

**UNIVERSITÄT
BAYREUTH**

Elektrochemische Detektion von RNA mittels Nukleinsäurehybridisierung

Dissertation zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

-Dr. rer. nat.-

der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der
Universität Bayreuth

vorgelegt von

M. Sc. Molekulare Biotechnologie

Christopher Pöhlmann

Bayreuth, 2009

Die vorliegende Arbeit wurde von August 2006 bis September 2009 am Laboratorium für Biochemie unter der Leitung von Prof. em. Dr. Dr. h.c. Mathias Sprinzl angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Promotionsgesuch eingereicht am: 10.11.2009

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 15.03.2010

Prüfungsausschuss:

Prof. em. Dr. Dr. h.c. Mathias Sprinzl	(Erstgutachter)
Prof. Dr. Olaf Stemmann	(Zweitgutachter)
Prof. Dr. Carlo Unverzagt	(Vorsitzender)
Prof. Dr. Harold Drake	

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Zusammenfassung	1
Summary.....	3
1 Einleitung	5
1.1 Biosensorik	5
1.1.1 DNA-Biosensoren	7
1.1.2 Nukleinsäurehybridisierung	9
1.2 Elektrochemischer Biosensor	12
1.2.1 Gold-Thiol-Wechselwirkung.....	12
1.2.2 Esterase 2 aus <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> als Reporterenzym.....	13
1.2.3 Funktionsprinzip des elektrochemischen Biosensors	14
1.3 Applikationsmöglichkeiten.....	15
1.3.1 Detektion von Mikroorganismen.....	16
1.3.2 Detektion von microRNAs als Biomarker für die Krebsdiagnostik.....	23
1.4 Ziele der Arbeit.....	24
2 Material und Methoden	26
2.1 Material.....	26
2.1.1 Chemikalien, Biochemikalien und Enzyme	26
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	26
2.1.3 Plasmide	26
2.1.4 Bakterienstämme	27
2.1.5 Zusammensetzung von Nährmedien	27
2.1.6 Synthetische Oligonukleotide.....	28
2.1.7 Zusammensetzung gebräuchlicher Lösungen.....	28
2.1.8 Geräteliste.....	30
2.2 Genetische Methoden	31
2.2.1 RNA-Analytik	31
2.2.2 DNA-Analytik	36
2.3 Analyse von Proteinen.....	39
2.3.1 Bradford-Assay zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration	39
2.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	40
2.3.3 Bestimmung der enzymatischen Aktivität der EST2	40
2.3.4 South-Western-Blot.....	41
2.3.5 Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC).....	42
2.3.6 Rekombinante Expression der EST2 (C97S E118C).....	43

2.3.7	Herstellung von EST2-ODN-Konjugaten	44
2.3.8	Herstellung von EST2-Streptavidin-Konjugaten	45
2.3.9	Synthese von EST2-Dendrimer-ODN-Konjugaten	45
2.3.10	Konjugation von Fänger-ODN an magnetische Partikel	46
2.4	Kultivierung von Bakterien	48
2.5	Bakterienquantifizierung	48
2.5.1	Photometrische Quantifizierung	48
2.5.2	KbE-Bestimmung	48
2.5.3	Mikrobiologische Analyse von Fleischproben	48
2.6	Kultivierung von eukaryontischen Zelllinien	49
2.7	Elektrochemischer Nachweis von Hybridisierungsereignissen	50
2.7.1	Fluidik	50
2.7.2	Aufbau der Biochip-Apparatur	51
2.7.3	Messprinzip der Biochip-Apparatur	51
2.7.4	Reinigung der Goldelektroden und Immobilisierung der Fänger-ODNs	54
2.7.5	Detektion ribosomaler RNA	55
2.7.6	Detektion von DNA-Oligonukleotiden (Zwei-Komponenten-Hybridisierung) ..	60
2.7.7	Detektion von PCR-Produkten	60
2.7.8	Detektion von microRNAs	60
2.7.9	Detektion von mRNAs	61
3	Ergebnisse	62
3.1	Elektrochemische Detektion bakterieller 16S rRNA	62
3.1.1	Aufbau des Biochip-Detektionssystems	62
3.1.2	Synthese von EST2-ODN-Konjugaten	64
3.1.3	Design der Sequenzen für Fänger-, Helfer- und Detektionsoligonukleotide	65
3.1.4	Optimierung der Biochip-Messung	68
3.1.5	Fragmentierung der Gesamt-RNA	73
3.1.6	Bedeutung der Länge des Helfer-Oligonukleotids für das Detektionssignal	76
3.1.7	Hybridisierung	77
3.1.8	Untersuchungen zur Selektivität und Lebend-Tod Differenzierung	82
3.1.9	Sensitivität der Biochip-Analyse von <i>E. coli</i>	93
3.1.10	Regenerierbarkeit der Biochips	95
3.1.11	Serienexperiment zur Validierung des elektrochemischen Nachweissystems	96
3.1.12	Antibiotikanachweis durch Wachstumsselektion und 16S rRNA-Nachweis	99
3.1.13	Entwicklung alternativer 16S rRNA-Detektionsmethoden	101
3.2	Detektion von microRNA bzw. mRNA mittels Lückenhybridisierung	118
3.2.1	Elektrochemische Detektion von miRNAs mittels Lückenhybridisierung	119
3.2.2	Elektrochemische Detektion von mRNAs mittels Lückenhybridisierung	125
3.3	Signalamplifikationsstrategien	127
3.3.1	PCR-Amplifikation	127

3.3.2	<i>Rolling Circle</i> Amplifikation.....	132
3.3.3	Signalamplifikation durch Dendrimertechnologie	134
4	Diskussion.....	141
4.1	Verwendung von Esterase 2 als Reporterenzym zur Detektion von Hybridisierungsereignissen	141
4.2	Detektion von bakterieller 16S rRNA	143
4.2.1	Optimierung der elektrochemischen 16S rRNA-Nachweismethode.....	143
4.2.2	Selektivität und Sensitivität der 16S rRNA-Nachweismethode	146
4.2.3	Validierung der elektrochemischen Nachweismethode mit realen Fleischproben	150
4.3	Vergleich mit alternativen 16S rRNA-Detektionsmethoden.....	152
4.3.1	Anbindung des Reporterenzym über Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung ...	152
4.3.2	16S rRNA-Nachweis mittels Stamm-Schleife-Strukturen	153
4.3.3	Spektralphotometrische 16S rRNA-Nachweismethode	156
4.4	Detektion von kleinen RNAs und mRNAs mittels Lückenhybridisierung	156
4.5	Signalamplifikationsstrategien	159
4.5.1	Elektrochemischer Nachweis von PCR-Produkten	159
4.5.2	Signalamplifikation durch RCA	161
4.5.3	Signalamplifikation durch Dendrimertechnologie	162
5	Ausblick	164
6	Literaturverzeichnis	165
	Anhang A: Übersicht der verwendeten Chemikalien, Biochemikalien und Oligonukleotide.....	191
	Danksagung	199
	Erklärung	203

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampère oder Adenin
<i>A. acidocaldarius</i>	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
A_x	Absorption bei einer Wellenlänge x
bp	Basenpaare
BHI	<i>brain heart infusion</i> Medium
BPW	<i>buffered peptone water</i> (Gepuffertes Peptonwasser)
BSA	Rinderserumalbumin
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAzym	DNA mit enzymatischer Aktivität, Desoxyribozym
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTE	Dithioerythrol
DTT	Dithiothreitol
EDTA	<i>N,N,N',N'</i> -Ethyldiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz
EST2	Esterase 2 aus <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>
EtOH	Ethanol
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HRP	Meerrettichperoxidase
IPTG	Isopropyl- β -D-1-Thiogalaktopyranosid
kbp	Kilobasenpaare
KbE	Kolonie bildende Einheit
kDa	Kilodalton
k_{cat}	Wechselzahl
K_D	Dissoziationskonstante
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
LB	<i>lysogeny broth</i>
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption/ionisation</i>
MESA	MOPS-EDTA-Natriumacetat
min	Minuten
MOPS	3-(N-Morpholino)-1-propansulfonsäure
MW	Molekulargewicht
NASBA	<i>nucleic acid sequence-based amplification</i>
NB	<i>nutrient broth</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NHS-PEO ₂ -Maleimid	Succinimidyl-([N-maleimidopropionamido]-di-ethylenglykol)-ester
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
ODN(s)	Oligodesoxyribonukleotid(e)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMAM	Polyamidoamin
pAP	<i>p</i> -Aminophenol
pAPB	<i>p</i> -Aminophenylbutyrat

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PDB	<i>protein data bank</i>
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pNP	<i>p</i> -Nitrophenol
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RCA	<i>rolling circle amplification</i>
RDP	<i>ribosomal database project</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
SAM	<i>self-assembled monolayer</i> (selbstassemblierende Monoschicht)
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
spp.	Spezies (<i>species pluralis</i>)
SSC	Standard-Salzlösung-Citrat
ssDNA	<i>single stranded DNA</i> (einzelsträngige DNA)
sulfo-SMCC	sulfo-Succinimidyl-4(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCEP	Tris-(2-Carboxyethyl)phosphinhydrochlorid
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEAA	Triethylammoniumacetat
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -Tetramethylethylendiamin
T_M	Schmelztemperatur (<i>melting temperature</i>)
TMAC	Tetramethylammoniumchlorid
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TOF	<i>time of flight</i> -Massenspektrometer
U	<i>Unit</i> (Einheit enzymatischer Aktivität)
UV	ultraviolett
V	Volt
[v/v]	Volumenprozent
[w/v]	Gewichtsprozent
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranosid

Aminosäuren wurden mit dem üblichen Ein- oder Drei-Buchstabencode abgekürzt. Nukleotide wurden mit A, T, U, G und C bezeichnet.

Zusammenfassung

Die Nukleinsäureanalytik, insbesondere die RNA-Analytik, ist ein wichtiges Werkzeug für die Diagnostik von pathogenen Mikroorganismen in der Medizin und Lebensmittelüberwachung. Weiterhin besitzt der Nachweis von RNA-Molekülen bei der Transkriptomanalytik in der Grundlagenforschung eine zentrale Bedeutung.

Ziel der Arbeit war die Entwicklung neuartiger Detektionsverfahren für unterschiedliche RNA-Spezies. Die schnelle und einfache Durchführbarkeit, aber auch die Parameter Selektivität und Sensitivität der entwickelten Techniken waren dabei von besonderer Bedeutung.

Zunächst wurde die Detektionsmethode anhand der Identifizierung von Mikroorganismen mittels 16S rRNA-*Sandwich*-Hybridisierung etabliert und optimiert. Mit Hilfe von 16S rRNA-Sequenzdatenbanken wurden geeignete SONDENSEQUENZEN zur spezifischen Erkennung von verschiedenen Bakterien ermittelt. Die prokaryontische 16S rRNA wurde unter Verwendung des thermostabilen Reporterenzym Esterase 2 aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* durch eine Ein-Schritt *Sandwich*-Hybridisierung nachgewiesen. Ein Spezies-spezifisches Oligodesoxynukleotid wird auf der Goldelektrode eines elektrochemisch-auslesbaren Biochips immobilisiert und bindet die bakterielle 16S rRNA. Zeitgleich bindet ein kovalentes Konjugat aus Esterase 2 und Detektions-Oligodesoxynukleotid an einem konservierten Bereich der 16S rRNA. Nach Optimierung dieses Nachweissystems wurde eine Nachweisgrenze von 500 Kolonie bildenden Einheiten *Escherichia coli* ermittelt. Neben der guten Sensitivität konnte eine gute Spezifität bis hin zur Stammdiskriminierung gezeigt werden. Gleichzeitig konnten mehrere Bakterien in einem Ansatz identifiziert werden.

Die Validierung dieses neuartigen bakteriellen Nachweissystems erfolgte mit realen Fleischproben. Das Hygienerecht der EU verlangt die Kontrolle mikrobiologischer Kriterien während der gesamten Prozesskette der Lebensmittelherstellung. Klassische mikrobiologische Verfahren sind hierfür jedoch nur bedingt geeignet. Biosensoren in integrierten Analysesystemen könnten in Zukunft hierfür Verwendung finden und die Analytik beschleunigen und vereinfachen. Die Optimierung der Probenvorbereitung und der Biochipmessung führte zu einem Gesamtanalyseprozess, bestehend aus Kurzanreicherung, RNA-Isolierung und Biochipmessung, welcher den spezifischen *E. coli* Nachweis von einer Kolonie bildenden Einheit pro mL Probe innerhalb von sieben Stunden ermöglicht. Daher ist diese Methode prinzipiell sehr gut für die Anwendung in der Lebensmittelproduktion geeignet.

Zum Vergleich des etablierten Nachweissystems mit anderen in der Literatur beschriebenen elektrochemischen Detektionsplattformen wurde ein Esterase 2-Streptavidin-Konjugat hergestellt und für den Nachweis von bakterieller 16S rRNA

mittels *Sandwich*-Hybridisierung verwendet. Weiterhin wurde der 16S rRNA-Nachweis mit einem immobilisierten *Molecular Beacon* realisiert. Diese Haarnadelförmigen Sonden sind in der Lage, eine durch Hybridisierung mit der Analytnukleinsäure hervorgerufene Auflösung ihrer Sekundärstruktur durch Anbindung des Esterase 2-Streptavidin-Konjugats anzuzeigen. Hinsichtlich Selektivität konnte kein Unterschied zwischen den einzelnen Detektionssystemen festgestellt werden. Dagegen zeigte sich bei Verwendung von kovalentem Esterase 2-Oligodesoxynukleotid-Konjugat im Vergleich zum Esterase 2-Streptavidin-Konjugat eine 100-fach sensitivere 16S rRNA-Detektion.

Eine Signalamplifikation der elektrochemischen Nukleinsäuredetektion wurde durch Herstellung eines neuartigen Reporterenzymkonjugats erreicht. Dazu wurden mehrere Esterase 2-Moleküle auf der Oberfläche eines Polyamidoamin-Dendrimers der Generation 3 verankert, während ein Detektions-Oligodesoxynukleotid mit dem Kern des Dendrimers kovalent verknüpft wurde. Die Selektivität der Bakterienidentifizierung blieb bei Verwendung dieses Reporterenzymkonjugats unverändert gut. Jedoch wurde bei Verwendung des mehrfach markierten Dendrimers eine Nachweisgrenze von 50 Kolonie bildenden Einheiten *Escherichia coli* erreicht, was eine zehnfache Verbesserung der Nachweisgrenze im Vergleich zum vorher beschriebenen Esterase 2-Oligodesoxynukleotid-Konjugat darstellt.

