große Oberflächen der beiden Elektroden (Faktor 8), kombiniert mit verschiedenen Oberflächenbedeckungen durch Sondenmoleküle (Faktor 3) [9], erklären. Die erste Studie zur DNA-Hybridisierung an direkt geheizten Golddrahtelektroden von Flechsig et al. zeigte ebenfalls einen großen Einfluss der Elektrodentemperatur auf ACV-Signale während der Hybridisierung eines Ferrocen-markierten Targets an die immobilisierte DNA-Sonde. Eine 140-fache Erhöhung des ACV-Signals bei Änderung der Elektrodentemperatur von 3 °C auf 48 °C wurde beobachtet. Die an direkt geheizten Elektroden gemessenen Signale zeichneten sich dabei ebenfalls durch

niedrige Signalstärken aus und waren im Vergleich mit dem erhaltenen Signal an Elektroden, die zusammen mit der ganzen Targetlösung geheizt wurden, niedriger [9].

Weiterhin wurden in der vorliegenden Arbeit, im Vergleich mit den Scheibenelektroden, deutlich größere Aktivierungsenergien von 200 kJ/mol für die SSIIb- und 44.2 kJ/mol für die 810-Sequenz an direkt geheizten Golddrahtelektroden beobachtet. Das thermische Hybridisierungsverhalten und die großen Unterschiede in den Aktivierungsparametern zwischen beiden untersuchten Sequenzen ähneln den ermittelten an der Goldscheibenelektrode hingegen sehr. Die optimale Hybridisierungstemperatur, gemessen an direkt beheizten Golddrahtelektroden, war im Vergleich mit der an den Goldscheibenelektroden ermittelten jedoch viel niedriger.

Ein ähnlicher Effekt wurde in einer Studie zur elektrochemischen Schmelzkurvenanalyse an einer Goldelektrodenoberfläche immobilisierter dsDNA beobachtet. In der Studie erfolgte die Hybridisierung bei konstanter Temperatur von 10 °C und innerhalb von 16 Stunden. Anschließend wurden die ACV-Signale bei unterschiedlichen Temperaturen gemessen. Dabei wurde eine deutliche Schmelztemperaturdifferenz von ca. 7 °C festgestellt, je nachdem, ob die ganze Lösung oder nur die indirekt geheizte Gold-LTCC (Low Temperature Cofired Ceramics)-Elektrode geheizt wurde [13].

In der vorliegenden Studie sind die Differenzen der optimalen Hybridisierungstemperaturen an den unterschiedlich beheizten Elektroden beträchtlich. Die Hybridisierungstemperatur, bei der das maximale SWV-Signal gemessen wird, wurde für die 810-Sequenz um 25 °C und für die SSIIb-Sequenz um 22 °C an der direkt beheizten Elektrode reduziert. Ein wesentlicher Unterschied zu der elektrochemischen Schmelzkurvenanalyse-Studie liegt darin, dass in der vorliegenden Arbeit die Hybridisierung bei unterschiedlichen Temperaturen und innerhalb von nur 15 Minuten erfolgte. D. h. hier konnten keine Gleichgewichtsbedingungen erreicht werden. Dies könnte ein Grund dafür sein, weshalb in der vorherigen Studie die Abnahme der Schmelztemperatur, gemessen an geheizter Elektrode, nur 7 °C betrug. In dieser Arbeit hingegen wird die Signalthöhe durch kinetische Parameter wie Massentransport zur und von der Elektrodenoberfläche beeinflusst.

Darüber hinaus, im Falle der Golddrahtelektroden, herrscht während der Hybridisierung ein Temperaturgradient zwischen der direkt geheizten Elektrode und der sie umgebenden Lösung.

Ein solcher Gradient kann Thermodiffusion hervorrufen, die einen erheblichen Einfluss auf den Massentransport der DNA-Moleküle hat [102]. Aufgrund einer zylindrischen Wärmeverteilung können beträchtliche Temperaturgradienten rund um den direkt geheizten Draht entstehen [113]. Anders verhält es sich im Falle der Scheibenelektroden, die mit Hilfe einer temperierten Lösung beheizt werden. Auch an der oben erwähnten indirekt geheizten Gold-LTCC-Scheibenelektrode sind die Temperaturgradienten aufgrund der planaren Wärmeverteilung niedriger [13].

Die Thermophorese von DNA-Molekülen hängt u. a. stark von der Temperatur ab. So wandern DNA-Moleküle bei 20 °C sowie bei höheren Temperaturen meistens in Richtung des kälteren Lösungsbereiches. Bei einer Temperaturdifferenz von lediglich 2 °C wurde eine signifikante Anreicherung von DNA an der kälteren Seite einer Lösung beobachtet [104].

Die Simulation des in dieser Studie verwendeten experimentellen Golddrahtelektroden-systems mit Hilfe von COMSOL Multiphysics ergab, dass sich die Temperaturdifferenz von 2 °C in ca. 5 µm Entfernung von der Golddrahtoberfläche befindet. Abbildung 29 zeigt den Temperaturverlauf als Funktion des Abstandes von der direkt geheizten Elektrode im stationären Zustand, entlang einer Radiallinie in x- und y-Richtung.

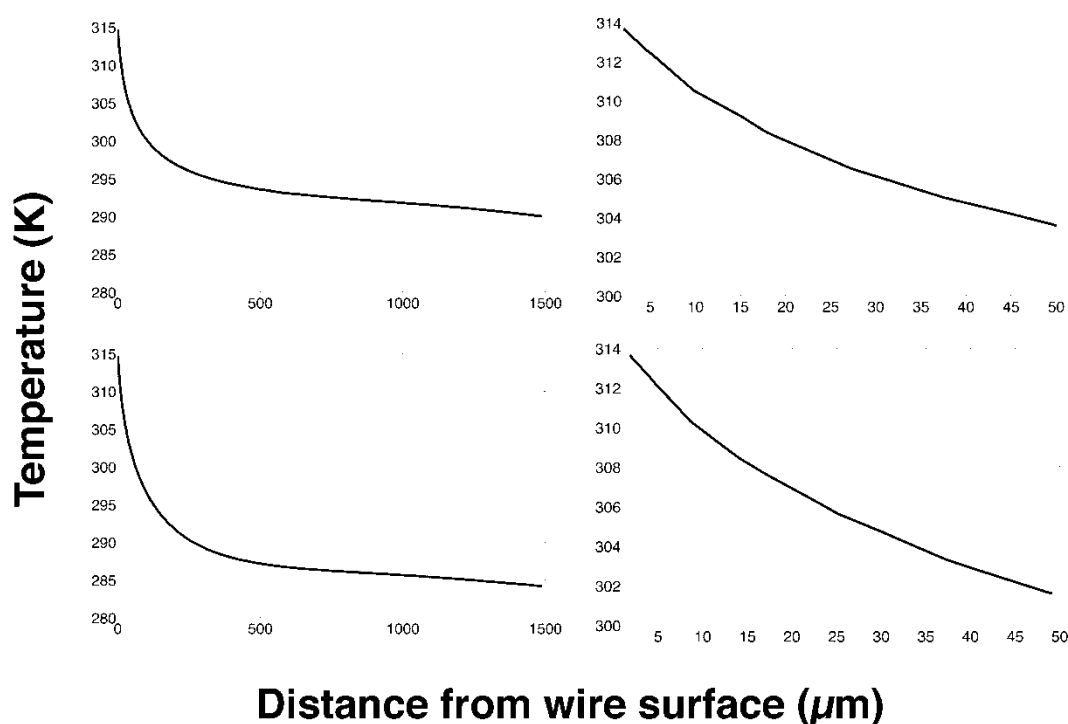


Abbildung 29: Temperatur als Funktion des Abstandes von der Oberfläche der direkt geheizten Elektrode im stationären Zustand, entlang einer Radiallinie in x- (unten) und y-Richtung (oben). Auf der rechten Seite ist die Vergrößerung der linken Seite zu sehen (übernommen mit Genehmigung von [94]).

Abbildung 30 verdeutlicht die gesamte Breite und Höhe, d. h. 3 mm x 3 mm eines detaillierten Modells einer Golddrahtelektrode in einem überlagerten Temperatur/Strömungsfeld-Konturdiagramm. In diesem System kann die Thermophorese nur lokal auftreten, das heißt in einem Lösungsbereich, in dem die Strömungsgeschwindigkeit durch thermische Konvektion entsprechend klein ist. Aus der Abbildung 31 geht hervor, dass die Geschwindigkeit in einer 5 μm Entfernung von der Drahtfläche, entlang der Radiallinie in y-Richtung, sehr niedrig ist. Unter diesen Bedingungen kann man in diesem Bereich von der Wirkung des positiven Soret-Effekts ausgehen. Dies bedeutet, dass sich die ungebundenen DNA-Stränge von der geheizten Golddrahtelektrode in Richtung des kälteren Lösungsbereiches wegbewegen. Dies kann zu den insgesamt kleineren SWV-Signalen führen, im Vergleich zu den an Scheibenelektroden gemessenen.

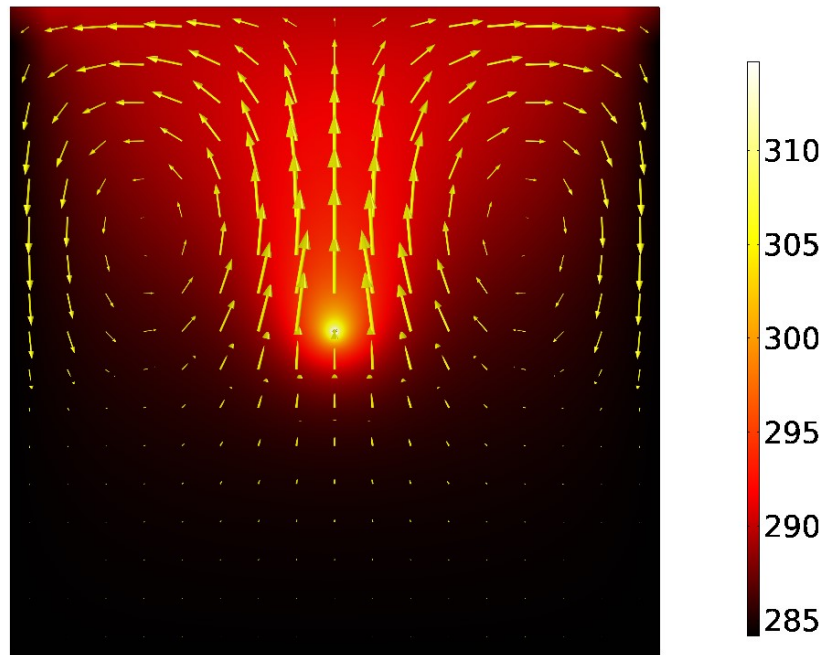


Abbildung 30: Konturdiagramm der Temperatur (K) überlagert mit dem Strömungsgeschwindigkeitsfeld einer Querschnittsfläche im stationären Zustand. Das Bild zeigt die gesamte Breite und Höhe, d. h. 3 mm x 3 mm, eines detaillierten Modells einer Golddrahtelektrode. Die Pfeile geben die Größe und Richtung der verschiedenen Strömungsgeschwindigkeiten (übernommen mit Genehmigung von [94]).