Derzeit stellt die schnelle und sensitive Expressionsanalyse von microRNAs eine große Herausforderung dar. Kürzlich wurde zudem gezeigt, dass diese als Biomarker für die Tumordiagnostik dienen können. Deshalb wurde auf Basis des etablierten *Sandwich*-Hybridisierungssystems ein so genannter Lückenhybridisierungsnachweis entwickelt. Eine Hybridisierung von immobilisiertem Fänger-Oligodesoxynukleotid, Esterase 2-Detektionsoligodesoxynukleotid und komplementärer RNA-Probe lässt eine Lücke zwischen Fänger- und Detektionssonde. Diese Lücke destabilisiert den Komplex, was bei höheren Temperaturen zu einem Zerfall führt. Ist dagegen die gewünschte microRNA anwesend, füllt diese die Lücke zwischen Fänger- und Detektionssonde aus, stabilisiert den Hybridisierungskomplex und immobilisiert das Reporterenzym in der Nähe der Elektrode. Dieses kann folglich elektrochemisch detektiert werden. Mittels Lückenhybridisierung konnten verschiedene microRNAs diskriminiert werden. Selbst einzelne Fehlbasenpaarungen führten zu einem signifikanten Signalabfall. Die Nachweisgrenze für microRNA beträgt 2 pM bzw. 2 attomol ohne jegliche vorherige Amplifikation der Nukleinsäuren. Nach Isolation der Gesamt-RNA aus einer humanen Mammakarzinomzelllinie konnte mit dieser Methode ein Expressionsprofil von vier verschiedenen microRNAs innerhalb von 60 Minuten erstellt werden. Die Methode der Lückenhybridisierung wurde auch erfolgreich auf die schnelle Expressionsanalyse von Boten-RNAs aus prokaryontischen und eukaryontischen Zellen angewandt.

Summary

Electrochemical biochips are an emerging tool for point-of-care diagnostic systems in medicine, food and environmental monitoring.

Aim of this study was the development of a novel detection platform for different RNA species. Besides versatility, rapid operation and broad applicability, the parameters sensitivity and selectivity were the focus of present investigation.

A thermostable reporter enzyme, esterase 2 from *Alicyclobacillus acidocaldarius*, was used for specific and sensitive detection of bacteria by one-step rRNA/DNA hybridization between a bacterium-specific capture oligodeoxynucleotide, bacterial 16S rRNA and an uniform esterase 2-oligodeoxynucleotide reporter conjugate. The detection limit corresponds to approximately 500 colony forming units *Escherichia coli*. Beside high sensitivity, the application of electrochemical biochips allows discrimination of two Gram-negative and two Gram-positive bacteria demonstrating the specificity and the potential for parallel detection of microorganisms. The feasibility of identification of foodborne bacteria was studied with meat juice contaminated with *Escherichia coli*. This detection system has the capability to be applied for monitoring of bacterial food contamination.

According EU hygiene guidelines control of microbiological monitoring has to be applied throughout the whole process of food manufacturing. While classical microbiological methods are less suitable for routine analysis, biosensors integrated in lab-on-a-chip systems could help to improve the situation in future. Therefore, we tested the applicability of biosensors for the detection of bacteria in food by means of direct and specific electrochemical detection of microbial 16S ribosomal RNA. *E. coli* contaminated meat matrix was analysed. We developed a procedure, including a short pre-enrichment step followed by an optimized RNA isolation and biochip measurement that enabled *E. coli* detection of at least 1 colony forming units per mL sample within 7 hours. This diagnostic procedure is well suited for application in food production monitoring.

For comparison with alternative electrochemical detection methods an esterase 2-streptavidin conjugate was prepared and applied for the detection of bacterial 16S rRNA via sandwich hybridization assay. Stem-loop structured probes (molecular beacons) that combine both biochemical recognition and signal generation in a single molecule are capable of signaling alterations in secondary structure. Upon hybridization with the target sequence electrochemical signal can be directly observed. Regarding selectivity, no difference of the tested methods could be observed. However, application of esterase 2-oligodeoxynucleotide conjugate enabled 100-fold more sensitive 16S rRNA detection compared to esterase 2-streptavidin conjugate.

In order to improve sensitivity of *Escherichia coli* 16S rRNA detection novel enzyme-oligodeoxynucleotide conjugate was synthesized. Thermostable esterase 2 from *Alicyclobacillus acidocaldarius* was multiply conjugated to a polyamidoamine dendrimer functionalized by one universal detector oligodeoxynucleotide. Three components rRNA/DNA hybridization between capture oligodeoxynucleotide covalently immobilized on a gold electrode, 16S rRNA and the multivalent esterase-dendrimer cluster were used for detection. The linear dependence of the electrochemical signals to analyte concentration revealed a detection limit of 50 colony forming units *Escherichia coli*, which represents a tenfold signal enhancement as compared to the detection limit achieved with monovalent esterase-oligodeoxynucleotide conjugate.

MicroRNAs have recently been linked to cancerogenesis by acting as tumor-suppressors or oncogenes. Therefore, they could be used as molecular markers for early diagnosis of cancer. In this work, a rapid, selective and sensitive gap hybridization assay for detection of mature microRNAs based on four components DNA/RNA hybridization and electrochemical detection using esterase 2-oligodeoxynucleotide conjugates was established. Complementary binding of microRNA to an RNA probe and to a gap built of capture and detector oligodeoxynucleotide the reporter enzyme is brought to vicinity of electrode to produce an electrochemical signal. In absence of microRNA the gap between capture and detector oligodeoxynucleotide is not filled and missing base stacking energy destabilizes the hybridization complex. The gap hybridization assay demonstrates selective detection of miR-16 within a mixture of other miRNAs including possibility of single mismatch discrimination. Applying the biosensor assay a detection limit of 2 pM or 2 amol of miR-16 was obtained. Using isolated total RNA from human breast adenocarcinoma MCF-7 cells the assay detected specifically miR-21 and miR-16 in parallel and higher expression of oncogene miR-21 as compared to miR-16 was demonstrated. Including RNA isolation the gap hybridization assay was developed with a total assay time of 60 min and without the need for reverse transcription PCR amplification of the sample. Same principle was applied for messenger RNA expression analysis in prokaryotic and eukaryotic cells. The characteristics of the assay developed in this work could satisfy the need for rapid and easy methods for early cancer marker detection in clinical diagnostics.

1 Einleitung

1.1 Biosensorik

Ein Biosensor ist eine analytische Apparatur, welche die Zielsubstanz (Analyt) identifiziert, gegebenenfalls ihre Konzentration misst und als elektronisches Signal deutet. Die Umwandlung der chemischen Wechselwirkung zu einem elektronischen Signal geschieht mittels eines biologischen Erkennungssystems (Rezeptor), das mit einem physikochemischen Signalumwandler (*Transducer*) gekoppelt vorliegt (Lowe & Goldfinch 1983).

Der erste Biosensor wurde 1962 von Clark und Lyons entwickelt (Clark, Jr. & Lyons 1962). Dabei handelte es sich um einen Glukose-Biosensor, bei dem eine dünne Schicht des Enzyms Glukose-Oxidase zwischen einer Sauerstoff-Elektrode und einer semipermeablen Dialyse-Membran eingeschlossen wurde. Der enzymatische Verbrauch von gelöstem Sauerstoff wird von der Elektrode amperometrisch detektiert und ist proportional zur Konzentration an Glukose in der Probe. In der Folgezeit kam es zu etlichen Weiterentwicklungen dieses Glukosebiosensors, die in einigen kommerziellen *Point-of-Care*-Geräten zur einfachen Bestimmung des Blutzuckers endeten (Übersichtsartikel von Wang 2008). Das biologische Erkennungselement ist entscheidend für die Selektivität und Sensitivität eines Biosensors. Es erkennt die Anwesenheit, Aktivität oder Konzentration einer bestimmten Analytspezies in einer komplexen Probenmischung. Zum einen kann der biologische Rezeptor affinitätsbasiert seinen Liganden binden. Andere mögliche biologische Erkennungssysteme beruhen auf katalytischen Reaktionen oder biomimetischen Rezeptoren. Vertreter der einzelnen Rezeptorklassen sind in Abbildung 1-1 dargestellt. Die Bindung eines Analyten an das biologische Erkennungselement hat eine messbare Veränderung der Eigenschaften der Analytlösung (Bildung eines Produkts, Abnahme eines Stoffes) zur Folge, welche vom *Transducer* in ein quantifizierbares und prozessierbares elektronisches Signal umgewandelt werden kann.

Eine mögliche Einteilung der Vielzahl an Biosensoren basiert auf der Funktionsweise des Signalumwandlers. Dabei unterscheidet man hauptsächlich elektrochemische, optische und akkustische *Transducer*.

Elektrochemische DNA-Biosensoren gewinnen aufgrund ihrer Schnelligkeit, hohen Sensitivität, ausgeprägten Spezifität und einfachen Miniaturisierbarkeit immer mehr an Bedeutung (Drummond *et al.*, 2003; Wang 2006). Die Amperometrie erlaubt die Detektion von elektroaktiven chemischen Substanzen, die an Elektroden mit konstantem Potential oxidiert bzw. reduziert werden (Redox-Reaktionen). Dabei kommen eine

Vielzahl von Elektrodenmaterialien, wie Edelmetalle, Graphit, Halbleiter, elektronisch leitende Polymere und auch leitende Salze, zum Einsatz (Lucarelli *et al.*, 2004). Die Coulometrie dagegen bestimmt die Menge an Ladungen zwischen zwei Elektroden (D'Orazio 2003). Die elektrische Potentialdifferenz zwischen zwei Elektroden misst die Potentiometrie (Bakker & Pretsch 2007). Diese Technik findet Anwendung in Ionen-selektiven Elektroden, wie etwa der Glas-pH-Elektrode.

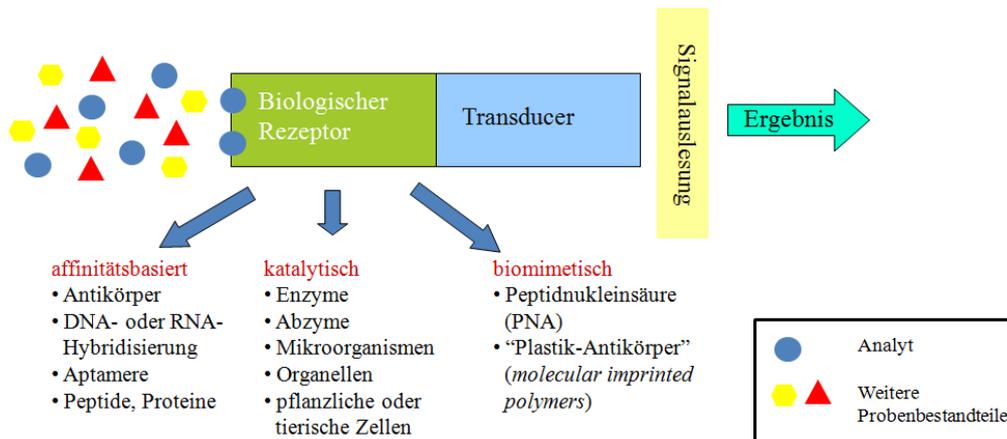


Abbildung 1-1: **Prinzipieller Aufbau eines Biosensors.** Ein spezifischer Analyt in der Probenlösung wird vom biologischen Rezeptor erkannt. Die verschiedenen Klassen an biologischen Erkennungssystemen und dazugehörige Beispiele sind angegeben. Der *Transducer* wandelt physikalische, chemische oder biologische Effekte in ein elektrisches Signal um.

Die optische Detektion nutzt Effekte wie die Oberflächenplasmonenresonanz (*surface plasmon resonance*, SPR) (Kretzschmann *et al.*, 1968), Totalreflexion von Licht in Wellenleitern (Graham *et al.*, 1992) oder Interferenzen an dünnen Schichten (Reflektometrische Interferenzspektroskopie) (Brecht *et al.*, 1997). Bei der Oberflächenplasmonenresonanz wird polarisiertes, monochromatisches Licht auf eine dünne Edelmetallschicht eingestrahlt, an der es zur Totalreflexion kommt. Die Edelmetallschicht befindet sich auf einem Glasprisma. Das Licht kann nun mit den freien Elektronen des Edelmetalls interagieren, die ein sogenanntes "Elektronenplasmon" ausbilden. Kommt es zur Resonanz, tritt im reflektierten Licht eine Energielücke auf, die einen ganz bestimmten Winkel aufweist. Die Resonanz und damit der Winkel sind direkt proportional zum Beladungsgrad der Oberfläche (Gauglitz 2005). Vorteile dieser Nachweismethode sind die markierungsfreie Detektion des Analyten und die Möglichkeit für Echtzeituntersuchungen (Lao *et al.*, 2009). Weiterhin muss man bei optischen Methoden zusätzlich zwischen Detektion mit oder ohne Fluoreszenzmarkierung unterscheiden. Letztere ermöglichen durch Verwendung von Fluorophoren einen sensitiveren Nachweis des Analyten (Abel *et al.*, 1996).

Der am weitesten verbreitete akustische Biosensor ist die Quarzmikrowaage, welche aus einer Quarzkristallscheibe besteht, die von Elektroden umgeben ist. Nach Anlegen einer Spannung führt der Kristall Schwingungen einer bestimmten Frequenz aus, die

proportional zur mechanischen Beanspruchung des Kristalls sind (Liu *et al.*, 1996). Unter anderem konnte mit diesem Prinzip ein Biosensor zur Detektion medizinisch relevanter *messenger RNAs* (mRNAs) entwickelt werden (Zhang *et al.*, 2006).

Daneben existieren noch kommerzielle Biosensoren, die auf Hitze- (Isothermale Titrationskalorimetrie) bzw. magnetisch-basierter Signalumwandlung basieren (Baselt *et al.*, 1998; Cooper 1999).

Die wichtigsten Anforderungen an einen Biosensor sind Selektivität, Sensitivität, Reproduzierbarkeit, Regenerierbarkeit und mögliche Integration in ein handhabbares Gerät (Gooding 2002). Grundsätzlich können Biosensoren in allen Bereichen der chemischen Analyse Anwendung finden, falls ein schnelles, genaues und räumlich nah am Probenahmeort benötigtes Messergebnis (*Point-of-Care*) gefordert ist. Dies betrifft vor allem die Bereiche der Umwelt-, Lebensmittel- und Medizindiagnostik (Lazcka *et al.*, 2007).

1.1.1 DNA-Biosensoren

Die Entschlüsselung der Genomsequenzen zahlreicher Organismen brachte eine enorme Datenmenge hervor. Mittels traditioneller Methoden, wie Northern Blot (Alwine *et al.*, 1977) und Reverse Transkriptase-PCR wäre die Analyse derartiger Datenmengen nicht zu bewältigen gewesen. Mitte der 1990er Jahre wurde der „*DNA microarray*“ entwickelt (Skena *et al.*, 1995; Marshall & Hodgson 1998). *Microarrays* erlauben die Hochdurchsatzanalyse von Genexpressionsmustern und DNA-Sequenzen vieler tausender Gene in einem einzigen Ansatz.

Ein DNA-Biosensor wird zur Detektion der Nukleinsäurehybridisierung verwendet. Allen DNA-Biosensoren ist folgendes Funktionsprinzip gemein: Im ersten Schritt werden die Fängersonden auf der Chipoberfläche immobilisiert, welche im zweiten Schritt mit den Analyten, d.h. mit komplementären Abschnitten der Nukleinsäuremoleküle aus der zu analysierenden Probe, hybridisieren. Im dritten Schritt wird die Hybridisierungsreaktion in ein physikalisches Messsignal umgewandelt (Abb. 1-2).

Hybridisierungsereignisse können entweder durch direkte DNA/DNA-Wechselwirkung oder durch Mehrkomponenten-Systeme detektiert werden (Cosnier & Mailley 2008). Die wohl bekannteste und am meisten verwendete Methode ist der Nachweis von Nukleinsäure mittels dem *Sandwich-Assay* (Nicholls & Malcolm 1989). Dabei bindet ein Teil des Analyten an eine immobilisierte Fängersonde und ein anderer Teil an eine komplementäre und markierte Detektionssonde. Im Idealfall bringt die zweifache Hybridisierungsreaktion eine Erhöhung der Sensitivität und Selektivität mit sich.

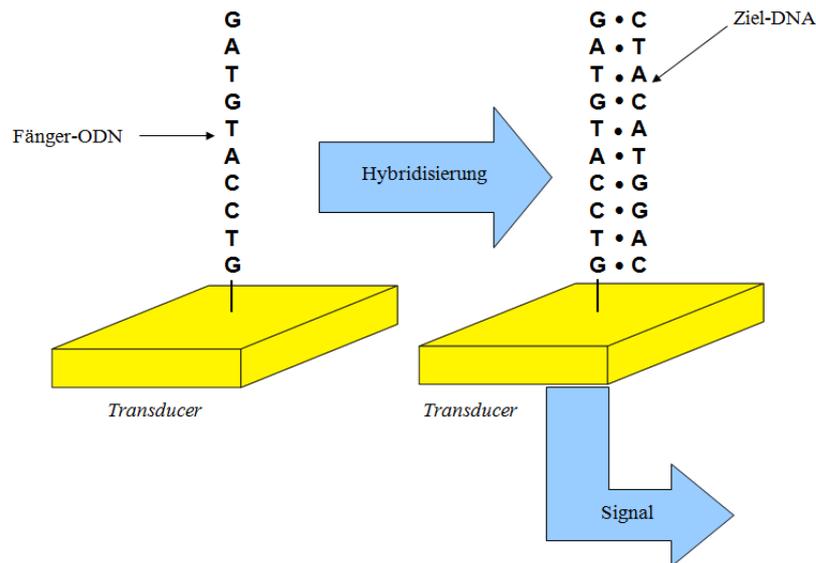


Abbildung 1-2: **Grundlegende Schritte der Detektion einer spezifischen DNA-Sequenz mit Hilfe eines Nukleinsäure-Biosensors.** Der *Transducer* wandelt das Hybridisierungsereignis in ein elektronisches Signal um (nach Pöhlmann *et al.*, 2007).

Elektrochemische Nukleinsäure-Biosensoren haben in den letzten Jahren eine besondere Beachtung als vielversprechende Alternative zu anderen etablierten Nachweismethoden erfahren, da sie einfach miniaturisierbar sind und kostengünstig hergestellt werden können (Wang 2006). Zudem benötigen elektrochemische Biosensoren keine teuren optischen Geräte oder aufwendige Software zur Signalverarbeitung, da sie nach Analyterkennung unmittelbar ein elektrisches Signal erzeugen (Drummond *et al.*, 2003). Im Allgemeinen lassen sich direkte und indirekte Detektionsmethoden unterscheiden. Die ersten Veröffentlichungen zur Elektrochemie von Nukleinsäuren erschienen Ende der 1950er Jahre (Palecek 1960; Palecek 1961). Dabei wurden elektrochemische Oxidations- und Reduktionssignale der Nukleotide Adenin, Cytosin und Guanin an einer Quecksilberelektrode mittels Polarographie gemessen (Übersichtsartikel Palecek 2002).

Andere elektrochemische DNA-Biosensoren beruhen auf interkalierenden organischen Substanzen oder die DNA-Doppelhelix bindende elektroaktive Substanzen (Hashimoto *et al.*, 1994; Kerman *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2006). Am weitesten verbreitet ist das Anbringen eines Reporterenzym zur elektrochemischen Detektion der DNA-Hybridisierung (Alfonta *et al.*, 2001a; Elsholz *et al.*, 2006). Das an einem DNA-Strang gebundene Reporterenzym wird nach Hybridisierung an immobilisierte komplementäre Fängeroligosoxynukleotide auf der Elektrode immobilisiert und katalysiert die Bildung eines detektierbaren, elektroaktiven Produkts. Eine ebenfalls häufig angewandte Methode ist die Synthese eines Ferrocen-markierten DNA-Strangs zum elektrochemischen Nachweis von Hybridisierungsereignissen (Umek *et al.*, 2001).

Eine elegante Alternative zu den vorher genannten Nachweismethoden stellt der elektrochemische *Molecular Beacon* dar (Wang *et al.*, 2009). Dabei wird eine Stamm-Schleife-Struktur auf einer Goldelektrode immobilisiert (Abb. 1-3). Der Stamm ist an einem Ende mit einem Methylenblau-Molekül markiert, das sich im geschlossenen Zustand in der Nähe der Goldelektrode befindet und somit einen effizienten Elektronentransfer gewährleistet. Nach Hybridisierung der Zielnukleinsäure mit der Schleife des *Molecular Beacon* kommt es zur Öffnung der Haarnadelstruktur und demzufolge zu einem vergrößerten Abstand zwischen dem Methylenblau-Molekül und der Elektrodenoberfläche. Dies vermindert den Elektronentransfer und das elektrochemische Signal nach Hybridisierung nimmt ab (Fan *et al.*, 2003).

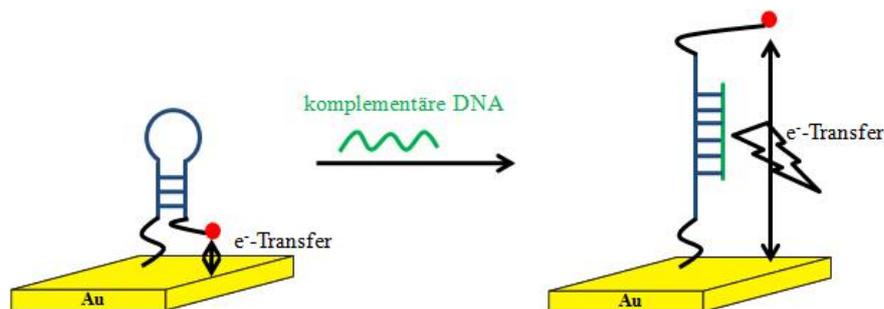
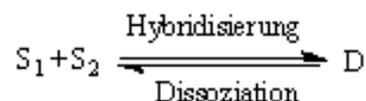


Abbildung 1-3: **Prinzip des elektrochemischen *Molecular Beacon*-Biosensors.** Eine Stamm-Schleife-Struktur ist an einem Ende über eine Thiolgruppe auf der Goldelektrode immobilisiert. Am anderen Terminus trägt der Stamm eine Methylenblau-Gruppe (rot). Nach Hybridisierung komplementärer DNA (grün) kommt es zu einer konformationellen Änderung des *Molecular Beacon*, die die Methylenblau-Gruppe von der Goldelektrode entfernt und den Elektronentransfer unterbindet.

1.1.2 Nukleinsäurehybridisierung

Voraussetzung für ein Verständnis der Nukleinsäurehybridisierung ist die Kenntnis vom Aufbau des Trägers der genetischen Information. Watson und Crick haben die Struktur der DNA-Doppelhelix 1953 aufgelöst (Watson & Crick 1953). Zwei anti-parallel verlaufende DNA-Einzelstränge (S_1 und S_2) können aufgrund der Basenpaarung zwischen Adenin und Thymin bzw. zwischen Guanin und Cytosin (Watson-Crick-Basenpaarung) und der hydrophoben Basenstapelungswechselwirkung zur DNA-Doppelhelix (D) assemblieren.



Erhitzen eines Doppelstranges führt zum Aufbrechen der Doppelhelix und beide DNA-Einzelstränge werden getrennt (Denaturierung). Die Temperatur, bei der 50% der DNA im einzelsträngigen Zustand vorliegen, bezeichnet man als Schmelztemperatur T_m . Ein erneutes Abkühlen ermöglicht die erneute Ausbildung der komplementären Basenpaarung und somit die Bildung der doppelsträngigen DNA (dsDNA). Dieser Prozess wird als Hybridisierung bezeichnet. Die Hybridisierung hängt von einer Vielzahl von Parametern, wie Temperatur, Ionenstärke, pH-Wert und der Reaktionszeit

ab. Die Parameter der Nukleinsäurehybridisierung in Lösung wurden ausführlich untersucht (Cantor & Schimmel 1980). Es wurde gezeigt, dass die Hybridisierung von zwei DNA-Strängen in zwei Phasen abläuft. Im ersten Schritt kommt es zur Ausbildung doppelsträngiger Bereiche zwischen einigen Basen (*nucleation*). Hieran schließt sich eine sehr schnell verlaufende zweite Phase an, bei der der Rest des Doppelstranges gebildet wird (Wetmur & Davidson 1968). Je kürzer die Nukleinsäure-Stränge sind, desto früher kommt es zum Zusammenstoß und zur Ausbildung des Assoziationskomplexes.

1.1.2.1 Thermodynamische Aspekte der Nukleinsäurehybridisierung

Die thermodynamische Stabilität einer DNA-Doppelhelix wird in der Regel als die Schmelztemperatur angegeben. Diese ist abhängig von der Länge des Oligodesoxyribonukleotids (ODNs), der Sequenz und der Zusammensetzung des Lösungsmittels. Die Berechnung des T_m -Wertes von DNA-Doppelsträngen erfolgt mittels der so genannten *nearest neighbour*-Methode (Breslauer *et al.*, 1986). Sie beruht auf der Beobachtung, dass die Schmelztemperatur nicht nur von der Basenzusammensetzung, sondern auch von der Sequenz des ODNs abhängt (SantaLucia, Jr. 1998). Dabei wird die Gibbsche freie Energie bei einer bestimmten Temperatur T anhand der Gleichung (2.1) bestimmt.

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (2.1)$$

Dabei bezeichnen H^0 und S^0 die Enthalpie bzw. Entropie. Daraus lässt sich durch Ableitung aus der van't Hoff-Gleichung die in Gleichung (2.2) dargestellte Beziehung zwischen Schmelztemperatur T_m [°C] und den thermodynamischen Parametern ableiten (SantaLucia, Jr & Hicks 2004). Dabei bezeichnet R die allgemeine Gaskonstante (1,9872 kal/K×mol) und c_T die DNA-Konzentration [mol].

$$T_m = \Delta H^0 \times 1000 / (\Delta S^0 + R \times \ln(c_T / 4)) - 273,15 \quad (2.2)$$

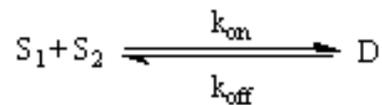
Verschiedene Faktoren beeinflussen die Stabilität des DNA-Doppelstranges. Je höher der Gehalt an GC-Basenpaaren in einem Duplex ist, desto stabiler wird er. Grund dafür ist nicht nur die zusätzliche Wasserstoffbrücke pro GC-Basenpaarung, sondern auch die verbesserte Basenstapelung bei GC-Nachbarn (Protozanova *et al.*, 2004). Auch die Art der Nukleinsäure hat einen Einfluss auf die Stabilität des Doppelstranges. Ist mindestens ein Assoziationspartner RNA, so erhöht sich die Stabilität des Nukleinsäure-Doppelstranges aufgrund des kompakteren Aufbaus der Helix (Sugimoto *et al.*, 1995). Dieser kommt durch geringere *tilt*-Winkel (Winkel der Längsachse des Basenpaars zur Senkrechtachse der Helix) der RNA zustande. Bei Nukleinsäure handelt es sich um einen Polyelektrolyten. Der Einfluss der Salzionenkonzentration auf die Ausbildung eines Duplexes besteht in der Abschirmung der negativen Ladungen des Phosphatrückgrates (Granot 1983). Das Verhalten eines ODNs wird durch die Fixierung an eine Oberfläche sterisch eingeschränkt. Die Konformation der auf einer Elektrode

immobilisierten DNA-Doppelhelix ist abhängig von der Stärke der Wechselwirkung zwischen Elektrodenoberfläche und dem DNA-Strang. Auf einer positiv-geladenen Oberfläche wurde bevorzugt eine asymmetrische nicht-helikale DNA-Doppelhelix-Konformation gefunden (Lemeshko *et al.*, 2001).

Nach Anpassung der *nearest neighbour*-Methode durch die Verwendung einer Langmuir-Isotherme ist es möglich eine direkte Korrelation zwischen der freien Energie in Lösung und der Hybridisierungsintensität für immobilisierte DNA herzustellen (Weckx *et al.*, 2007). Die optimale Hybridisierungstemperatur liegt für DNA/DNA-Duplexes 15 – 30°C, für RNA/DNA-Duplexes 10 – 15°C unterhalb des Schmelzpunktes (Nygaard & Hall 1964). Bei der Analyse von einzelnen Fehlbasenpaarungen ist eine stringente Wahl der Hybridisierungstemperatur entscheidend. Wallace *et al.* (1979) verwendeten DNA-Stränge mit einer Länge von 14 – 20 Basen und stellten einen um bis zu 5°C reduzierten T_m -Wert bei einer einzelnen Fehlbasenpaarung fest. Eine einzige Fehlbasenpaarung wirkt sich in kurzen Sequenzen stärker auf den T_m -Wert aus als in längeren Sequenzen, was zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) genutzt werden kann (Kwok 2001).

1.1.2.2 Kinetik der Hybridisierung

In Lösung kann die DNA-Hybridisierung zweier DNA-Einzelstränge S1 und S2 zu einem Doppelstrang D als Reaktion zweiter Ordnung betrachtet werden.



Unter der Annahme, dass die beiden Einzelstränge S₁ und S₂ in gleicher Konzentration vorliegen und dass die Dissoziationskonstante k_{off} wesentlich kleiner als die Assoziationskonstante k_{on} ist, gilt nach Integration Gleichung (2.2).

$$\frac{c}{c_0} = \frac{1}{1 + k_{\text{on}} \times c_0 \times t} \quad (2.2)$$

Dabei bezeichnet c_0 die Anfangskonzentration der einzelsträngigen DNA und c die Konzentration der restlichen denaturierten DNA zur Zeit t . Aus den c_0 -Werten lassen sich die Hybridisierungszeiten für zwei DNA-Einzelstränge in Lösung abschätzen. Bei Festphasen-gebundenen Sonden dagegen reduziert sich die Hybridisierungsrate um den Faktor fünf bis zehn. Bei einem Überschuss an Probe verläuft die Reaktion annähernd erster Ordnung (Young & Paul 1973). Die Gleichung (2.3) zeigt den Zusammenhang zwischen Hybridisierungszeit $t_{1/2}$ [sek], zu der 50% Probe (Probenlänge L [bp] und Probenkonzentration c) mit immobilisierten Fängersonden reagiert haben (Meinkoth & Wahl 1984; Wetmur & Davidson 1968).

$$t_{1/2} = \frac{N \times \ln 2}{K_n \times (L^{1/2}) \times c} \quad (2.3)$$

Dabei bezeichnet N die Komplexität der Probe ($N \equiv L$ für eine Probe ohne repetitive Sequenzen) und K_n die Reaktionskonstante ($K_n = 3,5 \times 10^5$ für Na^+ -Konzentrationen im Bereich von 0,4 bis 1,0 M, pH 5,0 – 9,0 und einer Hybridisierungstemperatur von 25°C unter dem T_m).