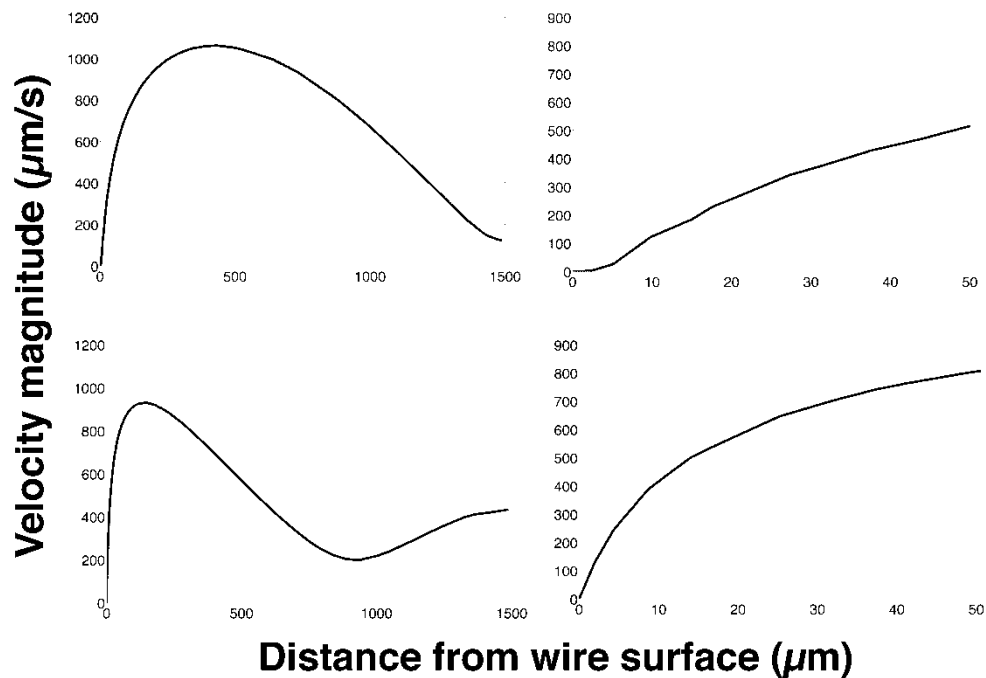


Abbildung 31: Strömungsgeschwindigkeit als Funktion des Abstandes von der Oberfläche der direkt geheizten Elektrode im stationären Zustand, entlang einer Radiallinie in x- (unten) und y-Richtung (oben). Die Querschnittsfläche entspricht der in Abbildung 30 abgebildeten. Auf der rechten Seite ist die Vergrößerung der linken Seite zu sehen (übernommen mit Genehmigung von [94]).

Die Situation sieht im Falle des Goldscheibenelektrodensystems ganz anders aus. Die Elektrode wird bei Raumtemperatur in eine geheizte Lösung eingetaucht. Es ist denkbar, dass innerhalb der ersten Sekunden der umgekehrte Temperaturgradient in der Nähe der Goldscheibenelektrodenoberfläche auftritt. Dies kann die Bewegung der DNA-Moleküle in Richtung der Elektrodenfläche verursachen, zumindest bis zu dem Moment, an dem die Elektrode die Temperatur der sie umgebenden Lösung annimmt. Die Simulationsergebnisse deuten darauf hin, dass anfangs ein solcher Gradient tatsächlich zustande kommt. Abbildung 32 zeigt den Temperaturverlauf für die Zeitspanne von 3 bis 11 Sekunden entlang einer 2 mm langen Linie, die sich von der Scheibenfläche in Richtung der Lösung erstreckt. Die Temperaturgradienten reichen von ca. 8 °C bis über 2 °C für die oben genannten Zeiten. Erst nach 11 bis 15 Sekunden wird das Temperaturgleichgewicht im ganzen System erreicht. Daher kann der Soret-Effekt in den ersten 10 Sekunden die Bewegung der DNA-Moleküle in Richtung zur Goldscheibenelektrode verursachen. Diese Anfangsanreicherung der Moleküle an der Elektrodenoberfläche kann zu den anfänglich erhöhten Hybridisierungsraten beitragen. Im Gegensatz zu den Golddrahtelektroden, treten in Goldscheibenelektrodennähe im stationären Zustand, keine Temperaturgradienten mehr auf (Abbildung 33). Dies bedeutet, dass keine Thermodiffusion der DNA von der Goldscheibenelektrodenoberfläche stattfindet, was auch zur Erklärung der unterschiedlich großen Signalstärken zwischen den beiden Systemen beitragen kann.

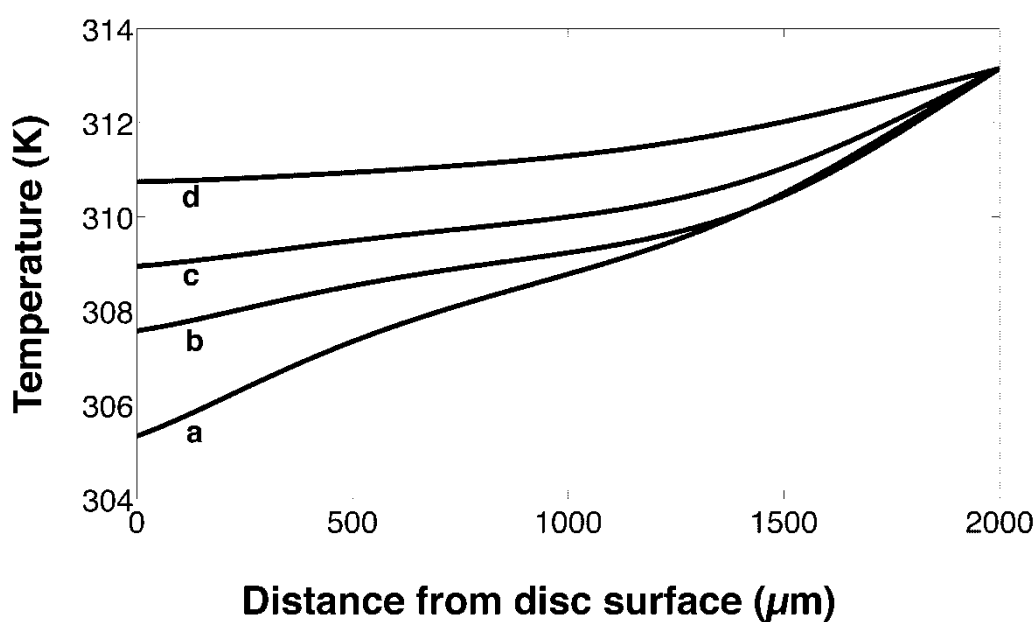


Abbildung 32: Temperaturverlauf entlang einer 2 mm langen Linie, die sich von der Goldscheibenfläche in Richtung der Lösung erstreckt, für die Zeiten von (a) 3, (b) 5, (c) 7 und (d) 11 Sekunden (übernommen mit Genehmigung von [94]).

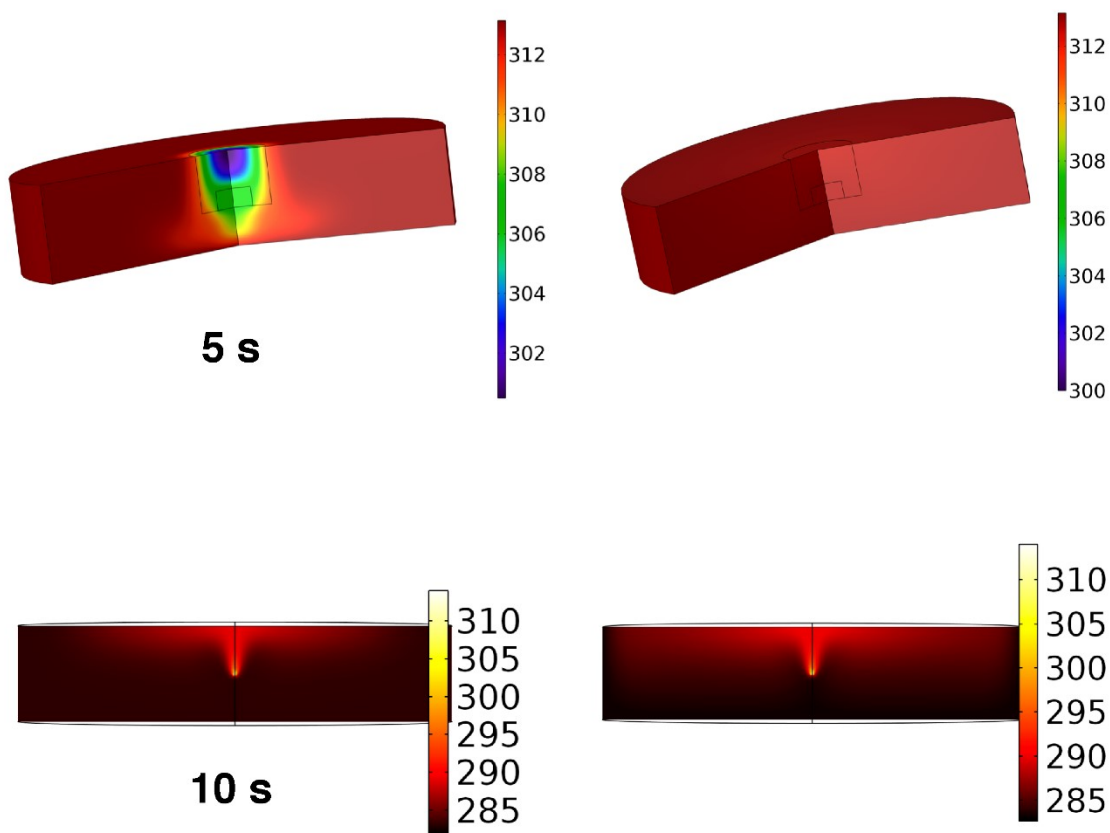


Abbildung 33: Temperaturprofile für ein grobkörniges Modell der Scheibenelektrode (oben) und der Golddrahtelektrode (unten) in der Lösung nach 5 bzw. 10 Sekunden (links) und im stationären Zustand (rechts) (übernommen mit Genehmigung von [94]).

5.4 Zusammenfassung

Während der Optimierung der Hybridisierungstemperatur für vier verschiedene MON810 Mais-Sequenzen wurde ein großer Einfluss der DNA-Sequenz auf die Kinetik der Strangverdrängung festgestellt. Drei von vier Sequenzen weisen sehr hohe Aktivierungsenergien bis zu 200 kJ/mol während einer kompetitiven Hybridisierungsreaktion auf. Die hohen Aktivierungsenergien werden dem Schutzstrangverdrängungsprozess durch die immobilisierte Sonde zugeschrieben. Eine deutlich niedrigere Aktivierungsenergie von 30-44 kJ/mol wurde für die 810-Sequenz beobachtet. Das 810-Target/Schutzstrang-Duplex beinhaltet u. a. ein Toehold sowie eine mittige Fehlpaarung, welche die Energiebarriere der Strangverdrängung beträchtlich reduzieren. Die temperaturabhängigen Hybridisierungskurven der 810-Sequenz unterscheiden sich von denen der übrigen untersuchten Sequenzen deutlich in ihrer Form. Die 810-Sequenz weist im Gegensatz zu anderen Sequenzen keinen sigmoidalen Kurvenverlauf auf. Darüber hinaus wurde im Vergleich mit anderen Sequenzen eine reduzierte maximale Signalintensität beobachtet (Abbildung 26). Dies deutet, neben der Strangverdrängung, auf das Zusammenwirken von anderen parallel ablaufenden sekundären Prozessen hin. Die DNA-Sequenzabfolge hat dabei einen Einfluss auf die sekundären Prozesse, wie die Diffusionsgeschwindigkeit.