Auf Grundlage experimenteller Daten zeigten Berechnungen der Hybridisierungsrate auf Oberflächen weiterhin, dass die Hybridisierungsgeschwindigkeit von der Diffusionsrate, der Immobilisierungsoberfläche und der Anzahl der Bindungsstellen abhängt (Ekins 1998; Hagan & Chakraborty 2004; Carletti *et al.*, 2006; Batchelor-McAuley *et al.*, 2009). Hier wird die Bedeutung der Miniaturisierung von Biosensoren ersichtlich, da ein kleineres Hybridisierungsvolumen die Diffusionsrate und kleinere Elektroden die Immobilisierungsfläche verringern, was Hybridisierungsbedingungen ähnlich denen in homogenen Lösungen schafft (Janasek *et al.*, 2006). Schnellere Hybridisierungskinetiken können auch mit Dextransulfat oder Polyethylenglykol erzielt werden. Dieser Effekt beruht auf der Fähigkeit dieser Substanzen, Wasser zu binden, ohne aber gleichzeitig auch Makromoleküle eindringen zu lassen, was zu einer Erhöhung der effektiven Konzentration der Sonde und damit zur Beschleunigung der Hybridisierungsrate führt (Ku *et al.*, 2004). Die sterische Freiheit immobilisierter DNA-Fänger muss gewährleistet sein, damit eine effiziente Hybridisierung stattfinden kann. So konnte durch Modellierungsversuche gezeigt werden, dass bei zu hoher Fängerkonzentration das Zielmolekül nicht mehr vollständig an ein einziges immobilisiertes Fängermolekül binden kann, sondern gleichzeitig an mehrere Fängermoleküle bindet (Jayaraman *et al.*, 2007).

1.2 Elektrochemischer Biosensor

1.2.1 Gold-Thiol-Wechselwirkung

Für die Entwicklung eines Biosensors ist die funktionelle Immobilisierung des biologischen Rezeptors eine der wichtigsten Voraussetzungen. Je nach Material und Beschaffenheit der Elektroden kommen dabei die unterschiedlichsten Methoden, wie Physisorption, kovalente Modifizierungen oder selbstorganisierte Monolagen zur Anwendung (Jonkheijm *et al.*, 2008). Entscheidend ist, dass eine ausreichend hohe Anzahl immobilisierter Rezeptormoleküle zur Verfügung steht und dass die Elektrodenoberfläche entsprechend vor unspezifischer Adsorption von Molekülen geschützt wird.

Geordnete monomolekulare Schichten an Grenzflächen, die durch spontane Adsorption aus Lösungen oder der Gasphase entstehen, werden selbstorganisierte Monolagen (*self assembled monolayer, SAM*) genannt. Zur Funktionalisierung von Goldelektroden bietet sich die Ausnutzung der starken Gold-Schwefel-Wechselwirkung an, um mittels terminal funktionalisierter Thiole eine reaktive Oberfläche zu schaffen (Love *et al.*,

2005). Für die Adsorption von Thiol-funktionalisierten Molekülen ergibt sich $\Delta G_{\text{ads}}^0 = -20$ kJ/mol, d.h. die Reaktion läuft spontan ab (Whitesides & Labini 1990). Zudem konnte mittels isotoopenmarkierten Thiolen ein Austausch zwischen gebundenen und in Lösung befindlichen Thiolen festgestellt werden (Schlenoff *et al.*, 1995). Theoretische Berechnungen und Strukturanalysen zeigten, dass eine lineare Anordnung der Thiolatgruppen auf Goldoberflächen energetisch begünstigt ist (Jadzinsky *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2008). Die Adsorption von Thiolen aus verdünnten Lösungen verläuft spontan, jedoch stellt die Ausrichtung der Kohlenstoffwasserketten an der Oberfläche den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Ausbildung von SAMs dar (Bain *et al.*, 1989). Die zwischenmolekularen Kräfte, v.a. van der Waals-Kräfte, sind umso größer, je langkettiger die Thiole sind. Langkettige Alkanthiole bilden also die stabilsten Monolagen aus (Prathima *et al.*, 2005).

Die Funktionalisierung von Goldelektroden mit ODN-Fängermolekülen geschieht meist mit terminal Thiol-modifizierten DNA-Strängen bei hoher Ionenstärke. Anschließend wird die Elektrode mit Mercaptohexanol behandelt, um unspezifische Interaktionen der DNA-Fänger mit der Goldelektrode zu unterbinden und die Goldelektrode abzusättigen (Herne & Tarlov 1997). Die Fängerdichte auf der Elektrode ist abhängig von der Länge der immobilisierten ODNs und der Salzkonzentration der Immobilisierungslösung (Steel *et al.*, 2000). Daneben wurde auch die effiziente Beschichtung von Goldelektroden mit Streptavidin und anschließend mit Biotin-modifizierten DNA-Molekülen beschrieben (Tombelli *et al.*, 2002).

1.2.2 Esterase 2 aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* als Reporterenzym

Bei der Esterase 2 (EST2) aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* handelt es sich um eine thermostabile, monomere Carboxylesterase (EC 3.1.1.1) mit einem Molekulargewicht von 34 kDa und einem pH- und Temperaturoptimum von 7,0 bzw. 70°C (Manco *et al.*, 1998). Erstmals wurde sie von Hemila *et al.* (1994) aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* isoliert und zeigte eine Substratspezifität für *p*-Nitrophenylester mit linearen Acylketten (De Simone *et al.*, 2000). Aufgrund Aminosäuresequenzhomologie und enzymatischer Aktivität wurde sie der Familie der Hormon-sensitiven Lipasen zugeordnet (Holm *et al.*, 1988; Hemila *et al.*, 1994).

Die Röntgenstrukturanalyse zeigte, dass EST2 eine typische α/β -Hydrolasefaltung aufweist und eine katalytische Triade aus Ser155, Asp252 und His282 besitzt (De Simone *et al.*, 2000) (Abb. 1-4). Die Notwendigkeit der katalytischen Triade für die Enzymaktivität wurde mittels Mutageneseexperimenten bestätigt (Hemila *et al.*, 1994; Manco *et al.*, 2001; Agafonov *et al.*, 2005a). Aufgrund der monomeren Struktur und des kleinen hydrodynamischen Radius der EST2 eignet sie sich sehr gut als Reporterenzym für Biosensoren. Darüber hinaus kann sie durch Austausch eines oberflächenexponierten Glutamarestes zu einem Cysteinrest ortsgerichtet an DNA-Stränge gekoppelt werden (Wang *et al.*, 2007). So wurde die EST2 bereits als

Reporterenzym für *in vitro*-Transkription/Translationsversuche (Agafonov *et al.*, 2005b; Koch *et al.*, 2008) und als Reporterenzym für den Nachweis von DNA/DNA-Hybridisierung verwendet (Wang *et al.*, 2007). Weiterhin wurde das Potential der EST2 für den Einsatz als Enzybiosensor zum sensitiven Nachweis von Pestiziden demonstriert (Febbraio *et al.*, 2008; Manco *et al.*, 2009).

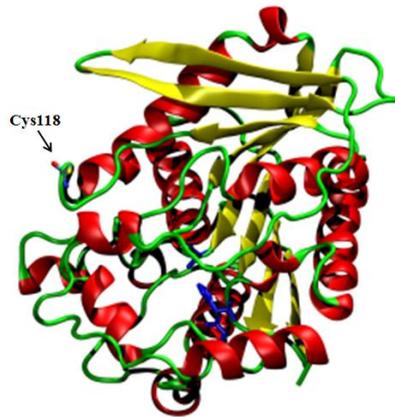


Abbildung 1-4: **Dreidimensionale Struktur der Esterase 2 aus *Alicyclobacillus acidocaldarius*.** α -Helices sind rot, β -Stränge gelb dargestellt. Die Aminosäurereste der katalytischen Triade sind blau hervorgehoben und der für die Konjugation mit einem DNA-Strang vorgesehene oberflächenexponierte Cysteinrest ist mit einem Pfeil markiert (modifiziert nach De Simone *et al.*, 2000).

1.2.3 Funktionsprinzip des elektrochemischen Biosensors

Das in dieser Arbeit verwendete elektrochemische Detektionssystem wurde von der Siemens AG in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Sprinzl entwickelt (Wang *et al.*, 2007). Die Grundlagen der Detektion sind dabei eine Regeneration (*Redox-Recycling*) des elektroaktiven Produktes (Niwa *et al.*, 1993; Nebling *et al.*, 2004) und die Verwendung von Esterase 2-ODN-Konjugaten zur direkten Markierung der Hybridisierung mit einem Reporterenzym (Wang *et al.*, 2007). Im einfachsten Fall, der so genannten Zwei-Komponenten-Hybridisierung, werden Thiol-modifizierte DNA-Fänger auf der Goldelektrode immobilisiert. Anschließend erfolgt die Hybridisierung mit einem komplementären EST2-ODN-Konjugat (Abb. 1-5). Bei vollständiger Komplementarität wird die EST2 auf der Goldelektrode immobilisiert und katalysiert die Hydrolyse des Substrats *p*-Aminophenylbutyrat (pAPB) zum elektroaktiven *p*-Aminophenol (pAP). Durch Umpolen der Elektrodenpotentiale entsteht ein *Redox-Recycling*-Prozess zwischen *p*-Aminophenol und Quinonimin, in Folge dessen stetig Elektronen produziert werden, welche amperometrisch detektiert werden können. Diese Art der Anbindung von Enzymen an Oberflächen, die eine gerichtete Orientierung des Reporterenzym erlaubt, wird als DNA-vermittelte Immobilisierung bezeichnet (Niemeyer *et al.*, 1994; Niemeyer 2002).

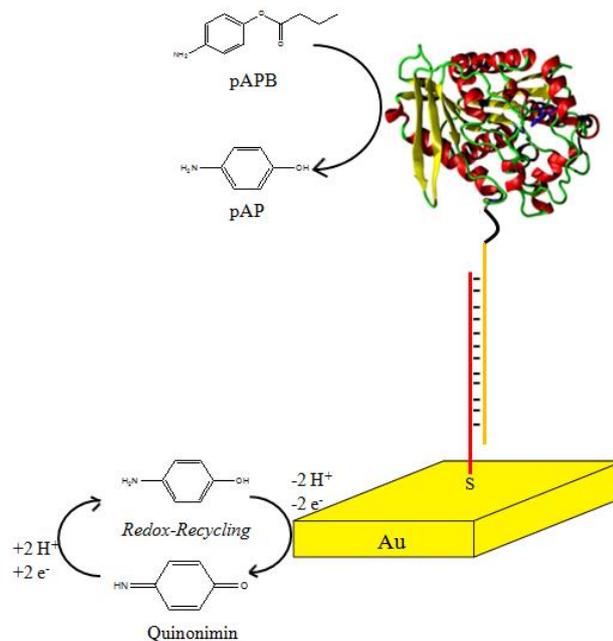


Abbildung 1-5: **Detektion von immobilisierter DNA mittels EST2-ODN-Konjugat.** Die Immobilisierung des Reporterenzym EST2 an die Goldelektrode erfolgt durch Hybridisierung von immobilisiertem Fänger-ODN (rot) und einem EST2-ODN-Konjugat (gelb). EST2 katalysiert die Hydrolyse von pAPB zu pAP. In Folge des *Redox-Recycling*-Prozesses zwischen pAP und Quinonimin werden kontinuierlich amperometrisch messbare Elektronen generiert.

1.3 Applikationsmöglichkeiten

Grundsätzlich unterscheidet man bei der Analytik von Nukleinsäuren zwischen Untersuchungen auf DNA- und RNA-Ebene. Die DNA-Analytik beschäftigt sich mit dem Nachweis bestimmter Zielsequenzen im Genom eines Organismus. Dabei können die unterschiedlichsten Fragestellungen, wie etwa die Detektion von Punktmutationen oder die Identifizierung von gentechnisch veränderten Organismen (GMOs) in Lebensmitteln, behandelt werden (Wan *et al.*, 2009; Holst-Jensen *et al.*, 2003). Dagegen befasst sich die RNA-Analytik mit dem Status der Genexpression durch Analyse verschiedener RNA-Spezies, z.B. Boten-RNA (*messenger*RNA, mRNA), ribosomaler RNA (rRNA), Transfer-RNA (tRNA) und kleiner RNA (*small*RNA). So ist etwa bereits heute die Detektion von mRNA-Biomarkern für die Krebsdiagnostik wichtig (Varambally *et al.*, 2002). Darüberhinaus gewinnt die Expressionsanalyse von microRNAs immer mehr an Bedeutung für die schnelle Tumordiagnostik (Abschnitt 1.3.2) (Lee & Dutta 2009). Die Detektion von prokaryontischer 16S rRNA erlaubt den kultivierungsunabhängigen Nachweis von Mikroorganismen in Blut, Lebensmitteln oder Umweltproben (Palchetti & Mascini 2008; Feazel *et al.*, 2009). Für alle Betriebe in der Lebensmittelindustrie gelten Hygienevorgaben, mikrobiologische Kriterien und die Verpflichtung zur Durchführung von Eigenkontrollen. Zentrale Bedeutung hat hierbei eine zeitnah zum Produktionsfluss durchzuführende mikrobiologische Diagnostik, um eine Verzögerung der Prozesskette und der Produktfreigabe zu vermeiden. Diese

Diagnostik zur Erfassung von mikrobiologischen Qualitäts- und Sicherheitsparametern ist generell zeitaufwändig, vergleichsweise teuer, nicht vor Ort durchführbar und eine Hürde für schnelle Entscheidungsprozesse innerhalb der Lebensmittelproduktion.

Es existiert ein Bedarf nach schnellen, kostengünstigen und dennoch sensitiven RNA-Nachweismethoden, die optimalerweise am Ort der Probennahme durchgeführt werden können und wenig Probenvorbereitungsschritte benötigen (so genannte *Point-of-Care*-Anwendungen).

Im Folgenden sollen einige bestehende Biosensor-Anwendungen in der Nukleinsäureanalytik beschrieben werden.

1.3.1 Detektion von Mikroorganismen

Die Detektion pathogener und hygienerrelevanter Mikroorganismen ist v.a. für die Lebensmittelindustrie, die klinische Diagnostik, die Pharmaproduktion und die Umweltanalyse von großer Bedeutung (Lazcka *et al.*, 2007). Nukleinsäure-Biosensoren sind eine schnelle, einfache und günstige Alternative zu konventionellen mikrobiologischen Methoden (Call 2005). Letztere nutzen die selektive Anreicherung der gesuchten Bakterien, die Identifizierung und Auszählung auf chromogenen Medien und die biochemische Charakterisierung (de Boer & Beumer 1999). Diese Nachweisprozedur benötigt jedoch je nach Mikroorganismus zwei bis fünf Tage und länger.

Die Detektion von Mikroorganismen mittels spezifischer Antikörper ist in der Diagnostik zurzeit die am weitesten verbreitete Methode (Lazcka *et al.*, 2007). Immunosensoren mit Antikörpern als biologisches Erkennungssystem wurden mit einer Vielzahl an Signalumwandlern gekoppelt und für die Analyse verschiedener Analyte entwickelt (Jiang *et al.*, 2008). Die Immobilisierung der Antikörper in möglichst reproduzierbarer Art und Weise ist für einen sensitiven und selektiven Analytnachweis wichtig (Baldrich *et al.*, 2008). Fan *et al.* (2008) koppelten das F_c-Fragment (kristallines Fragment) eines Antikörpers spezifisch an ein ODN und gewährleisteten somit eine gerichtete Immobilisierung. Gleichzeitig erreichten sie so die Möglichkeit eines adressierbaren Biochips, was die Detektion einiger Blutplasmaproteine innerhalb von zehn Minuten ermöglichte. Je nach Signalumwandlungsmethode und Spezifität des Antikörpers erreicht man mit Antikörper-basierten bakteriellen Nachweissystemen Detektionsgrenzen im Bereich von 10³ – 10⁷ Kolonie bildende Einheiten (KbE) (Gehring *et al.*, 2008; Wolter *et al.*, 2008; Seidel & Niessner 2008).

Aufgrund der meist geringen Sensitivität von Immunosensoren halten immer mehr Nukleinsäure-basierte Nachweismethoden Einzug in die Diagnostik (Dineva *et al.*, 2005). Bei den im Folgenden beschriebenen Nachweismethoden handelt es sich stets um eine Nukleinsäure-basierte Detektion von Mikroorganismen.

Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) stellt eine schnelle Methode zur Bakterienidentifikation direkt von Abstrichen oder anderen Proben dar. Dabei setzt man

eine Fluoreszenz-markierte DNA-Sonde ein, welche mit der prokaryontischen 23S oder 16S rRNA hybridisiert. Das dadurch generierte optische Signal wird mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert (Yilmaz & Demiray 2007). Aufgrund des apparativen Aufwandes und der benötigten Mikroskopie-Kenntnisse ist diese Methode in der Routineanalytik nicht anwendbar.

Eine der heute am häufigsten verwendeten Methode zum Nachweis von pathogenen Keimen ist die Polymerasekettenreaktion (PCR). Sowohl in der klinischen Diagnostik als auch in der Lebensmittelindustrie wurden für zahlreiche relevante Bakterienspezies spezifische und sensitive PCR-Systeme entwickelt (Übersichtsartikel von Nikkari *et al.*, 2002 bzw. Settanni & Corsetti 2007). Nachteile des Bakteriennachweises mittels PCR sind die Notwendigkeit von entsprechender Laborausstattung und geschultem Personal und der Verlust der Quantifizierbarkeit. Problematisch ist weiterhin die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Mikroorganismen, da die PCR lediglich intakte DNA als Zielanalyt verwendet. Somit kann eine positive PCR-Reaktion unter Umständen auch von toten Zellen verursacht werden (Rijpens & Herman 2002). RNA-amplifizierende Methoden (z. B. *nucleic acid sequence based amplification*, NASBA oder *transcription mediated amplification*, TMA) umgehen dieses Problem, da sie rRNA oder mRNA als Zielmatrize verwenden, die in toten Zellen wesentlich schneller abgebaut wird als DNA (Hill 2001; Cook 2003; Lo & Baeumner 2007). Eine quantitative Aussage erlaubt die Echtzeit-PCR-Technologie (*real time PCR*) unter Verwendung von Fluoreszenz-markierten Sonden (Übersichtsartikel von Espy *et al.*, 2006). Jedoch haben auch diese Methoden den Nachteil, dass sie nur sehr schwierig automatisierbar sind und die Analyse nicht vor Ort von ungeübtem Personal durchgeführt werden kann. Eine vielversprechende Verbesserung ist die Kombination von PCR und Mikrofluidik, was die Analysenzeit für die Detektion von fünf Kolonie bildenden Einheiten (KbE) *Erwinia herbicola* innerhalb von sieben Minuten ermöglichte (Belgrader *et al.*, 1999).

In den letzten Jahren wurden Sequenzierungsmethoden in Hinblick auf Hochdurchsatzanalyse, Kostengünstigkeit und Automatisierbarkeit enorm weiterentwickelt. Zurzeit dominiert noch die Methode der Sanger-Sequenzierung, jedoch wird diese in absehbarer Zeit von anderen Technologien, wie Pyrosequenzierung oder Einzelzellsequenzierung verdrängt werden (Graveley 2008; Chi 2008; Blow 2008). Eine Kombination aus Emulsions-PCR und Pyrosequenzierung findet man z. B. im *GenomeSequencer FLX* (Roche Diagnostics, Mannheim). Zurzeit können etwa 20 Millionen Nukleotide innerhalb von vier Stunden sequenziert werden (Poland 2006). Die enorme generierte Datenmenge benötigt jedoch leistungsstarke Bioinformatik-Software.

Eine Vielzahl von Festphasenhybridisierungssystemen zum Nachweis Fluoreszenz-markierter bakterieller Nukleinsäure wurden im Laufe der letzten Jahre entwickelt (van der Pol *et al.*, 2000; Jardi *et al.*, 2009). Bisher werden häufig Fluoreszenz-basierte *Microarrays* mit Hunderten bis Tausenden Fänger-molekülen zur Analyse von

Nukleinsäuren verwendet (Anthony *et al.*, 2005; Loy & Bodrossy 2006; Jaing *et al.*, 2008). Jedoch ist der Aufbau zur optischen Signaldetektion eher komplex. Zusätzlich wurde in einigen Studien ein negativer Effekt der Probenmatrix auf die Fluoreszenzeigenschaften verwendeter Fluorophore festgestellt, was die Sensitivität der Analysenmethode beeinträchtigt (von Winzingerode *et al.*, 1997).

Deshalb wird die Entwicklung von elektrochemisch-auslesbaren DNA-Biosensoren, die gleichzeitig eine hohe Sensitivität und schnelle und günstige Messergebnisse gewährleisten, stark vorangetrieben (Hintsche *et al.*, 2000; Drummond *et al.*, 2003). Die Möglichkeit, tragbare Instrumente, die am Ort der Analyse eingesetzt werden können, zu entwickeln, ist ein weiterer Vorteil der elektrochemischen Signalumwandlung (Wang 2006). Metall-Nanopartikel finden ebenfalls einen vielfältigen Einsatz für die elektrochemische Detektion von Nukleinsäuren (Merkoçi 2007). Die von Park *et al.* (2002) beschriebene Detektionsplattform nutzt Gold-Nanopartikel-modifizierte ODNs, welche die zu untersuchenden Nukleinsäuren nachweisen. Hierfür werden Fängeroligonukleotide in einem 20 µm breiten Spalt zwischen zwei Mikroelektroden immobilisiert. Die Nanopartikel-modifizierten Detektionssonden werden über eine *Sandwich*-Hybridisierung mit den Fängersonden und der Analytnukleinsäure zwischen den Elektroden gebunden. Der Nachweis der Ziel-DNA erfolgt über eine anschließende Silberabscheidung, die zu einer Vergrößerung der Goldnanopartikel führt (Abb. 1-6). Die damit einhergehende Abnahme des elektrischen Widerstands kann über eine Leitfähigkeitsmessung detektiert werden. Mit dieser Methode wurden Nachweisgrenzen von bis zu 500 fmol einer synthetischen DNA erreicht (Park *et al.*, 2002). Eine Weiterentwicklung dieses Systems erlaubte die Unterscheidung verschiedener *Kitasatospora*-Stämme (Aktinomyzeten) über den elektrochemischen Nachweis von PCR-Produkten (Möller *et al.*, 2008).

Ein anderer Ansatz der elektrochemischen Detektion von Nukleinsäuren basiert auf dem Einsatz von Hybridisierungsindikatoren, wie z. B. Interkalatoren. Dabei handelt es sich um elektroaktive Verbindungen mit unterschiedlicher Affinität zu einzel- und doppelsträngiger DNA. Eine häufig verwendete elektroaktive Markierung ist die metallorganische Verbindung Ferrocen, mit der ein Detektionsoligonukleotid kovalent verknüpft wird (de-los Santoz-Alvarez *et al.*, 2004).

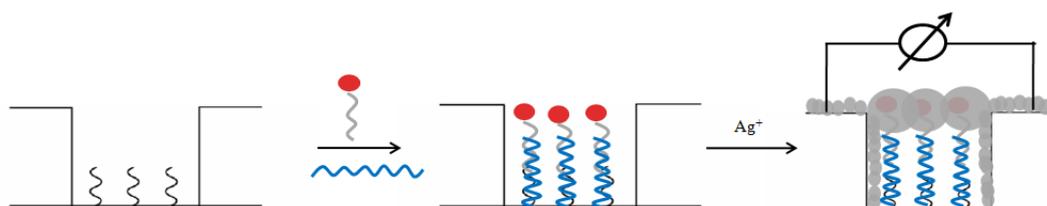


Abbildung 1-6: **Schema des Nucleinsäurenachweises mittels Goldnanopartikeln und anschließender Silberabscheidung.** Der Spalt zwischen zwei Mikroelektroden ist als Vertiefung dargestellt. Die immobilisierten Fängersonden sind schwarz, die Analyt-DNA blau und die Detektor-DNA grau

dargestellt. Kolloidale Goldnanopartikel sind als roter Kreis und die Silberabscheidung als graue Kreise abgebildet.

Die *Clinical Micro Sensors Division* (CMS) von *Motorola Life Sciences* (Pasadena, California, USA) hat einen elektronischen Biosensor (*eSensorTM Chip*) entwickelt, welcher mit Hilfe von Ferrocen-markierten Detektionssonden die Sequenz-spezifische Identifikation von Analytnukleinsäure erlaubt (Farkas 2001; Umek *et al.*, 2001). Das System basiert auf einem Einweg-Chip mit 16 – 36 Goldelektroden, auf welche eine Monoschicht aus Fängersonden aufgebracht wird. Die Ziel-Nukleinsäure wird über Sandwich-Hybridisierung mit den immobilisierten Fängeroligonukleotiden und Ferrocen-markierten Detektionsoligonukleotiden identifiziert (Abb. 1-7). Der Nachweis erfolgt mittels Voltammetrie. Hierfür wird das Elektrodenpotential variiert und der aus der Oxidation und Reduktion der Ferrocen-Markierungen resultierende Strom gemessen. Eine Anwendung ist die Identifizierung von verschiedenen humanen Papillomaviren (HPV) mittels PCR-Produkt-Nachweis. In klinischen Probenmaterial wurden mit diesem Ansatz 86% der HPV-Typen korrekt nachgewiesen (Vernon *et al.*, 2003). Seit 2005 wird der *eSensorTM Chip* von *Osmetech Molecular Diagnostics* (Pasadena, California, USA) vermarktet.

Schließlich kann der Nachweis von Nukleinsäuren auch durch den Einsatz von Enzymmarkierungen, welche ebenfalls eine Freisetzung von elektroaktiven Produkten bewirken, erzielt werden. Die Enzymaktivität führt zudem zu einer signifikanten Signalverstärkung (Hintsche *et al.*, 1997). Dabei kommen verschiedene Reporterenzyme, wie die Meerrettich-Peroxidase, Glukoseoxidase, Laccase oder Alkalische Phosphatase zum Einsatz. Der Nachweis der Nukleinsäuren erfolgt wiederum über eine Sandwich-Hybridisierung zwischen immobilisierten Fänger- und Detektionsoligonukleotiden und der Analytnukleinsäure. Das gebildete *Sandwich-Hybrid* wird anschließend über die Biotin-, Digoxigenin- oder Fluorescein-Modifikation der Detektionssonden mit dem Reporterenzym markiert.

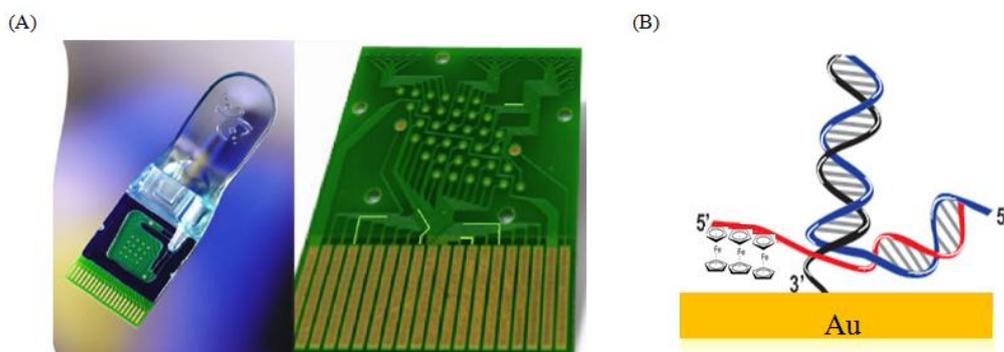


Abbildung 1-7: **Prinzip der *eSensorTM Chip-Technologie***. (A) Darstellung des *eSensorTM Chips*. (B) *Sandwich-Hybridisierung* zum Nachweis einer Analyt-DNA (blau) mittels immobilisierter Fängersonde (schwarz) und einem Ferrocen-markierten Detektoroligonukleotid (rot) (modifiziert nach Farkas 2001 und Vernon *et al.*, 2003).

Die Meerrettich-Peroxidase katalysiert die Reduktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser und wird dabei selbst oxidiert. Für die Regeneration des Enzyms wird ein geeigneter organischer Mediator durch die Meerrettich-Peroxidase oxidiert. Diese oxidierte Form des Mediators kann durch Anlegen eines Reduktionspotentials an der Elektrode reduziert werden. Der hieraus resultierende Strom ist direkt proportional zu der immobilisierten Enzymmenge und folglich auch der Zahl der hybridisierten Analyt-Nukleinsäuren (Gau *et al.*, 2005). Basierend auf diesem System hat die Firma *GeneFluidics, Inc.* (Monterey Park, California, USA) einen Biochip mit 16 Elektrodenpositionen entwickelt (Gau *et al.*, 2005). Elsholz *et al.* (2006) zeigten, dass mittels elektrochemischem Biochip ein direkter Nachweis von *E. coli* 16S rRNA möglich ist. Dazu verwendeten die Autoren interdigitale Goldelektroden, auf denen Bakterien-spezifische DNA-Fängermoleküle immobilisiert wurden, und ein biotinyliertes Detektor-ODN, welches an konservierte Bereiche der 16S rRNA bindet. Der Nachweis erfolgte über Anbindung eines Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugats und der Zugabe von *p*-Aminophenylphosphat, welches zum elektroaktiven *p*-Aminophenol gespalten wird. Dieses wird an den interdigitalen Elektroden einem *Redox-Recycling*-Prozess unterworfen und die dabei entstehenden Elektronen werden amperometrisch detektiert. Dieses Nachweissystem erreichte ein Detektionslimit für aufgereingte *E. coli* RNA von 21 ng, was etwa $4,0 \times 10^5$ KbE *E. coli* entspricht (Elsholz *et al.*, 2006).