Für die an Golddrahtelektroden untersuchten Sequenzen wurde die optimale Hybridisierungstemperatur, im Vergleich zu der an Goldscheibenelektroden gemessenen, im Durchschnitt um 23 °C reduziert. Des Weiteren war die Aktivierungsenergie höher und das voltammetrische Signal niedriger. Dies ist möglicherweise durch die DNA-Thermodiffusion verursacht, welche durch die steilen Temperaturgradienten rund um den direkt geheizten Golddraht hervorgerufen werden kann. Die Thermophorese beeinflusst wahrscheinlich die Kinetik des Strangverdrängungsprozesses und der Hybridisierung. Das mögliche Vorhandensein von Bedingungen für das Auftreten der Thermophorese konnte durch thermische Simulation mit Hilfe der numerischen Strömungsmechanik bestätigt werden.

6. Elektrochemisches Sandwich-Hybridisierungsassay für die Detektion von Einzelbasenfehlpaarungen

6.1 Einleitung

Die Vermeidung von zusätzlichen Probenvorbereitungsschritten, wie die Markierung des Targets im Vorfeld der DNA-Analyse, ist sehr wünschenswert. Dies erlaubt schneller und oft kostengünstiger zu arbeiten und macht die Anwendbarkeit des Biosensors zudem flexibler. Das in den vorherigen Kapiteln verwendete einfache Schutzstrangverdrängungsassay erfordert direkte Markierung des Targets, welche die Hybridisierung und anschließende Detektion einleitet. Dies verlangt eine bestimmte Zeitdauer bis die DNA analysiert werden kann. Das Sandwich-Hybridisierungsassay ermöglicht die DNA-Detektion mit Hilfe modifizierter Reporterstränge ohne die Notwendigkeit der Target-Markierung. Darüber hinaus kommt in diesem Assay die Sonde mit den elektroaktiven Reportersträngen in Abwesenheit des Targets in der Analysenlösung nicht in direkte Nähe. Dies ist von großem Vorteil, da es im Resultat zur Hintergrundsignalreduktion, erhöhter Verstärkung des Signals und oft zu beachtlichen Nachweisgrenzen führt [79]. Im Rahmen dieses Kapitels wird ein elektrochemisches Sandwich-Hybridisierungsassay für die Detektion von Einzelbasenfehlpaarungen unter Verwendung von $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ -markierten Reportersträngen beschrieben.

6.2 Experimentelles

6.2.1 Materialien

Für die Experimente mit Hilfe des Sandwich-Assays wurde eine CRY-Sonde verwendet. Diese wurde bereits im vorherigen Experiment untersucht und in Kapitel 5.2.1 beschrieben. Die neu konstruierten Target-, Reporter- und Schutzstrangsequenzen wurden von biomers.net GmbH (Ulm, Deutschland) synthetisiert. Der Schutzstrang verhindert die Modifizierung der Pyrimidinbasen an der Reporter-Erkennungsstelle während der Markierung der fünf terminalen ungeschützten Thyminbasen und beinhaltet fünf Fehlpaarungen gegenüber dem Reporter, um die spätere Schutzstrangverdrängung durch das Target während des Hybridisierungsschrittes zu begünstigen. In das sowohl zur Sonde- als auch zur Reporter-

Erkennungsstelle perfekt komplementäre Target (Target_CRY_FM) wurden C-C-Einzelbasenfehlpaarungen eingeführt: innerhalb der Sonde-Erkennungsstelle (Target_CRY_PSMM), innerhalb des Reporterabschnitts (Target_CRY_RSMM) und in beiden Abschnitten (Target_CRY_2MM). Die genauen Sequenzen sind im Folgenden dargestellt:

```

Sonde_CRY:      5'-AGATACCAAGCGGCCATGGACAACAAAAA [DTPA]3-3'
Schutzstrang:    3'-AAGGAACAGTTTCACCAAGAA-5'
Reporter:        5'-tttttTACGCTTGTCAAAGTGGTAGTA-3'

Target_CRY_FM:   3'-ATGCGAACAGTTTCACCATCATCCTCTTTTCTATGGTTCGCCGGTACCTGTGTTTTT-5'
                  5'-tttttTACGCTTGTCAAAGTGGTAGTA      AGATACCAAGCGGCCATGGACAACAAAAA [DTPA]3-3'

Target_CRY_PSMM: 3'-ATGCGAACAGTTTCACCATCATCCTCTTTTCTATCGTTCGCCGGTACCTGTGTTTTT-5'
                  5'-tttttTACGCTTGTCAAAGTGGTAGTA      AGATACCAAGCGGCCATGGACAACAAAAA [DTPA]3-3'

Target_CRY_RSMM: 3'-ATCCGAACAGTTTCACCATCATCCTCTTTTCTATGGTTCGCCGGTACCTGTGTTTTT-5'
                  5'-tttttTACGCTTGTCAAAGTGGTAGTA      AGATACCAAGCGGCCATGGACAACAAAAA [DTPA]3-3'

Target_CRY_2MM:  3'-ATCCGAACAGTTTCACCATCATCCTCTTTTCTATCGTTCGCCGGTACCTGTGTTTTT-5'
                  5'-tttttTACGCTTGTCAAAGTGGTAGTA      AGATACCAAGCGGCCATGGACAACAAAAA [DTPA]3-3'

```

Mit Kleinbuchstaben „t“ werden die fünf mit $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ zu markierenden Thyminbasen bezeichnet und die Kleinbuchstaben „a“ am 3'-Ende des Sondenstrangs stehen für die zusätzlichen zehn Adeninbasen, die in diesem Assay als Spacer dienen. Die Fehlpaarungen sind mit Unterstrich gekennzeichnet.

Alle elektrochemischen Messungen wurden, wie in den vorherigen Experimenten beschrieben, mittels einer Dreielektrodenanordnung durchgeführt. Die hier verwendete Goldscheibenelektrode hatte einen Durchmesser von 3 mm. Für die voltammetrischen Messungen wurde ein μ Autolab III der Firma Ecochemie B.V. (Utrecht, Netherlands) benutzt.

6.2.2 Vorbereitung des Reporters

Die Markierung des Reporters erfolgte analog zur Markierung des Targets in den beiden zuvor beschriebenen Experimenten. Dabei wurde der Reporter durch einen partiell komplementären Schutzstrang geschützt. Dafür wurden Reporter- und Schutzstrang-Lösung für zwei Stunden bei Raumtemperatur zusammengegeben, um die Hybridisierung zu ermöglichen. Anschließend wurde 10 mM $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ -Lösung zugegeben, um die fünf ungeschützten Thyminbasen des Reporterstrangs zu markieren. Nach zwei Stunden Inkubation wurde der überschüssige Komplex durch Dialyse aus der Analysenlösung entfernt.

6.2.3 Vorbereitung der modifizierten Elektrode

Zur Herstellung der SONDENSCHICHT auf der Elektrodenoberfläche wurde die letztere zunächst mechanisch auf einem Polierpad mit Aluminiumoxidpulver mit einer Korngröße von 0.3 μm (Buehler, Deutschland) und anschließend elektrochemisch mit Hilfe der CV (25 Scans, von -0.3 bis 1.7 V, Scan Rate 100 mV/s) in 0.5 M H_2SO_4 poliert. Danach wurde die 30 μM Sondenlösung in 10 mM TRIS-Puffer und 0.5 M Na_2SO_4 (pH 7.5) auf die vorbehandelte Goldscheibenelektrode aufgebracht und über Nacht in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre inkubiert. Im Anschluss wurde die Elektrode für eine Stunde in eine 1 mM MCH-Lösung eingetaucht, um eine geordnete ssDNA-SAM-Schicht auszubilden.

6.2.4 Hybridisierungsschritt und elektrochemische Messungen

Das im Rahmen dieser Studie verwendete Sandwich-Hybridisierungsassay ist in Abbildung 34 schematisch dargestellt. In diesem Assay hybridisieren die immobilisierte Sonde und der markierte Reporter spezifisch jeweils mit einem komplementären Sequenzteil des Targets. Im Gegensatz zu dem Strangverdrängungsassay zur SNP-Detektion (Kapitel 4), wo die Schutzstrangverdrängung durch eine Sonde ausschließlich an der Elektrodenoberfläche stattfindet, wird der Schutzstrang in diesem Fall vorzugsweise in der Lösung durch das Target verdrängt.

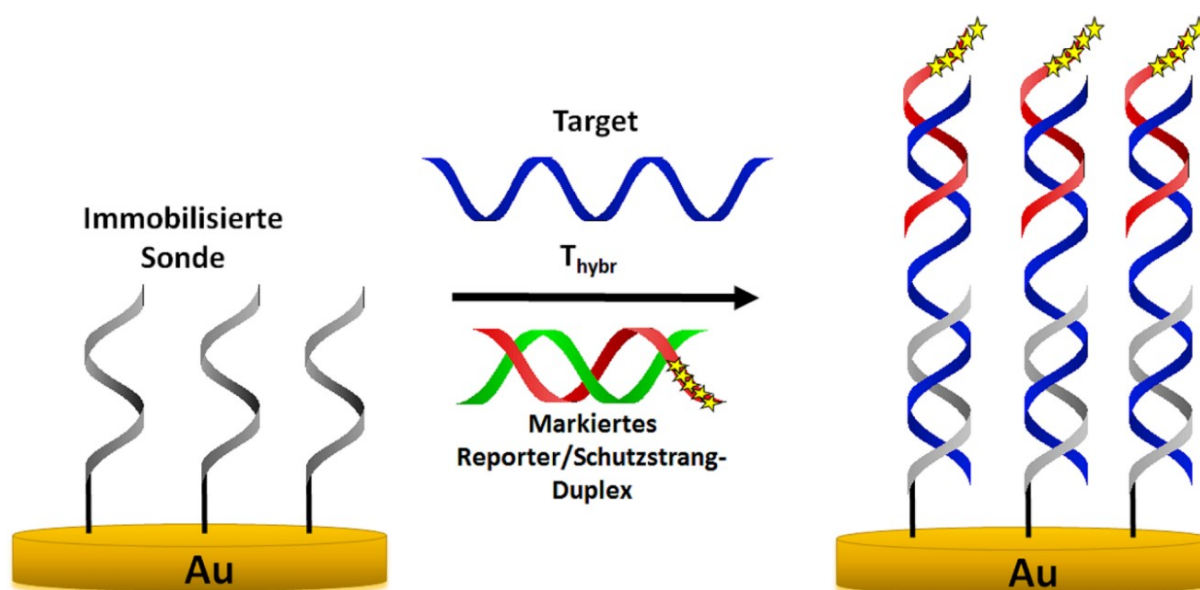


Abbildung 34: DNA-Detektionsverfahren unter Verwendung von Reportersträngen.

Während des Hybridisierungsschrittes wurde eine mit ssDNA-SAM modifizierte Goldscheibenelektrode für 45 Minuten in eine temperierte Lösung von 10 mM TRIS-Puffer, 0.5 M Na_2SO_4 und äquimolarer Konzentration des Targets und des markierten Reporter/Schutzstrang-Duplex eingetaucht. Die Lösung wurde mit Hilfe eines mit Wasser temperierbaren doppelwandigen Glasgefäßes und eines Kälte-/Wärmethermostats (Kryostat) Anova, Model R10 (Houston, TX USA) thermostatiert und mit einem Magnetrührer gerührt. Nach der Hybridisierung wurde die Elektrode mit TRIS-Puffer/ Na_2SO_4 -Lösung gespült, um die unspezifisch adsorbierte DNA zu verdrängen. Anschließend wurde die Elektrode in eine elektrochemische Zelle mit TRIS-Puffer/ Na_2SO_4 -Lösung eingetaucht. Hier erfolgte die SWV-Messung wie in Kapitel 4.2.4 bereits beschrieben. Nach der Messung

wurde die Elektrode für 60 Sekunden in 50 °C warmes Wasser getaucht, um das Target mit dem markierten Reporter von der immobilisierten Sonde zu trennen. Nach der Dehybridisierung und der darauffolgenden Messung des Blank-Signals wurde die Elektrode für weitere Hybridisierungen und anschließende Messungen verwendet. Die peakförmigen voltammetrischen Signale wurden mittels GPES 4.9-Software (Ecochemie B.V.) nach Savitzky und Golay geglättet und Baseline korrigiert. Je drei separate Hybridisierungsserien wurden für jede Targetsequenz aufgenommen.

6.2.5 UV-VIS Spektroskopische Messungen

Alle spektroskopischen Messungen wurden mittels eines CARY 300 Scan UV-Visible Spektrophotometers (Agilent Technologies) bei einer Wellenlänge von 260 nm, einer spektralen Bandbreite von 1 nm, 2 s average time, einem Datenintervall von 1 °C und 1 °C/min rate time durchgeführt. Der Temperaturscan wurde von 20 °C bis 90 °C vor- und rückwärts durchgeführt. Die Messungen erfolgten mit 1 ml Lösung von 10 mM TRIS-Puffer, 0.5 M Na₂SO₄ und 500 nM Reporter/Target-, Sonde/Target- oder Sonde/Reporter/Target-Duplex (ohne [DTPA]₃-Linker). Die Schmelztemperatur wurde aus dem Peak-Maximum der ersten Ableitung der Schmelzkurve mit Hilfe der Cary WinUV Software (Thermal Application) berechnet.

6.3 Ergebnisse und Diskussion

Für das perfekt komplementäre Target wurde eine Konzentrationsstudie bei einer Hybridisierungstemperatur von 50 °C durchgeführt. Wie man der Abbildung 35 entnehmen kann, ist die Sättigung der Elektrode bereits bei 75 nM äquimolarer Konzentration des Targets und des markierten Reporter/Schutzstrang-Duplex erreicht. Für die weiteren Untersuchungen bei verschiedenen Temperaturen wurde daher die Konzentration von 75 nM ausgewählt.

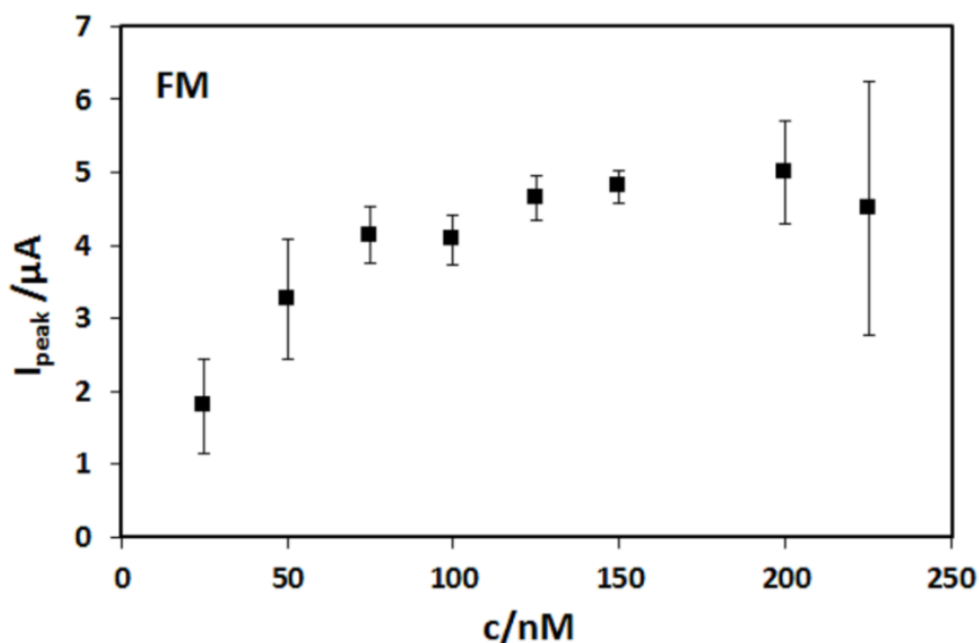


Abbildung 35: Einfluss der äquimolaren Konzentration des FM-Targets und des markierten Reporter/Schutzstrang-Duplex auf die SWV-Signale nach einer Hybridisierungszeit von 45 Minuten bei 50 °C.

In Abbildung 36 ist das thermische Hybridisierungsverhalten von vier Targets: FM, PSMM, RSMM und 2MM dargestellt. Die Zielsequenzen unterscheiden sich in der Anzahl und Lage der Cytosin-Cytosin-Basenfehlpaarungen gegenüber der Sonde und dem Reporterstrang (Abbildung 37). Die Abkürzungen stehen für ein perfekt komplementäres Target (FM - Full Match), ein Target mit einer Basenfehlpaarung innerhalb der Sonde-Erkennungsstelle (PSMM - Probe Single Mismatch), ein Target mit einer Fehlpaarung innerhalb des Reporterabschnitts (RSMM - Reporter Single Mismatch) und ein Target mit einer Fehlpaarung jeweils im Sonden- und Reporterbereich (2MM - 2 Mismatches).

Wie man der Abbildung 36 entnehmen kann, weist das perfekt komplementäre Target die höchsten SWV-Signale in einem breiten Temperaturbereich auf. Die Differenzierung des FM-Targets von allen fehlgepaarten Zielsequenzen ist im Temperaturbereich zwischen 50 °C und 70 °C möglich. Die RSMM- und 2MM-Targets liefern dabei die niedrigsten voltammetrischen Signale bei allen untersuchten Temperaturen, was eine deutliche Differenzierung zwischen dem perfekt komplementären und den im Reporterbereich fehlgepaarten Targets zulässt.

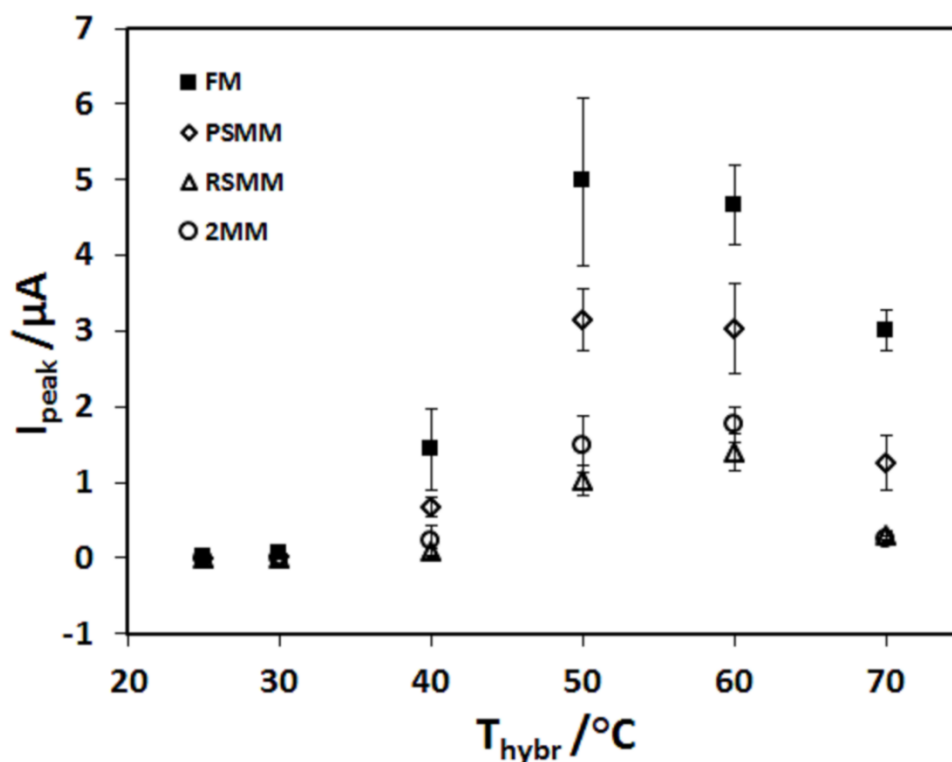


Abbildung 36: Einfluss der Hybridisierungstemperatur auf die SWV-Signale von vier Zielsequenzen, die sich in der Anzahl und Lage der Fehlpaarungen gegenüber der Sonde und dem Reporterstrang unterscheiden. Die 45-minütige Hybridisierung erfolgte auf einer Goldscheibenelektrode, die in eine Lösung von 75 nM Target und 75 nM Reporter/Schutzstrang-Duplex eingetaucht wurde. Während des Hybridisierungsschrittes wurde die Lösung geheizt und mit einem Magnetrührer gerührt. Die Fehlerbalken zeigen Standardabweichungen der drei unabhängigen Messungen mit einer neu immobilisierten Sonde.

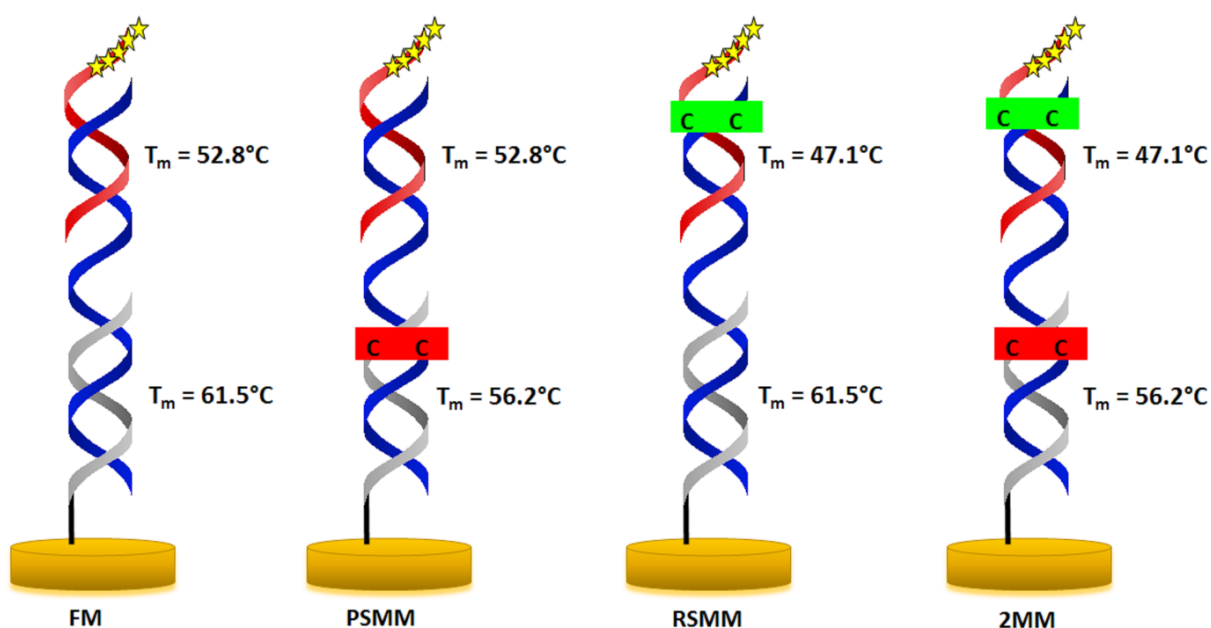


Abbildung 37: Verteilung der Fehlpaarungen innerhalb der Targetsequenzen und die entsprechenden geschätzten Schmelztemperaturen der an der Elektrodenoberfläche immobilisierten Doppelstränge.