Darüberhinaus kommen immer mehr Nanomaterialien in der Diagnostik zur Anwendung (Übersichtsartikel von Rosi & Mirkin 2005). So demonstrierten Hill *et al.* (2007) den Nachweis von 2,5 fM genomischer DNA aus *B. subtilis* durch optische Detektion der Aggregation von ODN-modifizierten Goldnanopartikeln nach Hybridisierung mit den komplementären DNA-Sequenzen (*Bio Bar Code-Assay*). Der Nachweis beruht auf der selektiven Bindung von zwei Sonden an spezifische Bereiche des bakteriellen Genoms. Dabei ist die eine Sonde mit magnetischen Partikeln, die andere mit Goldnanopartikeln verknüpft. Das gebildete *Sandwich*-Hybrid wird durch magnetische Separation von der restlichen Lösung abgetrennt und darauf die Sonden von der Oberfläche der Goldnanopartikel durch Behandlung mit Dithiothreitol freigesetzt. Diese werden durch auf Glasoberflächen immobilisierte Fängersonden und Goldnanopartikel-modifizierte Detektionsoligonukleotide und anschließender Silberabscheidung nachgewiesen (Abb. 1-8). Luo und Mitarbeiter nutzten DNA-Dendrimere als fluoreszierende Nanostrichcodes für den Parallelnachweis pathogener DNA. Die DNA-Dendrimere wurden jeweils mit einer unterschiedlichen Zahl grüner und roter Fluorophore modifiziert und trugen zusätzlich eine Zielmolekül-spezifische einzelsträngige Sondensequenz. Der Nachweis von Verhältnissen der Fluoreszenzintensität von grünen und roten Fluorophoren ermöglichte die eindeutige Identifizierung einzelner Zielmoleküle. Unter Verwendung von Durchflusszytometrie konnte eine rasche Detektion von bis zu 600 attomol synthetischer DNA-Zielmoleküle,

die aus Pathogenen wie *B. anthracis*, Ebola- oder SARS-Viren stammten, nachgewiesen werden (Li *et al.*, 2005; Um *et al.*, 2006).

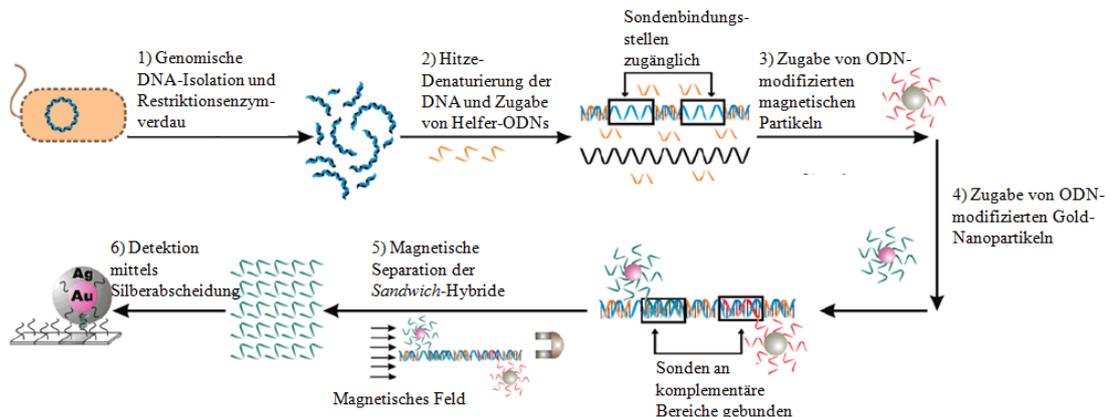


Abbildung 1-8: **Prinzip des Nachweises bakterieller DNA mittels Bio Bar Code-Assay** (modifiziert nach Hill *et al.*, 2007).

1.3.1.1 Die 16S rRNA als molekularer Marker

Die Arbeiten über 16S rRNA durch Woese *et al.* (1980) ermöglichten einen neuen Ansatz zur Analyse mikrobieller Ökosysteme. Die Analyse von 16S rRNA-Gensequenzen hat die Identifizierung und Taxonomie von Mikroorganismen revolutioniert (Abb. 1- 9). Die Vorteile von 16S rRNA als molekularer Marker zur Identifizierung von Bakterien liegen zum einen in deren ubiquitären Vorkommen in allen prokaryontischen Organismen, in denen diese eine essentielle Funktion in der Proteinbiosynthese ausübt und somit vor Mutationen geschützt ist. Funktionale 16S rRNA-Bereiche sind somit in allen Mikroorganismen konserviert, während Mutationen innerhalb von nicht-konservierten Sequenzbereichen der evolutionären Divergenz der Organismen entsprechen (Vaughan *et al.*, 2000). Zum anderen enthält eine exponentiell wachsende *E. coli*-Zelle bis zu 70.000 Ribosomen, d.h. auch 70.000 16S rRNA-Moleküle (Curtiss *et al.*, 1996). Die Verwendung von 16S rRNA zum Nachweis von Bakterien besitzt somit ein intrisches Amplifikationspotential. Ein weiterer Vorteil der 16S rRNA als molekularer Marker ist die große Zahl an frei zugänglichen Sequenzdaten, z. B. im Zuge des *ribosomal database projects* (Cole *et al.*, 2007). Desweiteren eignet sich die 16S rRNA besser zur Lebend/Tod-Unterscheidung von Mikroorganismen als die stabile DNA (Keer & Birch 2003).

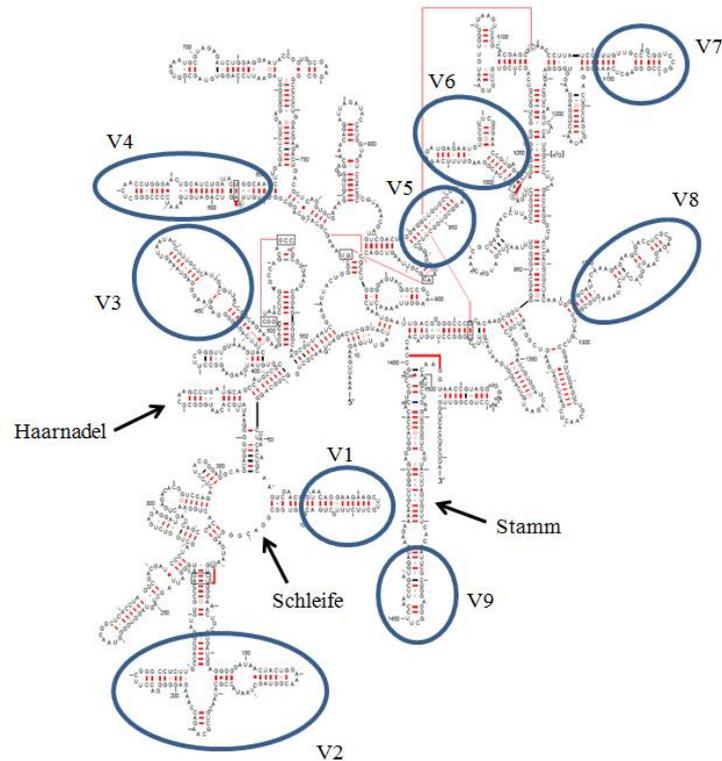


Abbildung 1-9: **Sekundärstruktur der 16S rRNA.** Die 16S rRNA umfasst, abhängig von der Spezies, 1450 bis 1550 Nukleotide. Nach der Transkription lagert sich das RNA-Molekül zu der für *E. coli* 16S rRNA dargestellten Tertiärstruktur zusammen. Charakteristisch für die Struktur der 16S rRNA ist die Ausbildung von Schleife-, Stamm- und Haarnadelstrukturen. Die blau markierten Sequenzabschnitte stellen Bereiche mit speziesspezifischen Sequenzvariabilitäten (V1 bis V9) dar (modifiziert nach Gutell *et al.*, 1985 und Woese *et al.*, 1980; <http://www.rna.icmb.utexas.edu>).

1.3.1.2 Methoden der RNA-Isolation

Der direkte Nachweis ribosomaler RNA setzt die effiziente RNA-Isolation aus Bakterienzellen voraus. In der wissenschaftlichen Literatur sind mehrere Methoden der RNA-Isolation aus Zellen und Geweben beschrieben, z. B. Zellyse gefolgt von Cäsiumchlorid-Ultrazentrifugation (Glisin *et al.*, 1974) oder Extraktion mit saurer Phenol-Chloroform-Mischung (Chomczynski & Sacchi 1987). Letztere findet Anwendung in mehreren kommerziellen Extraktionssystemen (z. B. Trizol, Invitrogen). Jedoch ist eine Automatisierung dieser Methoden sehr schwer (Chomczynski & Sacchi 1987). Deshalb setzten sich in den letzten Jahren vermehrt so genannte Festphasenisolationssysteme durch. Die Zellyse in Gegenwart von Guanidinthiocyanat gefolgt von der Nukleinsäureaufreinigung mittels Silikamembran findet breite Anwendung und wird von mehreren Unternehmen vertrieben (u.a. Qiagen, Promega, GE Healthcare) (Boom 1990; Boom *et al.*, 1990). Eine Kombination aus beiden Extraktionssystemen, d.h. Extraktion von RNA mit saurem Phenol-Chloroform und Silikamembran, wird verwendet, um sehr reine RNA zu isolieren. Anionenaustauscher bestehen aus einer Matrix, die multivalente kationische Gruppen besitzt. Das Rückgrat

von Nucleinsäuren dagegen enthält Phosphatgruppen, die oberhalb von pH 2 negativ geladen sind. Deshalb binden Nucleinsäuren hervorragend an Anionenaustauscher. Da die Stärke der Bindung für DNA, RNA und Proteine unterschiedlich ist und außerdem vom pH und der Ionenstärke abhängen, eignet sich diese Methode ebenfalls zum Aufreinigen von RNA aus Zelllysaten. Falls für die Nachweismethode fragmentierte RNA mit Proteinverunreinigungen ausreicht, ist auch eine alkalische Lyse der Bakterienzellen in Gegenwart von 1 M NaOH und die anschließende Detektion der RNA auf DNA-Biochips möglich (Liao *et al.*, 2006).

1.3.2 Detektion von microRNAs als Biomarker für die Krebsdiagnostik

MicroRNAs (miRNAs) sind kleine, 18 – 25 Nucleotide lange, nicht-kodierende RNA-Moleküle (Bartel 2009). Sie werden durch eine doppelstrangspezifische Ribonuklease, dem sogenannten *Dicer*, aus ihren haarnadelförmigen Vorstufen, den prä-miRNAs, freigesetzt (Abb. 1-10). Die reifen miRNAs können in Form von RNA-Proteinkomplexen die Translation der mRNA blockieren. Kürzlich wurde gezeigt, dass Krebszellen ein charakteristisches miRNA-Expressionsmuster aufweisen, welches sie von gesunden Zellen unterscheidet (Waldman & Terzic 2009). Verschiedene miRNA-Expressionsmuster in primären und metastasierenden Tumoren wurden untersucht und daraus eine auf miRNA-basierte Klassifizierung der Krebsmetastasen abgeleitet (Rosenfeld *et al.*, 2008). Zwei der am besten charakterisierten miRNAs, welchen eine direkte Rolle bei der Entstehung von chronisch-lymphatischer Leukämie vom B-Zelltyp (CLL) zugeschrieben wird, sind miR-15a und miR-16. Bei etwa 70% aller Patienten mit CLL ist die chromosomale Region, welche für diese beiden miRNAs kodiert, deletiert (Calin *et al.*, 2002). miRNAs könnten also neuartige Biomarkerkandidaten für die Krebsdiagnose sein, welche auch prognostische Informationen enthalten (Esquela-Kerscher & Slack 2006; Calin & Croce 2006; Mitchell *et al.*, 2008).

Aufgrund der kurzen Länge, der ähnlichen Nucleotidsequenzen und relativ niedrigen Expressionsraten erfordert die miRNA-Analyse sensitive und selektive Nachweismethoden (Wark *et al.*, 2008). Zurzeit werden miRNAs hauptsächlich mittels Northern Blot, PCR oder *Microarray*-Analyse nachgewiesen (Liang *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2005; Varallyay *et al.*, 2007; Siva *et al.*, 2009; Cissell & Deo 2009). Alle diese Nachweismethoden sind jedoch aufwendig, teuer und benötigen geschultes Personal. Moderne Detektionsmethoden, wie z. B. Nanopartikel-verstärkte SPR oder Biolumineszenz, halten Einzug in die miRNA-Analyse (Fang *et al.*, 2006; Cissell *et al.*, 2008). In der Regel benötigen diese Technologien aber meist die chemische oder enzymatische Modifikation der miRNAs oder die Verwendung von LNAs (*locked nucleic acids*) als Fängermoleküle, da diese die kurze miRNA thermodynamisch stabiler binden können als kurze DNA-Sonden (Vester & Wengel 2004). Desweiteren ist der apparative Aufwand für diese Arten der optischen Signalauslesung sehr hoch und teuer.

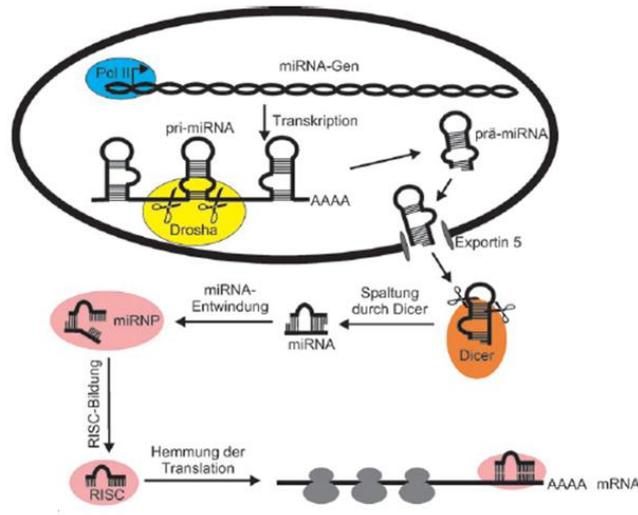


Abbildung 1-10: **Biogenese von microRNAs.** miRNA-kodierende Gene werden von der RNA-Polymerase II in primäre miRNAs (pri-miRNAs) transkribiert. Diese werden im Zellkern von einem Mikroprozessorkomplex, der unter anderem die RNase III Drosha enthält, in etwa 60 bis 70 Nucleotide lange Vorläufer-miRNAs (prä-miRNAs) prozessiert. Nach Exportin-5 vermitteltem Transport in das Cytoplasma der Zelle werden diese Stamm-Scheife-Strukturen von einer Ribonuklease III (Dicer) erkannt und in etwa 18 – 25 Nucleotide lange, nicht perfekt komplementäre miRNA:miRNA*-Duplexe gespalten. Ein Strang dieses Duplexes wird als mature miRNA anschließend in den Effektor-Komplex (*RNA-induced silencing complex*, RISC oder miRNA-enthaltender Ribonukleoproteinkomplex, miRNP) inkorporiert. Dieser erkennt, geleitet von der miRNA, vollständig oder nahezu komplementäre Bereiche am 3'-untranslatierten Ende der Ziel-mRNA und vermittelt in der Regel translationale Repression (modifiziert nach Arenz 2006).

1.4 Ziele der Arbeit

Vor dem Hintergrund des Bedarfs an schnellen, einfachen und sensitiven Biosensoren zum Nachweis bakterieller Keime in der Lebensmittelindustrie, aber auch der klinischen Diagnostik, bestand das Ziel dieser Arbeit in der Etablierung eines elektrochemischen bakteriellen Nachweissystems beruhend auf 16S rRNA-Hybridisierung und der Verwendung eines neuartigen Reporterenzym, der EST2.

Dazu sollten alle biochemischen Parameter der Nucleinsäurehybridisierung auf Oberflächen untersucht und optimiert werden. Erkenntnisse zur Funktionalisierung der Elektroden, Oberflächenbeschichtung, zur Wahl der Hybridisierungsbedingungen und zur Konstruktion des EST2-ODN-Reporterkonjugats sollten gewonnen und entsprechend angewandt werden. Eine Signalamplifikation und damit eine Erhöhung der Sensitivität sind erstrebenswert. Deswegen sollten unterschiedliche Ansätze der Signalamplifikation getestet und verglichen werden.