Die relativ niedrigen SWV-Signale im Temperaturbereich von 20 °C bis ca. 40 °C, für alle vier Zielsequenzen, lassen sich mit einem hohen Schmelztemperaturwert des Reporter/Schutzstrang-Duplex gegenüber den Schmelztemperaturen anderer Doppelstränge innerhalb des Assays erklären.

Das Reporter/Schutzstrang-Duplex liegt in Lösung vor, während die durch erfolgreiche Hybridisierung entstehenden Doppelstränge zwischen dem Target und der Sonde sowie dem Target und dem Reporterstrang an der Elektrodenoberfläche immobilisiert sind. Dabei können die zwei doppelsträngigen Teile des Targets, aufgrund der Lücke von 8 bp zwischen der Reporter- und Sonde-Erkennungsstelle, als zwei unabhängige Doppelstränge betrachtet werden.

Nach Zhou et al. und Peterlinz et al. werden die immobilisierten Doppelstränge, im Vergleich zu den frei in der Lösung befindlichen, deutlich destabilisiert. Der genaue Unterschied zwischen der Schmelztemperatur eines ungebundenen Duplex und der T_m eines an der Oberfläche immobilisierten Doppelstrangs hängt von der Na^+ -Konzentration, der Sondendichte an der Elektrodenoberfläche sowie möglicherweise von der Sequenzabfolge [76, 114] ab.

Die Schmelztemperaturen der Doppelstränge, gemessen mittels UV-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer homogenen Lösung, sind Tabelle 6 zu entnehmen. In der Tabelle 7 sind die geschätzten Schmelztemperaturwerte dargestellt, die mittels des „two-state melting (hybridization)“-Moduls von DINAMelt Applikation des UNAFold Web-Servers (<http://unafold.rna.albany.edu/>) berechnet und durch Subtraktion von 20 °C annähernd den Bedingungen auf der Oberfläche angepasst wurden. Für das Reporter/Schutzstrang-Duplex wurde die lösungsbasierte Schmelztemperatur berechnet. Aus Tabelle 7 und Abbildung 37 geht hervor, dass der an der Elektrodenoberfläche immobilisierte, fehlgepaarte Reporter/Target-Doppelstrang die niedrigste T_m (von ca. 47 °C) von allen Doppelsträngen innerhalb des Sandwich-Assays aufweist. Die Schmelztemperatur des sich in Lösung befindenden Reporter/Schutzstrang-Duplex ist dabei um ca. 9 °C höher. Daher liefern die beiden Targets mit einer Basenfehlpaarung im Reporterbereich, nämlich RSMM und 2MM, die niedrigsten Signale.

Da das Reporter/Schutzstrang-Duplex erst bei einer Temperatur von über 50 °C schmilzt, kann die Hybridisierung des Reporterstrangs mit einem Target erst bei ca. 50 °C erfolgen. Das erklärt die deutliche Erhöhung des Signals aller Zielsequenzen bei 50 °C im Vergleich mit der Signalthöhe bei 40 °C.

Ab ca. 60 °C nimmt die Signalthöhe aller untersuchten Targetsequenzen ab (Abbildung 36). Dies ist auf das Schmelzen des Sonde/Target-Duplex zurückzuführen und stimmt mit den berechneten Schmelztemperaturwerten der immobilisierten Sonde/Target-Doppelstränge überein.

CRY Duplex	T _m (°C)
Sonde/Target FM	81.395
Reporter/Target FM	72.72
Sonde/Target PSMM	77.995
Reporter/Target RSMM	68.995
Sonde/Target FM/Reporter	81.5 & 74.06
Sonde/Target 2MM/Reporter	78.52 & 69.05

Tabelle 6: Schmelztemperaturwerte der Assay-Doppelstränge, gemessen in einer Lösung mittels UV-Spektroskopie bei 260 nm.

CRY Duplex	T _m (°C)
Sonde/Target FM	61.5*
Reporter/Target FM	52.8*
Sonde/Target PSMM	56.2*
Reporter/Target RSMM	47.1*
Reporter/Schutzstrang	56.0

Tabelle 7: Die berechneten Schmelztemperaturwerte der Assay-Doppelstränge. Die Werte von T_m mit * stehen für die Schmelztemperaturen der immobilisierten Doppelstränge, die bei einer Konzentration von 1 µM berechnet und den Bedingungen auf der Oberfläche angepasst wurden. Die T_m ohne * steht für eine lösungsbasierte Schmelztemperatur des Reporter/Schutzstrang-Duplex, die bei der in den Experimenten verwendeten Konzentration von 75 nM berechnet wurde.

Abbildung 38 zeigt eine repräsentative Signalantwort nach einer Hybridisierung der Sonde mit den perfekt und partiell komplementären Targets (FM, PSMM, 2MM, RSMM), mit einem nicht komplementären Target sowie mit dem markierten Reporter/Schutzstrang-Duplex in Abwesenheit des Targets in der Analysenlösung bei einer Hybridisierungstemperatur von 50 °C. Wie in der Abbildung zu erkennen ist, sind die aus der unspezifischen Adsorption resultierenden Signale relativ klein und leicht nach links verschoben.

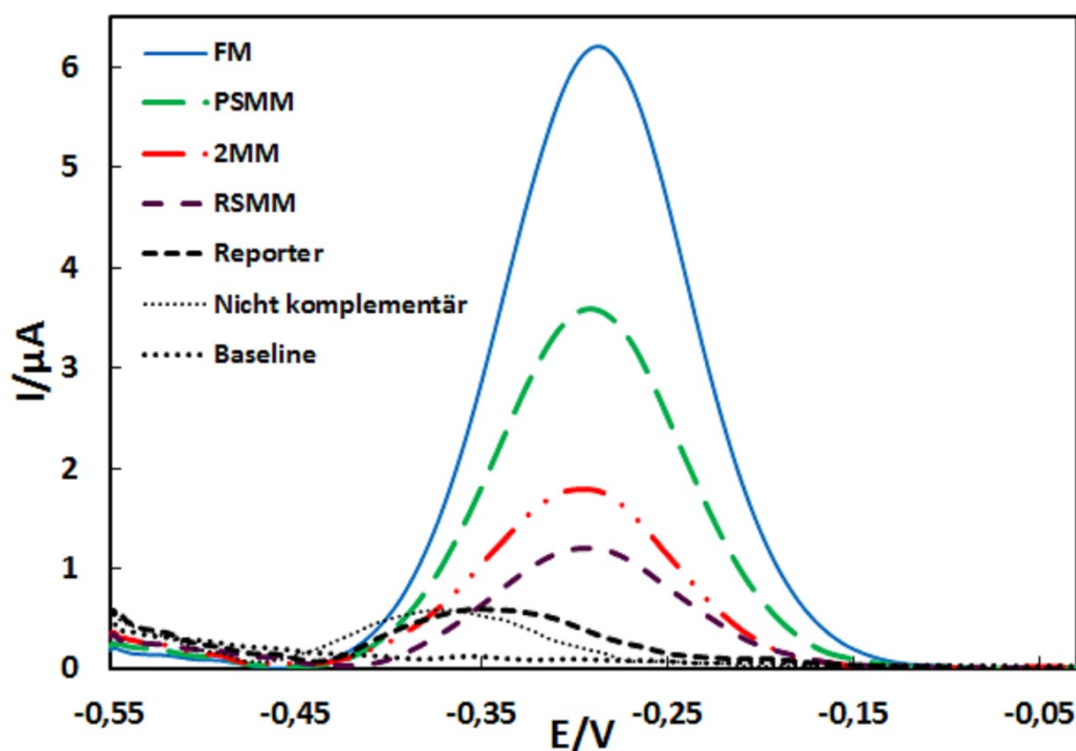


Abbildung 38: SWV-Signale erhalten nach einer 45-minütigen Hybridisierung der Sonde mit dem FM-, PSMM-, 2MM- und RSMM-Target; mit Reporter in Abwesenheit des Targets und mit einem nicht komplementären Target bei 50 °C. Signale wurden mit Savitzky-Golay-Filter geglättet, anschließend folgte eine Basislinienkorrektur.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse lässt sich feststellen, dass das Schutzstrang-Design eine entscheidende Rolle für die Leistung des Sandwich-Assays spielt. Der Schutzstrang muss nämlich durch das Target verdrängt werden, das ein stabileres Duplex mit dem Reporterstrang bildet. Um die maximale Hybridisierungseffizienz zu erreichen, soll die lösungsbasierte Schmelztemperatur des Reporter/Schutzstrang-Doppelstrangs niedriger sein als die der immobilisierten Sonde/Target- und Reporter/Target-Doppelstränge. Ein Design des Reporter/Schutzstrang-Duplex mit einem niedrigeren T_m -Wert könnte höhere Signale bereits bei niedrigeren Temperaturen (unterhalb von 50 °C) und bei reduzierten Hybridisierungszeiten gewährleisten.

Für die bestmögliche Target-Differenzierung, scheint der Reporterbereich eine gute Position für die Platzierung der untersuchten Basenfehlpaarung zu sein. Dabei soll die T_m des Sonde/Target-Duplex höher sein als die des Reporter/Target-Doppelstrangs, wie in dem oben beschriebenen Experiment.

6.4 Zusammenfassung

Das Sandwich-Hybridisierungsassay ermöglicht die DNA-Detektion mit Hilfe redoxmarkierter Reporterstränge ohne die Notwendigkeit direkter Modifizierung des Targets. Zum ersten Mal wurde das Markierungsverfahren unter Verwendung von Schutzsträngen eingesetzt, um die $[\text{OsO}_4(\text{bipy})]$ -markierten Reporterstränge herzustellen.

Eine gute Differenzierung des perfekt komplementären Targets von den fehlgepaarten Zielsequenzen konnte im Temperaturbereich von 50 °C bis 70 °C erreicht werden. Die RSMM- und 2MM-Targets, die eine Fehlpaarung in der Reporter-Erkennungsstelle beinhalten und die niedrigste Schmelztemperatur im Reporterbereich aufweisen, liefern die kleinsten Signale bei allen untersuchten Temperaturen, was die stärkste Differenzierung zwischen dem perfekt komplementären und den im Reporterbereich fehlgepaarten Targets ermöglicht.