Nach erfolgreicher biochemischer Optimierung sollte an verschiedenen Beispielen die Anwendbarkeit der Nucleinsäurehybridisierung und der elektrochemischen Detektion demonstriert werden.

Ziel ist eine selektive und sensitive Bakteriendetektion mittels *Sandwich*-Hybridisierung auf einer elektrochemischen Plattform ohne vorherige PCR-Amplifikation. Nach vollständiger Charakterisierung in Hinblick auf Selektivität und Sensitivität sollte dieses Nachweissystem mit realen Lebensmittelproben evaluiert werden. Dabei wurde die selektive Identifizierung von *E. coli* als Hygiene-relevantem Keim angestrebt und der auf 16S rRNA-Hybridisierung beruhende Nachweis mit konventionellen mikrobiologischen Methoden verglichen.

Unter Anwendung der bei der bakteriellen 16S rRNA-Detektion gewonnenen Erkenntnisse sollten weitere Applikationsmöglichkeiten dieses auf Nukleinsäurehybridisierung basierenden Systems entwickelt werden. Ein großes analytisches Problem besteht derzeit im Nachweis von miRNAs, denen seit Kurzem eine Rolle bei der Tumorgenese zugeschrieben wird. Es sollte demonstriert werden, ob die Sensitivität und Selektivität der RNA/DNA-Hybridisierung zum direkten Nachweis von miRNAs ausreicht und dieses System gegebenenfalls mittels RNA aus eukaryontischen Zellen evaluiert werden. Die Erweiterung dieses experimentellen Ansatzes zum Nachweis von *messenger* RNAs (mRNAs) sollte ebenfalls gezeigt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Biochemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle Chemikalien und Biochemikalien in analytischer bzw. molekularbiologischer Qualität verwendet. Eine Übersicht aller verwendeten Chemikalien (Tabelle A-1), Biochemikalien und Enzymen (Tabelle A-2) findet sich im Anhang.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2-1 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Tabelle 2-1: **Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien und deren Bezugsquellen.**

Bezeichnung	Bezugsquelle
6-Loch-Zellkulturplatten	Nunc (Wiesbaden)
3MM-Papier	Whatman (Maidstone, USA)
Einwegküvetten	Hartenstein (Würzburg)
Eppendorf-Gefäße (1,5 mL, 2 mL)	Sarstedt (Nürnberg)
Falcon-Röhrchen (5 mL, 15 mL, 50 mL)	Sarstedt (Nürnberg)
Mikroliterpipetten	Eppendorf (Hamburg)
Nylonmembran	Amersham (Freiburg)
Petrischalen	Sarstedt (Nürnberg)
Rotilabo-Rundfilter, qualitativ (90 mm)	Roth (Karlsruhe)
Sterilfilter (PTFE, 0,2 µm)	Sartorius (Göttingen)
Ultrazentrifugationsfilter (Amicon, Microcon)	Millipore (Schwalbach/Ts.)
Zellkulturflaschen	Nunc (Wiesbaden)
Zellschaber	Süd-Laborbedarf (Gauting)

2.1.3 Plasmide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Vektorplasmide zeigt Tabelle 2-2.

Tabelle 2-2: **Übersicht der verwendeten Vektorplasmide und deren Bezugsquellen.**

Bezeichnung	Bezugsquelle
pGEM-T	Promega (Mannheim)
pGEM-T_16SrRNA_ <i>E.coli</i>	diese Arbeit
pET-30a_EST2C97S/E118C	Wang (2007)

2.1.4 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und deren Bezugsquellen sind in Tabelle 2-3 aufgeführt.

Tabelle 2-3: **Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und deren Bezugsquellen.**

Bezeichnung	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Novagen (Madison, USA)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLys	Novagen (Madison, USA)
<i>E. coli</i> DSM 613	DSMZ (Braunschweig)
<i>E. coli</i> DSM 13127	DSMZ (Braunschweig)
<i>E. coli</i> K12 (DSM 498)	DSMZ (Braunschweig)
<i>E. coli</i> W3110 (DSM 5911)	DSMZ (Braunschweig)
<i>E. coli</i> DSM 1116	DSMZ (Braunschweig)
<i>E. coli</i> DSM 2607	DSMZ (Braunschweig)
<i>E. coli</i> XL-1 blue	Novagen (Madison, USA)
<i>E. coli</i> DH5 α	Laboratorium für Biochemie, Universität Bayreuth
<i>E. coli</i> HB101	Laboratorium für Biochemie, Universität Bayreuth
<i>E. coli</i> JM109	Laboratorium für Biochemie, Universität Bayreuth
<i>E. coli</i> MRE600	Laboratorium für Biochemie, Universität Bayreuth
<i>E. coli</i> 163	Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, MRI
<i>E. coli</i> 831	Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, MRI
<i>E. coli</i> 866	Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, MRI
<i>E. coli</i> 878	Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, MRI
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, MRI
<i>H. alvei</i>	Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, MRI
<i>L. innocua</i> DSM 20649	DSMZ (Braunschweig)
<i>L. monocytogenes</i>	Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, MRI
<i>B. subtilis</i> DSM 10	DSMZ (Braunschweig)
<i>B. atrophaeus</i> DSM 675	Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, MRI
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> DSM 20240	DSMZ (Braunschweig)

Für alle Versuche zur Etablierung des elektrochemischen 16S rRNA-Nachweises und zur Entwicklung von Signalamplifikationsmethoden wurde, wenn nicht anders angegeben, *E. coli* BL21 (DE3) verwendet. Dagegen wurden für die Vorversuche zur Validierung des Nachweissystems mit Fleischproben *E. coli* 163 verwendet (falls nicht anders angegeben).

2.1.5 Zusammensetzung von Nährmedien

Die in dieser Arbeit verwendeten Nährmedien für die Kultivierung von Bakterien und Hefen und deren Zusammensetzung sind im Anhang aufgeführt (Tabelle A-3). Mengenangaben beziehen sich dabei auf jeweils 1 L Mediovolumen. Alle Medien wurden bei 121°C und 1 bar für 20 min autoklaviert. Festmedien wurden vor dem Autoklavieren 15 g Agar pro Liter Medium zugegeben. Der Zusatz von sterilfiltrierten

Hemm- und Zusatzstoffen erfolgte nach dem Autoklavieren und dem Abkühlen des Mediums auf 50°C.

2.1.6 Synthetische Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Metabion (Martinsried), Biomers (Ulm) und Purimex (Greibenstein) bezogen. Die Sequenzdaten sind im Anhang aufgeführt (Tabelle A-4). Die Reinheit und Integrität der Oligonukleotide wurden stets mittels HPLC und MALDI-TOF Massenspektrometrie überprüft.

2.1.7 Zusammensetzung gebräuchlicher Lösungen

Die Zusammensetzung und Bezeichnung häufig verwendeter Lösungen ist in Tabelle 2-4 aufgeführt.

Tabelle 2-4: Übersicht der verwendeten Lösungen und deren Zusammensetzung.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Coomassie-Färbelösung	30% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Essigsäure 0,4% (w/v) <i>Coomassie Brilliant Blue</i> G250 in ddH ₂ O
Coomassie-Entfärbelösung	30% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Essigsäure in ddH ₂ O
DEPC-H ₂ O	0,1% (v/v) DEPC in ddH ₂ O Inkubation für 24h bei 25°C Autoklavieren bei 121°C, 1 bar
DNA-Probenpuffer	30% (v/v) Glycerin 0,5 x TBE 10 mM EDTA 0,25% (v/v) Bromchlorphenolblau 0,25% (v/v) Xylencyanol
HPLC-Puffer A	0,01 M TEAA (pH 7,0)
HPLC-Puffer B	0,01 M TEAA (pH 7,0) 10% ddH ₂ O 90% (v/v) Acetonitril
Maleinsäurepuffer	100 mM Maleinsäure (pH 7,5) 150 mM NaCl
MESA	40 mM MOPS (pH 7,0) 10 mM Natriumacetat 1 mM EDTA
NB-Detektionspuffer	100 mM Tris-HCl (pH 9,5) 100 mM NaCl
NB-Waschpuffer	100 mM Maleinsäure (pH 7,5) 150 mM NaCl 0,3% (v/v) Tween 20

PBS	10 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 7,4) 137 mM NaCl 2 mM KH ₂ PO ₄ 2,7 mM KCl
RNA-Probenpuffer	25% Formamid 1,1 M Formaldehyd (37%) 40 mM MOPS (pH 7,0) 10 mM Natriumacetat 1 mM EDTA 1% (w/v) Saccharose 0,25% (v/v) Bromchlorphenolblau 0,25% (v/v) Xylencyanol
SDS-Laufpuffer	1,92 M Glycin 0,5 M Tris-HCl (pH 8,9) 1% (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer	100 mM Tris-HCl (pH 8,3) 30% (v/v) Glycerin 0,06% (w/v) Bromchlorphenolblau 5% (w/v) SDS 0,7 M β-Mercaptoethanol
SSC	15 mM Natriumcitrat (pH 7,0) 150 mM NaCl
T4 DNA-Ligasepuffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,5) 10 mM MgCl ₂ 1 mM ATP 10 mM Dithiothreitol
TBE-Puffer	89 mM Tris (pH 8,4) 89 mM Borsäure 2,5 mM EDTA
TBS	50 mM Tris-HCl (pH 7,4) 150 mM NaCl
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA
Tfbl-Puffer	30 mM Kaliumacetat (pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure eingestellt) 100 mM RbCl 50 mM MnCl ₂ 10 mM CaCl ₂ 15% (w/v) Glycerin
TfblII-Puffer	10 mM MOPS (pH 7,0 mit 1,0 M NaOH eingestellt) 10 mM RbCl 75 mM CaCl ₂ 15% (w/v) Glycerin
Vorhybridisierungslösung	50% Formamid 75 mM Natriumcitrat (pH 7,0) 750 mM NaCl

20% (v/v) Blockierungslösung (Roche, Mannheim)
0,1% (v/v) N-Lauroylsarcosin
0,02% (v/v) SDS

2.1.8 Geräteliste

Alle in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 2-5 aufgeführt.

Tabelle 2-5: Übersicht der verwendeten Laborgeräte und deren Hersteller.

Gerätebezeichnung	Modell/ Typ	Bezugsquelle
20 cm × 20 cm Gelelektrophorese-Apparatur		Haustechnik der Universität Bayreuth
Autoklav	Autoklav 23 FNR4932E	Melag (Berlin) Biomedis (Gießen)
Automatisiertes Elektrophoresesystem	Experion Automated Electrophoresis System	Bio-Rad (München)
Brutschrank		Memmert (Schwabach)
HPLC	Beckman Gold	Beckman (München)
Feinwaage	A210P	Sartorius (Göttingen)
FPLC	Liquid Chromatography Controler LCC 500	Pharmacia Biotech (Freiburg)
Geldokumentation	Multi Gel Jet	Intas (Göttingen)
Geltrockner	D61	Biometra (Göttingen)
Heizplatte/Magnetrührer	IKAMAG RCT	IKA-Werk (Staufen i. Br.)
Horizontale Gelelektrophorese-Apparatur		Haustechnik der Universität Bayreuth
Hybridisierungs-ofen		Bachofer (Reutlingen)
Lumineszenzspektrometer	LS50B	Perkin Elmer (Waltham, USA)
Mikroskop	BHS	Olympus (Hamburg)
Mikrotiterplatten-Spektralphotometer	µQuant	Bio-Tek Instruments (Winooski, USA)
Peristaltische Pumpe	LKB Pumpe P1	Pharmacia Biotech (Freiburg)
pH-Meter	pH 197 WTW	WTW (Weilheim)
Pipetten		Eppendorf (Hamburg) Gilson (Limburg-Offheim)
Quarzglasküvette	Typ-Nr. 105.202-QS	Hellma (Mühlheim)
Spektralphotometer	DU 640 UV-160	Beckman (Fullerton, USA) Shimadzu (Kyoto, Japan)
Thermomixer	eppendorf 5436 eppendorf compact	Eppendorf (Hamburg) Eppendorf (Hamburg)
Trockenschrank	T6030 T6200	Heraeus (Hanau) Heraeus (Hanau)
Über-Kopf-Schüttler		Haustechnik der Universität Bayreuth
Ultraschallbad	Ultrasonic Cleaner	VWR (Hamburg)

Ultraschallstab	Sonoplus GM 2200 HF Generator mit BR 30 Cup booster	Bandelin (Berlin)
UV-Detektor	Uvicord II	Pharmacia Biotech (Freiburg)
Vertikale Gelelektrophere- Apparatur	Mighty Small System	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Vortex	Vortex Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)
Waagen	1204MP Acculab Vicon	Sartorius (Göttingen) Sartorius (Göttingen)
Wasserbad	Typ 3042	Köttermann (Uetze/Hänigsen)
Zentrifugen	Mini Spin Plus Mikro Rapid/K Sigma-202 MK Sorvall RC6 Plus Centrikon T1055	Eppendorf (Hamburg) Hettich (Tuttlingen) Sigma-Aldrich (Steinheim) Thermo Electron (Waltham, USA) Thermo Electron (Waltham, USA)

2.2 Genetische Methoden

2.2.1 RNA-Analytik

Bei allen Arbeiten mit RNA wurde auf RNase-Freiheit aller verwendeten Gegenstände und Lösungen geachtet. Hierzu wurden alle Gegenstände vorher gründlich mit Detergens gespült und alle verwendeten Lösungen mit DEPC-H₂O hergestellt.

2.2.1.1 RNA-Präparation aus Bakterien

2.2.1.1.1 RNA-Isolierung mittels kommerzieller Methoden

Die RNA-Isolierung aus Gram-negativen bzw. Gram-positiven Bakterien erfolgte nach den Herstellerangaben der verwendeten kommerziell erhältlichen RNA-Isolierungskits (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden, wenn nicht anders angegeben). Das Prinzip der RNA-Isolierung beruht auf der Absorption der RNA an die Silika-Gel-Membran der Spin-Säulen. An diese Membran binden in Gegenwart eines Hochsalzpuffers nur RNA-Moleküle, die länger als 200 nt sind. Die Lyse und Homogenisierung der Proben erfolgt in Gegenwart eines Guanidin-Isothiocyanat enthaltenden Puffers, der in biologischem Material vorhandene RNasen inaktiviert. Durch die Zugabe von Ethanol werden geeignete Bedingungen für eine Bindung der RNA an die Silika-Gel-Membran geschaffen. Durch wiederholte Waschvorgänge werden Verunreinigungen entfernt.