Die Schmelztemperaturen von DNA-Doppelsträngen innerhalb eines Hybridisierungsassays beeinflussen die Sensorleistung beträchtlich und sollten für das optimale Assay-Design in Betracht gezogen werden. Dabei müssen ebenfalls die destabilisierenden Effekte, die mit der DNA-Immobilisierung an der Elektrodenoberfläche verbunden sind und die daraus resultierende Abnahme der Schmelztemperatur, berücksichtigt werden.

Die in dieser Studie vorgestellten Ergebnisse stellen eine Grundlage für die Optimierung des beschriebenen Sandwich-Assay-Designs dar, welche in einem gesteigerten SWV-Signal und verbesserter Sensitivität gegenüber den Einzelbasenfehlpaarungen bereits bei niedrigeren Temperaturen und bei reduzierten Hybridisierungszeiten resultieren kann.

7. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Dissertation wurde der Einfluss erhöhter Temperaturen und der DNA-Sequenzabfolge auf die Kinetik von Strangverdrängungsprozessen untersucht und beschrieben.

So konnte eine extreme Beschleunigung von Strangverdrängungsreaktionen mit hohen Aktivierungsenergien bei erhöhten Temperaturen gezeigt werden. Die voltammetrischen Signale wurden bei Erhöhung der Hybridisierungstemperatur von 25 °C auf 62.5 °C bis zu 319-mal größer.

Darüber hinaus ist es gelungen Einzelbasenvariationen in DNA-Oligonukleotiden mit Hilfe zweier unterschiedlicher Hybridisierungsassay-Designs erfolgreich voneinander zu differenzieren. Die Hybridisierungsvorgänge komplementärer und einzelfehlgepaarter Targets an immobilisierte Sonden wurden hierbei mittels Square-Wave-Voltammetrie detektiert. Die Differenzierung war vorwiegend durch Anwendung erhöhter Temperaturen und kompetitiver Effekte während der Strangverdrängungsreaktionen möglich. Die kompetitiven Effekte ließen sich u. a. durch Variation von Anzahl, Art und Lage der Fehlpaarungen in den konkurrierenden Doppelsträngen beeinflussen. Die Einbeziehung einer zusätzlichen, mittigen Fehlpaarung bzw. eines Toeholds in einem Schutzstrang/Target-Doppelstrang beschleunigte die Strangverdrängung deutlich.

Unter Verwendung des optimierten kompetitiven Schutzstrangverdrängungsassays konnten die SNP-Targetsequenzen in einem breiten Temperaturbereich unabhängig von der Art der Basenfehlpaarung voneinander unterschieden werden. Dies erfolgte unter Verwendung von einfachen, linearen Sonden ohne die Notwendigkeit des Einsatzes der oft bei der SNP-Detektion eingesetzten elektrochemischen Molecular Beacons mit dem ungünstigen ON/OFF-Modus [80] bzw. der komplizierten Molecular Beacon-Strukturen im OFF/ON-Modus [82, 115].

Mit Hilfe markierter Reporterstränge in einem Sandwich-Hybridisierungsassay war es möglich Einzelbasenfehlpaarungen in den DNA-Sequenzen ohne die Notwendigkeit der Target-Markierung zu detektieren. Der Vorteil dieser Methode gegenüber dem Signaloligo-Verfahren liegt ebenfalls in dem OFF/ON-Modus. Das kompetitive Hybridisierungsassay

unter Verwendung von Signaloligos beruht nämlich, im Gegensatz zu dem Sandwich-Assay, auf einer Signalabnahme, die aufgrund der Verdrängung des an der immobilisierten Sonde hybridisierten und Osmium-modifizierten Signal-Oligonukleotids durch ein unmarkiertes Target, erfolgt [116].

Während der Temperaturoptimierung für die Strangverdrängungsreaktionen wurde weiterhin festgestellt, dass die Schmelztemperaturdifferenzen zwischen den konkurrierenden Doppelsträngen innerhalb eines Hybridisierungsassays eine entscheidende Rolle für die Sensorleistung spielen. Für das optimierte Assay-Design müssen bei der Berechnung der T_m -Differenzen die destabilisierenden Effekte, die mit der DNA-Immobilisierung an der Elektrodenoberfläche verbunden sind und die daraus resultierende Herabsetzung der Schmelztemperatur eines immobilisierten Doppelstrangs [13, 76], berücksichtigt werden.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse stellen eine Grundlage für die weiteren Optimierungen beider studierter Hybridisierungsassays dar. Vor allem das Sandwich-Assay sollte bzgl. seiner Sensitivität gegenüber weiteren Basenfehlpaarungen untersucht werden. Weiterhin ist die Detektion von Fehlpaarungen unter Verwendung eines optimal konstruierten Schutzstrangs für beide Assays auch bei deutlich niedrigeren Temperaturen denkbar. Die gewonnenen Ergebnisse sollen weiterhin auf reale Proben übertragen werden.

Es wurden ebenfalls die Effekte von Temperaturgradienten in der Elektrodennähe direkt und indirekt geheizter Elektroden auf den Hybridisierungsprozess beschrieben. Diese Ergebnisse sind insbesondere im Hinblick auf die DNA-Detektion mit Hilfe der angestrebten direkt geheizten elektrochemischen Microarrays relevant. Zukünftig könnten mehrere DNA-Sequenzen parallel an unterschiedlichen Elektroden auf einem DNA-Chip auf verschiedene Temperaturen geheizt und somit bei optimalen Temperaturen detektiert werden. Durch Anwendung von PCR-Fluidikchips könnte die Vervielfältigung sowie darauffolgende Detektion kombiniert und dadurch weitestgehend miniaturisiert werden [117, 118].

8. Danksagung

Ich möchte mich an erster Stelle bei Prof. Dr. rer. nat. habil. Gerd-Uwe Flechsig für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe sowie für die Möglichkeit zur Promotion bedanken. Insbesondere möchte ich mich für die Ermöglichung eines einjährigen Forschungsaufenthaltes an der SUNY at Albany in den USA bedanken. Dieser war sowohl in wissenschaftlicher als auch kultureller Hinsicht äußerst wertvoll.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Falko Wachholz für seine motivierende Unterstützung sowie Geduld beim Korrekturlesen bedanken.

PhD Ada Sedova danke ich für die wertvollen fachlichen Diskussionen sowie für die Durchführung der Simulation im Rahmen der Publikation „Sequence and Temperature Influence on Kinetics of DNA Strand Displacement at Gold Electrode Surfaces“ ACS Appl Mater Interfaces, 2015;7(36):19948-19959, welche ein Bestandteil dieser Dissertation ist.

Christoph Herz danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und freundschaftliche Zusammenarbeit während des EXIST-Projektes.

Des Weiteren möchte ich mich bei Xiaoqi Ni für die Vorarbeiten zum Experiment mit Sandwich-Hybridisierungsassay bedanken.

Großer Dank gilt meiner Familie und Freunden (insbesondere Thomas, Björn und Liisa), die während meiner Promotionszeit für mich da waren und in der Freizeit für viel Abwechslung gesorgt haben.

9. Literaturverzeichnis

- ¹ Lander E. S., Linton L. M., Birren B., Nusbaum C., Zody M. C., Baldwin J., et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822):860-921.
- ² Venter J. C., Adams M. D., Myers E. W., Li P. W., Mural R. J., Sutton G. G., et al. The Sequence of the Human Genome. *Science*. 2001;291(5507):1304-1351.
- ³ Salzberg S. The Human Genome Project; lecture from online course: Introduction to Genomic Technologies, authorized by John Hopkins University and offered through Coursera. Available from: <https://www.coursera.org/learn/introduction-genomics/lecture/ykjod/the-human-genome-project>.
- ⁴ Lapitan L. D. Jr., Guo Y., Zhou D. Nano-enabled bioanalytical approaches to ultrasensitive detection of low abundance single nucleotide polymorphisms. *Analyst*. 2015;140(12):3872-3887.
- ⁵ Balogh M. K. Forensisch relevante SNP-Genotypisierung mittels elektronischer Microarray-Technologie [Dissertation]: Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz; 2008.
- ⁶ Holzapfel B., Wickert L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biol. Unserer Zeit*. 2007;37(2):120-126.
- ⁷ Fuxius S. M., Lisdat F. Der DNA auf der Spur - elektrochemische DNA-Sensoren. *Laborpraxis.vogel.de*; [cited 2008 Aug 21]. Available from: <http://www.laborpraxis.vogel.de/bioanalytik-pharmaanalytik/articles/139687/>.
- ⁸ Wang J. Electrochemical biosensors: towards point-of-care cancer diagnostics. *Biosens Bioelectron*. 2006;21(10):1887-1892.
- ⁹ Flechsig G.-U., Peter J., Hartwich G., Wang J., Gründler P. DNA Hybridization Detection at Heated Electrodes. *Langmuir*. 2005;21(17):7848-7853.
- ¹⁰ Flechsig G.-U., Reske T. Electrochemical Detection of DNA Hybridization by Means of Osmium Tetroxide Complexes and Protective Oligonucleotides. *Anal. Chem*. 2007;79(5):2125-2130.
- ¹¹ Nasef H., Beni, V., O'Sullivan C. K. Electrochemical melting-curve analysis. *Electrochem. Commun*. 2010;12(8):1030–1033.
- ¹² Luo X., Hsing I. M. Real Time Electrochemical Monitoring of DNA/PNA Dissociation by Melting Curve Analysis. *Electroanalysis*. 2009;21(14):1557-1561.
- ¹³ Surkus A.-E., Flechsig G.-U. Electrochemical Detection of DNA Melting Curves by Means of Heated Biosensors. *Electroanalysis*. 2009;21(10):1119-1123.
- ¹⁴ Shen Z., Sintim H. O., Semancik S. Rapid nucleic acid melting analyses using a microfabricated electrochemical platform. *Anal Chim Acta*. 2015;853:265-270.
- ¹⁵ Yang A. H. J., Hsieh K., Patterson A. S., Ferguson B. S., Eisenstein M., Plaxco K. W., Soh H. T. Accurate Zygote-Specific Discrimination of Single-Nucleotide Polymorphisms Using Microfluidic Electrochemical DNA Melting Curves. *Angew Chem Int Ed*. 2014;53(12):3163-3167.
- ¹⁶ Jacobi B., Partovi S. *Molekulare Zellbiologie*. Elsevier GmbH, München; 2011: 46.
- ¹⁷ Geppert M. Hierarchische Y-SNP Analyse: Phylogeographische Daten für die forensische Praxis und populationsgenetische Forschung [Dissertation]: Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin; 2014: 2.
- ¹⁸ Watson J., Baker T., Bell S., Gann A., Levine M., Losick R. *Watson Molekularbiologie*. 6., aktualisierte Auflage, Pearson Studium, München; 2011. Abbildung 3: S. 130 und Abbildung 8: S. 143.

- ¹⁹ McMurry J. *Chemia organiczna* 5. 2. Auflage, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa; 2003: 1146.
- ²⁰ https://en.wikipedia.org/wiki/File:A-DNA,_B-DNA_and_Z-DNA.png
- ²¹ Horton H. R., Moran L. A., Scrimgeour K. G., Perry M. D., Rawn J. D. *Biochemie*. 4., aktualisierte Auflage, Pearson Studium; 2008.
- ²² Calladine C. R., Drew H. R., Luisi B. F., Travers A. A. *Understanding DNA, The Molecule & How It Works*. Third Edition, Elsevier Ltd.; 2004. Abbildung 6: S. 306.
- ²³ Kool E. T. Hydrogen Bonding, Base Stacking, and Steric Effects in DNA Replication. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2001;30:1–22.
- ²⁴ Janning W., Knust E. *Genetik: Allgemeine Genetik - Molekulare Genetik - Entwicklungsgenetik*. Georg Thieme Verlag; 2004: 136-137.
- ²⁵ Garrett R. H., Grisham C. M. *Biochemistry*. Fourth Edition, Brooks/Cole, Cengage Learning; 2010: 331.
- ²⁶ Nasef H., Beni V., O'Sullivan C. K. Labelless electrochemical melting curve analysis for rapid mutation detection. *Anal Methods*. 2010;2(10):1461–1466.
- ²⁷ Löffler G. *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. 6. Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2005: 341.
- ²⁸ Hennig W. *Genetik*. Dritte, überarbeitete und erweiterte Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York; 2002: 508.
- ²⁹ Nordheim A., Knippers R. *Molekulare Genetik*. 10., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York; 2015: 94.
- ³⁰ <http://www.atdbio.com/content/15/Mutagenesis-and-DNA-repair>.
- ³¹ Brown T. A. *Genome und Gene, Lehrbuch der molekularen Genetik*. 3. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2007: 549.
- ³² Brown T., Brown T. Jr. *Nucleic Acids Book*. Atdbio.com. Available from: <http://www.atdbio.com/content/15/Mutagenesis-and-DNA-repair#Mismatches-in-DNA-bases>.
- ³³ Allawi H. T., SantaLucia J. Thermodynamics of internal C.T mismatches in DNA. *Nucleic Acids Research*. 1998;26(11):2694-2701.
- ³⁴ Aboul-ela F., Koh D., Tinoco I. Jr., Martin F. H. Base-base mismatches. Thermodynamics of double helix formation for dCA₃XA₃G + dCT₃YT₃G (X, Y = A,C,G,T). *Nucleic Acids Res*. 1985;13(13):4811-4824.
- ³⁵ Ke S. H., Wartell R. M. Influence of nearest neighbor sequence on the stability of base pair mismatches in long DNA; determination by temperature-gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res*. 1993;21(22):5137-5143.
- ³⁶ Cisse I. I., Kim H., Ha T. A rule of seven in Watson-Crick base-pairing of mismatched sequences. *Nat Struct Mol Biol*. 2012;19(6):623-627.
- ³⁷ Collins F. S., Brooks L. D., Chakravarti A. A DNA Polymorphism Discovery Resource for Research on Human Genetic Variation. *Genome Res*. 1998;8(12):1229-1231.
- ³⁸ Brookes A. J. The essence of SNPs. *Gene*. 1999;234(2):177-186.
- ³⁹ Van den Broeck T., Joniau S., Clinckemalie L., Helsen C., Prekovic S., Spans L., Tosco L., Van Poppel H., Claessens F. The Role of Single Nucleotide Polymorphisms in Predicting Prostate Cancer Risk and Therapeutic Decision Making. *Biomed Res Int*. 2014;2014:627510.

- ⁴⁰ Freire-Aradas A., Fondevila M., Kriegel A.-K., Phillips C., Gill P., Prieto L., Schneider P. M., Carracedo A., Lareu M. V. A new SNP assay for identification of highly degraded human DNA. *Forensic Sci Int Genet.* 2012;6(3):341-349.
- ⁴¹ Borsting C., Mogensen H. S., Morling N. Forensic genetic SNP typing of low-template DNA and highly degraded DNA from crime case samples. *Forensic Sci Int Genet.* 2013;7(3):345-352.
- ⁴² Gettings K. B., Kiesler K. M., Vallone P. M. Performance of a next generation sequencing SNP assay on degraded DNA. *Forensic Sci Int Genet.* 2015;19:1-9.
- ⁴³ Pakstis A. J., Speed W. C., Fang R., Hyland F. C. L., Furtado M. R., Kidd J. R., Kidd K. K. SNPs for a universal individual identification panel. *Hum Genet.* 2010;127(3):315-324.
- ⁴⁴ Kosoy R., Nassir R., Tian C., White P. A., Butler L. M., Silva G., Kittles R., Alarcon-Riquelme M. E., Gregersen P. K., Belmont J. W., De la Vega F. M., Seldin M. F. Ancestry Informative Marker Sets for Determining Continental Origin and Admixture Proportions in Common Populations in America. *Hum Mutat.* 2009;30(1):69-78.
- ⁴⁵ Gettings K. B., Lai R., Johnson J. L., Peck M. A., Hart J. A., Gordish-Dressman H., Schanfield M. S., Podini D. S. A 50-SNP assay for biogeographic ancestry and phenotype prediction in the U.S. population. *Forensic Sci Int Genet.* 2014;8(1):101-108.
- ⁴⁶ Millan K. M., Mikkelsen S. R. Sequence-Selective Biosensor for DNA Based on Electroactive Hybridization Indicators. *Anal Chem.* 1993;65(17):2317-2323.
- ⁴⁷ Kang D., Zuo X., Yang R., Xia F., Plaxco K. W., White R. J. Comparing the Properties of Electrochemical-Based DNA Sensors Employing Different Redox Tags. *Anal Chem.* 2009;81(21):9109-9113.
- ⁴⁸ Palecek E., Lukasova E., Jelen F., Vojtiskova M. Electrochemical analysis of polynucleotides. *Bioelectrochem Bioenerg.* 1981;8(5):497-506.
- ⁴⁹ Lukasova E., Jelen F., Palecek E. Electrochemistry of osmium-nucleic acid complexes: A probe for single-stranded and distorted double-stranded regions in DNA. *Gen Physiol Biophys.* 1982;1:53-70.
- ⁵⁰ Abad-Valle P., Fernández-Abedul M. T., Costa-García A. DNA single-base mismatch study with an electrochemical enzymatic genosensor. *Biosens Bioelectron.* 2007;22(8):1642-1650.
- ⁵¹ Walter A., Surkus A.-E., Flechsig G.-U. Hybridization detection of enzyme-labeled DNA at electrically heated electrodes. *Anal Bioanal Chem.* 2013;405(11):3907-3911.
- ⁵² Wang J., Liu G., Merkoci A. Electrochemical Coding Technology for Simultaneous Detection of Multiple DNA Targets. *J Am Chem Soc.* 2003;125(11):3214-3215.
- ⁵³ Wang J. Nanoparticle-based electrochemical DNA detection. *Anal Chim Acta.* 2003;500:247-257.
- ⁵⁴ Trefulka M., Ostatna V., Havran L., Fojta M., Palecek E. Covalent Labeling of Nucleosides with VIII- and VI-Valent Osmium Complexes. *Electroanalysis.* 2007;19(12):1281-1287.
- ⁵⁵ Jelen F., Karlovsky P., Makaturova E., Pecinka P., Palecek E. Osmium tetroxide reactivity of DNA bases in nucleotide sequencing and probing of DNA structure. *Gen Physiol Biophys.* 1991;10(5):461-473.
- ⁵⁶ Duwensee H. Towards Electrochemical PCR-Chips - Contributions to Couple Enzymatic Amplification and Electrochemical Detection of DNA [Dissertation]: Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Rostock; 2009.
- ⁵⁷ Wang J., Rivas G., Fernandes J. R., Paz J. L. L., Jiang M., Waymire R. Indicator-free electrochemical DNA hybridization biosensor. *Anal Chim Acta.* 1998;375(3):197-203.

- ⁵⁸ Kafka J., Pänke O., Abendroth B., Lisdat F. A label-free DNA sensor based on impedance spectroscopy. *Electrochim Acta*. 2008;53(25):7467-7474.
- ⁵⁹ Park J. Y., Park S. M. DNA Hybridization Sensors Based on Electrochemical Impedance Spectroscopy as a Detection Tool. *Sensors*. 2009;9(12):9513-9532.
- ⁶⁰ Drummond T. G., Hill M. G., Barton J. K., Electrochemical DNA sensors. *Nat Biotechnol*. 2003;21(10):1192-1199.
- ⁶¹ Civit L., Fragoso A., O'Sullivan C. K. Thermal stability of diazonium derived and thiol-derived layers on gold for application in genosensors. *Electrochem Commun*. 2010;12(8):1045-1048.
- ⁶² Nimse S. B., Song K., Sonawane M. D., Sayyed D. R., Kim T. Immobilization Techniques for Microarray: Challenges and Applications. *Sensors*. 2014;14(12):22208-22229.
- ⁶³ Koo K. M., Sina A. A. I., Carrascosa L. G., Shiddiky M. J. A., Trau M. DNA-bare gold affinity interactions: mechanism and applications in biosensing. *Anal Methods*. 2015;7:7042-7054.
- ⁶⁴ Pividori M. I., Merkoci A., Alegret S. Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods. *Biosens Bioelectron*. 2000;15(5-6):291-303.
- ⁶⁵ Opdahl A., Petrovykh D. Y., Kimura-Suda H., Tarlov M. J., Whitman L. J. Independent control of grafting density and conformation of single-stranded DNA brushes. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*. 2007;104(1):9-14.
- ⁶⁶ Schreiner S. M., Shudy D. F., Hatch A. L., Opdahl A., Whitman L. J., Petrovykh D. Y. Controlled and Efficient Hybridization Achieved with DNA Probes Immobilized Solely through Preferential DNA-Substrate Interactions. *Anal Chem*. 2010;82(7):2803-2810.
- ⁶⁷ Ozsoz M. *Electrochemical DNA Biosensors*. Taylor & Francis Group, LLC.; 2012: 207-210.
- ⁶⁸ <http://www.frizbiochem.de/en/dtpa-dithiol-phosphoramidite.html>.
- ⁶⁹ Vainrub A., Pettitt B. M. Coulomb blockage of hybridization in two-dimensional DNA arrays. *Phys Rev E*. 2002;66:041905.
- ⁷⁰ Herne T. M., Tarlov M. J. Characterization of DNA Probes Immobilized on Gold Surfaces. *J Am Chem Soc*. 1997;119(38):8916-8920.
- ⁷¹ Steel A. B., Herne T. M., Tarlov M. J. Electrochemical Quantitation of DNA Immobilized on Gold. *Anal Chem*. 1998;70(22):4670-4677.
- ⁷² Ricci F., Lai R. Y., Heeger A. J., Plaxco K. W., Sumner J. J. Effect of Molecular Crowding on the Response of an Electrochemical DNA Sensor. *Langmuir*. 2007;23(12):6827-6834.
- ⁷³ Keighley S. D., Li P., Estrela P., Migliorato P. Optimization of DNA immobilization on gold electrodes for label-free detection by electrochemical impedance spectroscopy. *Biosens Bioelectron*. 2008;23(8):1291-1297.
- ⁷⁴ Watkins H. M., Simon A. J., Ricci F., Plaxco K. W. Effects of Crowding on the Stability of a Surface-Tethered Biopolymer: An Experimental Study of Folding in a Highly Crowded Regime. *J Am Chem Soc*. 2014;136(25):8923-8927.
- ⁷⁵ Wong I. Y., Melosh N. A. An Electrostatic Model for DNA Surface Hybridization. *Biophys J*. 2010;98(12):2954-2963.
- ⁷⁶ Zhou J. C., Feller B., Hinsberg B., Sethi G., Feldstein P., Hihath J., Seker E., Marco M., Knoesen A., Miller R. Immobilization-mediated reduction in melting temperatures of DNA-DNA and DNA-RNA hybrids: Immobilized DNA probe hybridization studied by SPR. *Colloids Surf., A*. 2015;481:72-79.

- ⁷⁷ Pesciotta E. N., Bornhop D. J., Flowers R. A. Back-Scattering Interferometry: A Versatile Platform for the Study of Free-Solution versus Surface-Immobilized Hybridization. *Chem Asian J.* 2011;6(1):70-73.
- ⁷⁸ Knez K., Spasic D., Janssen K. P. F., Lammertyn J. Emerging technologies for hybridization based single nucleotide polymorphism detection. *Analyst.* 2014;139(2):353-370.
- ⁷⁹ Xia F., White R. J., Zuo X., Patterson A., Xiao Y., Kang D., Gong X., Plaxco K. W., Heeger A. J. An Electrochemical Supersandwich Assay for Sensitive and Selective DNA Detection in Complex Matrices. *J Am Chem Soc.* 2010;132(41):14346-14348.
- ⁸⁰ Fan C., Plaxco K. W., Heeger A. J. Electrochemical interrogation of conformational changes as a reagentless method for the sequence-specific detection of DNA. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2003;100(16):9134-9137.
- ⁸¹ Abi A., Ferapontova E. E. Electroanalysis of single-nucleotide polymorphism by hairpin DNA architectures. *Anal Bioanal Chem.* 2013;405(11):3693-3703.
- ⁸² Xiao Y., Lou X., Uzawa T., Plakos K. J., Plaxco K. W., Soh H. T. An Electrochemical Sensor for Single Nucleotide Polymorphism Detection in Serum Based on a Triple-Stem DNA Probe. *J Am Chem Soc.* 2009;131(42):15311-15316.
- ⁸³ Farjami E., Clima L., Gothelf K., Ferapontova E. E. "Off-On" Electrochemical Hairpin-DNA-Based Genosensor for Cancer Diagnostics. *Anal Chem.* 2011;83(5):1594-1602.
- ⁸⁴ Zhang D. Y., Seelig G. Dynamic DNA nanotechnology using strand-displacement reactions. *Nat Chem.* 2011;3(2):103-113.
- ⁸⁵ Zhang Z., Zeng D., Ma H., Feng G., Hu J., He L., Li C., Fan C. A DNA-Origami Chip Platform for Label-Free SNP Genotyping Using Toehold-Mediated Strand Displacement. *Small.* 2010;6(17):1854-1858.
- ⁸⁶ Kelley S. O., Boon E. M., Barton J. K., Jackson N. M., Hill M. G. Single-base mismatch detection based on charge transduction through DNA. *Nucleic Acids Res.* 1999;27(24):4830-4837.
- ⁸⁷ Long Y. T., Li C. Z., Sutherland T. C., Kraatz H. B., Lee J. S. Electrochemical detection of single-nucleotide mismatches: application of M-DNA. *Anal Chem.* 2004;76(14):4059-4065.
- ⁸⁸ Shamsi M. H., Kraatz H. B. Probing nucleobase mismatch variations by electrochemical techniques: exploring the effects of position and nature of the single-nucleotide mismatch. *Analyst.* 2010;135(9):2280-2285.
- ⁸⁹ Scharlt M., Gessler M., v. Eckardstein A. *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen.* 1. Auflage, Elsevier GmbH, München, Urban & Fischer Verlag; 2009: 445.
- ⁹⁰ Mix M., Reske T., Duwensee H., Flechsig G.-U. Electrochemical Detection of Asymmetric PCR Products by Labeling with Osmium Tetroxide. *Electroanalysis.* 2009;21(7):826-830.
- ⁹¹ Jacobsen M., Flechsig G.-U. Temperature Control in Electrochemical DNA Sensing. *Curr Phys Chem.* 2011;1(4):292-298.
- ⁹² Walter A., Langschwager F., Marken F., Flechsig G.-U. Nanostructured heated gold electrodes for DNA hybridization detection using enzyme labels. *Sens Actuators B Chem.* 2016;233:502-509.
- ⁹³ Czeslik C., Seemann H., Winter R.; *Basiswissen Physikalische Chemie.* 4., aktualisierte Auflage, Vieweg + Teubner, GWV Fachverlage GmbH, Wiesbaden; 2010: 278-279.
- ⁹⁴ Biala K., Sedova A., Flechsig G.-U. Sequence and Temperature Influence on Kinetics of DNA Strand Displacement at Gold Electrode Surfaces. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015;7(36):19948-19959.
- ⁹⁵ Wohlgamuth C. H., McWilliams M. A., Slinker J. D. Temperature Dependence of Electrochemical DNA Charge Transport: Influence of a Mismatch. *Anal Chem.* 2013;85(3):1462-1467.

- ⁹⁶ Yu L.-H., Chen Y.-F. Concentration-Dependent Thermophoretic Accumulation for the Detection of DNA Using DNA-Functionalized Nanoparticles. *Anal Chem.* 2015;87(5):2845-2851.
- ⁹⁷ Flechsig G.-U., Walter A. Electrically Heated Electrodes: Practical Aspects and New Developments. *Electroanalysis.* 2012;24(1):23-31.
- ⁹⁸ Wachholz F., Biała K., Piekarz M., Flechsig G.-U. Temperature pulse modulated amperometry at compact electrochemical sensors. *Electrochem Commun.* 2007;9(9):2346-2352.
- ⁹⁹ Gründler P., Kirbs A. The Technology of Hot-Wire Electrochemistry. *Electroanalysis.* 1999;11(4):223-228.
- ¹⁰⁰ Wachholz F.; Geheizte elektrochemische Sensoren mit neuartigen Arbeitselektroden und Heizgeneratoren [Dissertation]: Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Rostock; 2009.
- ¹⁰¹ Zerihun T., Gründler P. Electrically heated cylindrical microelectrodes. The reduction of dissolved oxygen on Pt. *J Electroanal Chem.* 1996;404(2):243-248.
- ¹⁰² Reineck P., Wienken C. J., Braun D. Thermophoresis of Single Stranded DNA. *Electrophoresis.* 2010;31(2):279-286.
- ¹⁰³ Platten J. K. The Soret Effect: A Review of Recent Experimental Results. *J Appl Mech.* 2006;73(1):5-15.
- ¹⁰⁴ Duhr S., Braun D. Why Molecules Move Along a Temperature Gradient. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 2006;103(52):19678–19682.
- ¹⁰⁵ Wienken C. J., Baaske P., Duhr S., Braun D. Thermophoretic melting curves quantify the conformation and stability of RNA and DNA. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(8):e52.
- ¹⁰⁶ Hinks A., Barton A., John S., Bruce I., Hawkins C., Griffiths C. E. M., Donn R., Thomson W., Silman A., Worthington J. Association Between the PTPN22 Gene and Rheumatoid Arthritis and Juvenile Idiopathic Arthritis in a UK Population: Further Support That PTPN22 Is an Autoimmunity Gene. *Arthritis Rheum.* 2005;52(6):1694–1699.
- ¹⁰⁷ De Jager P. L., Baecher-Allan C., Maier L. M., Arthur A. T., Ottoboni L., Barcellos L., McCauley J. L., Sawcer S., Goris A., Saarela J., Yelensky R., Price A., Leppa V., Patterson N., de Bakker P. I. W., Tran D., Aubin C., Pobywajlo S., Rossin E., Hu X., Ashley C. W., Choy E., Rioux J. D., Pericak-Vance M. A., Ivinson A., Booth D. R., Stewart G. J., Palotie A., Peltonen L., Dubois B., Haines J. L., Weiner H. L., Compston A., Hauser S. L., Daly M. J., Reich D., Oksenberg J. R., Hafler D. A. The role of the CD58 locus in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 2009;106 (13):5264–5269.
- ¹⁰⁸ Field J., Browning S. R., Johnson L. J., Danoy P., Varney M. D., Tait B. D., Gandhi K. S., Charlesworth J. C., Heard R. N., The Australia and New Zealand Multiple Sclerosis Genetics Consortium (ANZgene), Stewart G. J., Kilpatrick T. J., Foote S. J., Bahlo M., Butzkueven H., Wiley J., Booth D. R., Taylor B. V., Brown M. A., Rubio J. P., Stankovich J. A Polymorphism in the HLA-DPB1 Gene Is Associated with Susceptibility to Multiple Sclerosis. *PLoS One.* 2010;5(10):e13454.
- ¹⁰⁹ De Jager P. L., Jia X., Wang J., de Bakker P. I. W., Aggarwal N. T., Piccio L., Raychaudhuri S., Tran D., Aubin C., Briskin R., Romano S., International MS Genetics Consortium, Baranzini S. E., McCauley J. L., Pericak-Vance M. A., Haines J. L., Gibson R. A., Naeglin Y., Uitdehaag B., Matthews P. M., Kappos L., Polman C., McArdle W. L., Strachan D. P., Evans D., Cross A. H., Daly M. J., Compston A., Sawcer S. J., Weiner H. L., Hauser S. L., Hafler D. A., Oksenberg J. R. Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci. *Nat Genet.* 2009;41(7):776-782.

- ¹¹⁰ Alam M. N., Shamsi M. H., Kraatz H. B. Scanning positional variations in single-nucleotide polymorphism of DNA: an electrochemical study. *Analyst*. 2012;137(18):4220-4225.
- ¹¹¹ Duwensee H., Mix M., Broer I., Flechsig G.-U. Electrochemical detection of modified maize gene sequences by multiplexed labeling with osmium tetroxide bipyridine. *Electrochem Commun*. 2009;11(7):1487-1491.
- ¹¹² Mix M., Rüger J., Krüger S., Broer I., Flechsig G.-U. Electrochemical detection of 0.6 percent genetically modified maize MON810 in real flour samples. *Electrochem Commun*. 2012;22:137-140.
- ¹¹³ Beckmann A., Coles B. A., Compton R. G., Gründler P., Marken F., Neudeck A. Modeling Hot Wire Electrochemistry. Coupled Heat and Mass Transport at a Directly and Continuously Heated Wire. *J Phys Chem B*. 2000;104(4):764-769.
- ¹¹⁴ Peterlinz K. A., Georgiadis R. M. Observation of Hybridization and Dehybridization of Thiol-Tethered DNA Using Two-Color Surface Plasmon Resonance Spectroscopy. *J Am Chem Soc*. 1997;119(14):3401-3402.
- ¹¹⁵ Cash K. J., Heeger A. J., Plaxco K. W., Xiao Y. Optimization of a reusable, DNA pseudoknot-based electrochemical sensor for sequence-specific DNA detection in blood serum. *Anal Chem*. 2009;81(2):656-661.
- ¹¹⁶ Duwensee H., Jacobsen M., Flechsig G.-U. Electrochemical competitive hybridization assay for DNA detection using osmium tetroxide-labelled signalling strands. *Analyst*. 2009;134(5):899-903.
- ¹¹⁷ Gassmann S., Götze H., Hinze M., Mix M., Flechsig G.-U., Pagel L. PCB Based DNA Detection Chip. *IECON Proc*. 2012;6389254:3982-3986.
- ¹¹⁸ Mix M. Elektrochemische Detektion von PCR-Produkten in Realproben [Dissertation]: Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Rostock; 2013.