Für alle Isolierungsansätze wurde eine ÜN-Kultur der Bakterien in frischem Kultivierungsmedium verdünnt und etwa zwei bis drei Stunden bei der entsprechenden Wachstumstemperatur unter Schütteln (170 rpm) inkubiert, bis diese einen OD₆₀₀ von 0,6 – 1,0 erreichten. Die Lyse Gram-negativer Bakterien erfolgte enzymatisch mit 100 µL 1 mg/mL Lysozym in 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) und 1 mM EDTA (pH 8,0) für 10

min bei 25°C. Die Zellwand Gram-positiver Bakterien wurde durch enzymatische und mechanische Lyse zerstört. Die pelletierten Bakterien wurden mit 100 µL 1 mg/mL Lysozym in 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) und 1 mM EDTA (pH 8,0) resuspendiert und nach Zugabe von 100 mg Glaskügelchen (Durchmesser ≤ 100 µm) für 5 min bei 4°C intensiv geschüttelt. Die Lyse von *Listeria* spp. erfolgte ebenfalls mittels Kombination aus enzymatischer und mechanischer Methode. Dabei verwendete man 1 mg/mL Lysozym in 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) und 1 mM EDTA (pH 8,0) zur Resuspension des Bakterienpellets, gefolgt von einer zehnmütigen Inkubation bei 25°C und einer Ultraschallbehandlung für 0,5 – 1 min mit einer Amplitude von 50 bzw. 100%.

Typischerweise wurden aus 10⁸ KbE *E. coli* etwa 25 µg Gesamt-RNA mit einem A₂₆₀/A₂₈₀-Verhältnis von 1,8 - 2,0 isoliert.

2.2.1.1.2 Schnelllyse von Bakterienzellen zur RNA-Isolierung

Zur schnellen Herstellung von Zellextrakten wurden die Bakterienzellen durch Zentrifugation bei 6.500 x g für 5 min pelletiert. Das Pellet resuspendierte man in 10 µL 30 mM Mg(OAc)₂, 100 mM KOAc, 5 µM Helfer-ODN und 40 mM Tris-Acetat (pH 8,1) und inkubierte den Reaktionsansatz für 5 min bei 95°C. Nach einer einmütigen Inkubation bei 50°C wurden 200 nM EST2-ODN-Konjugat in 450 mM NaCl, 1 mg/mL BSA, 0,025% Tween 20, 25 mM EDTA und 30 mM NaH₂PO₄ (pH 7,4) zugefügt und die Reaktionsmischung sofort zur Hybridisierung auf den Biochip gegeben (s. Kapitel 2.7.5.1). Zur Unterstützung der Lyse von *Listeria* spp. wurde das Pellet in 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) und 10 mM NaCl in Gegenwart von 700 U/mL Achromopeptidase resuspendiert und der Ansatz bei 37°C für 30 min inkubiert. Danach wurden 30 mM Mg(OAc)₂, 100 mM KOAc, 5 µM Helfer-ODN und 40 mM Tris-Acetat (pH 8,1) zugegeben und für 5 min bei 95°C inkubiert. Die weitere Vorgehensweise erfolgte wie bereits beschrieben.

2.2.1.2 RNA-Präparation aus *Saccharomyces cerevisiae*

Zur RNA-Isolierung aus Hefezellen wurde eine ÜN-Kultur 50-fach in frischem YPD-Medium verdünnt und für weitere 2 h bei 25°C inkubiert bis diese einen OD₆₀₀ von etwa 1,0 erreicht hatte. 10 mL dieser Hefekultur wurden anschließend durch Zentrifugation (5.000 x g, 5 min, 4°C) pelletiert und das Pellet in 1 mL eiskaltem H₂O resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 400 µL 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM EDTA, 0,5% SDS aufgenommen und anschließend 1 Volumen Phenol (pH 5,0) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 10 sek kräftig durchmischt und bei 65°C für 1 h inkubiert. Nach Abkühlung auf 4°C erfolgte die Phasenseparation durch Zentrifugation (10.000 x g, 5 min, 4°C). Nach erneuter Extraktion mit einem Volumen Phenol wurde die obere wässrige Phase mit 1 Volumen Chloroform vermischt, zentrifugiert (10.000 x g, 5 min, 4°C) und mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,3) und 2,5 Volumen EtOH (abs.) versetzt. Nach einer Inkubation bei -20°C für

mindestens 30 min wurde die präzipitierte Nukleinsäure durch Zentrifugation (10.000 x g, 15 min, 4°C) pelletiert und anschließend mit eiskaltem 70%igen EtOH gewaschen. Abschließend wurde das Pellet für 10 min bei 37°C getrocknet und durch Zugabe von 50 µL H₂O gelöst.

2.2.1.3 RNA-Präparation aus eukaryontischer Zellkultur

Die RNA-Präparation erfolgte aus konfluenten Zellen aus einer Zellkulturkammer einer 6-Loch-Platte. Das Protokoll entsprach den Anweisungen des Herstellers (Qiagen, Hilden).

Die Isolation einer miRNA-angereicherten Fraktion erfolgte mit dem *miRNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden). Dazu versetzte man die obere wässrige Phase mit 1 Volumen 70%igen Ethanol und durchmischte den Ansatz gründlich. 700 µL des Ansatzes gab man auf ein *RNeasy Mini Spin-Säulchen* und zentrifugierte dieses bei 10.000 x g für 15 sek. Der Durchfluss enthielt die miRNA. Nach Zugabe von 0,65 Volumen Ethanol (abs.) zum Durchfluss und gründlichen Durchmischen der Probe gab man 700 µL des Ansatzes auf ein *RNeasy MinElute Spin-Säulchen* und zentrifugierte dieses bei 10.000 x g für 15 sek. Die weitere Vorgehensweise entsprach den Herstellerangaben.

Die RNA-Ausbeute für 10⁶ MCF-7-Zellen lag bei etwa 5 µg bei einem A₂₆₀/A₂₈₀-Verhältnis von 1,8 - 2,0.

2.2.1.4 Konzentrationsbestimmung der RNA-Proben

2.2.1.4.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der RNA-Lösungen erfolgte mittels photometrischer Messung. Dabei entspricht 1 A₂₆₀ 40 µg/mL RNA (Cavaluzzi & Borer 2004). Desweiteren konnte man die Reinheit der RNA durch den A₂₆₀/A₂₈₀-Quotienten von etwa 2,0 bestimmen. Reine RNA weist einen A₂₆₀/A₂₈₀-Quotienten von etwa 2,0 auf.

2.2.1.4.2 Fluorometrische Konzentrationsbestimmung

Konzentrationen von RNA, die aus geringen Zellzahlen isoliert wurden, wurden fluorometrisch mit Hilfe des Farbstoffes *RiboGreen* (Invitrogen, Karlsruhe) bestimmt. Dazu wurde die *RiboGreen*-Konzentration so eingestellt, dass RNA-Konzentrationen im Bereich von 20 ng/mL bis 1 µg/mL gemessen werden konnten.

Der *RiboGreen*-Farbstoff wurde im Verhältnis 1:200 in TE-Puffer verdünnt. Als Standard diente eine ribosomale RNA mit einer Konzentration von 2 µg/mL, welche anschließend zu 1 µg/mL, 500 ng/mL, 100 ng/mL, 20 ng/mL und 0 ng/mL verdünnt wurde. Die Proben wurden entsprechend mit TE-Puffer und *RiboGreen* verdünnt. Es folgte eine Inkubation der Proben bei 25°C für 5 min im Dunkeln. Die Fluoreszenzmessung erfolgte mittels eines Fluorometers bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm.

Anhand der erstellten Eichgerade (Abb. 2-1) wurde die RNA-Konzentration der unbekannt Probe bestimmt.

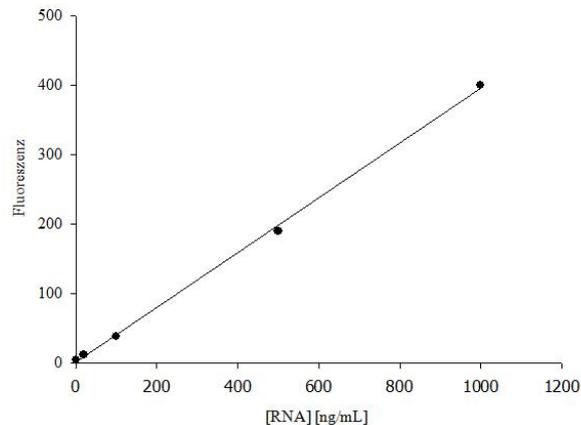


Abbildung 2-1: **Eichgerade zur fluorometrischen Bestimmung von RNA unter Verwendung des RiboGreen-Farbstoffes.** Die Linearität der ermittelten Geraden beträgt $R^2 = 0,99$.

2.2.1.5 Gelelektrophorese

2.2.1.5.1 TBE-Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte in 0,5 bis 2%igen [w/v] Agarosegelen (Sambrook & Russell 2001). Die elektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte bei einer angelegten Spannung von 8 V/cm. Nach der Auftrennung wurde das Gel fünf Minuten in einer Ethidiumbromid-Lösung (1 $\mu\text{g/mL}$) gefärbt und zehn Minuten unter fließendem Wasser entfärbt. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht photographiert und ausgewertet.

2.2.1.5.2 Elektrophorese von RNA in denaturierenden Agarosegelen

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1,0% - 2,0%igen denaturierenden Agarosegelen. Die Zusammensetzung des Gels bestand aus 1,0 - 2,0% [w/v] Agarose in 1 x MESA und 3,2 % [v/v] Formaldehyd.

Die Vorbereitung der RNA-Proben bestand im Denaturieren der Ansätze (1 - 2 μg RNA versetzt mit RNA-Probenauftragspuffer) für 10 Minuten bei 65°C. Die Elektrophorese erfolgte bei 4 - 5 V/cm und 4°C je nach Größe der nachzuweisenden RNA für 2 - 4 Stunden. Anschließend wurde das Agarose-Gel für 5 min in einer Ethidiumbromid-Färbelösung (2,5 $\mu\text{g/mL}$ in 1 x MESA-Puffer) inkubiert und bei 4°C für dreimal 20 min sowie über Nacht in H₂O entfärbt. Am nächsten Tag wurde das Gel unter UV-Licht photographiert.

2.2.1.5.3 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Die Gelmatrix wird durch radikalische Polymerisation von Acrylamid und dem Quervernetzer *N,N'*-Methylenbisacrylamid hergestellt. Als Polymerisationsstarter dient

Ammoniumpersulfat (APS), als Radikalstabilisator *N,N,N',N'*-Tetramethylethyldiamin (TEMED). Die Porengröße des Gels und somit sein Trennbereich wird über die Konzentration und das Verhältnis von Acrylamid und *N,N'*-Methylenbisacrylamid reguliert. Für analytische Zwecke wurden in dieser Arbeit Gele mit einem Acrylamid-Gehalt von 8% bis 15% verwendet. Um die Ausbildung von Sekundär- und Tertiärstrukturen der aufzutrennenden Nukleinsäuren zu unterbinden, die das Laufverhalten von Nukleinsäuren verändern können, arbeitet man bei der Analyse einzelsträngiger Nukleinsäuren unter denaturierenden Bedingungen. Hierzu wurde der Polymerisationsansatz (unterschiedliche Volumina einer Acrylamid-Stammlösung, 38% (v/v) Acrylamid, 2% (v/v) *N,N'*-Methylenbisacrylamid) mit 8 M Harnstoff versetzt. Sowohl für die Gelherstellung als auch als Laufpuffer wurde in dieser Arbeit 1 x TBE verwendet. Die Polymerisation wurde durch 0,2% TEMED und 0,02% (w/v) APS gestartet. Der Gellauf erfolgte bei 15 V/cm. Bei der präparativen Gelelektrophorese wurden zur gleichmäßigen Wärmeverteilung Aluminiumplatten an den Gelplatten angebracht.

2.2.1.5.4 Mikrochip-Kapillarelektrophorese von Gesamt-RNA

Die Analyse der RNA-Integrität nach Isolation aus Fleisch bzw. die Analyse der Fragmentierungskinetik erfolgte mittels automatisierter Kapillarelektrophorese (Experion System). Alle Arbeitsschritte wurden nach Herstellerangaben durchgeführt (*Experion RNA StdSens Kit* und *High Sense Kit*).

2.2.1.6 Northern Blot

Der Nukleinsäuretransfer vom denaturierenden Agarosegel auf eine positiv geladene Nylonmembran (Amersham, Freiburg) erfolgte mittels Kapillartransfer für 16 h bei 25°C (Sambrook & Russell 2001; Streit *et al.*, 2009). Darauf wurde die RNA auf der Nylonmembran durch 3-minütige UV-Bestrahlung ($\lambda = 312 \text{ nm}$) fixiert. Den erfolgreichen Nukleinsäuretransfer auf die Nylonmembran konnte man unter UV-Licht überprüfen.

2.2.1.7 Herstellung Digoxigenin-markierter RNA-Sonden

Die *in vitro*-Synthese von Digoxigenin- (DIG) markierten RNA-Sonden erfolgte unter Verwendung des *DIG-RNA-Labeling-Systems* (Roche, Mannheim). Zunächst wurde das für die RNA-Sonde ausgewählte DNA-Fragment mittels PCR amplifiziert, wobei das reverse Oligonukleotid die Sequenz für den Promotor der T7 RNA-Polymerase enthielt (s. Tab. A-4). Das PCR-Produkt konnte nach Aufreinigung für den *in vitro*-Ansatz zur Synthese der DIG-markierten RNA-Sonde eingesetzt werden (Vorgehensweise nach Herstellerangaben).

Zur Überprüfung der Effizienz der Markierung der RNA-Sonden wurden Verdünnungen (10 pg/ μL – 0,01 pg/ μL) in einer Menge von 1 μL auf eine positiv

geladene Nylonmembran aufgetropft und mittels UV-Bestrahlung fixiert. Das Protokoll der Detektion mit Hilfe eines DIG-spezifischen Antikörpers gleicht der Detektion von RNA/RNA-Hybriden und ist in Abschnitt 2.2.1.9 beschrieben.

2.2.1.8 Hybridisierung membrangebundener RNA mit DIG-markierten RNA-Sonden

Die Vorhybridisierung erfolgte für mindestens eine Stunde bei 68°C mit 20 mL Vorhybridisierungslösung im Hybridisierungssofen. Anschließend wurde die Vorhybridisierungslösung durch die auf 68°C vorgewärmte RNA-Sonde in Vorhybridisierungslösung ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte für 18 h. Um unspezifisch gebundene RNA-Sonden von der Nylonmembran zu entfernen, wurde diese zweimal für 5 Minuten bei 25°C in 50 mL 2 x SSC, 0,1% SDS sowie dreimal für je 15 Minuten bei 68°C in 50 mL vorgewärmter 0,1 x SSC-Lösung mit 0,1% SDS gewaschen. Anschließend erfolgte die Detektionsreaktion.

2.2.1.9 Detektion von RNA/RNA-Hybriden

Das Protokoll des RNA-Nachweises entspricht den Anweisungen des Herstellers (*DIG Application Manual*, Roche, Mannheim).

Als Substrat der Alkalischen Phosphatase wurde HNPP (*2-hydroxy-3-naphthoic acid-2'-phenylanilide phosphate*), verwendet (Kagiyama *et al.*, 1992) und die enzymatisch erzeugte Fluoreszenz auf einem UV-Tisch bei einer Wellenlänge von 302 nm ausgewertet.

2.2.2 DNA-Analytik

2.2.2.1 Konzentrationsbestimmung von DNA

Für die Berechnung des DNA-Gehalts wurde für 1 A₂₆₀ eine Konzentration von 50 µg/mL doppelsträngiger DNA bzw. 30 µg/mL einzelsträngiger DNA zugrunde gelegt (Cavaluzzi & Borer 2004).

2.2.2.2 Isolation von genomischer DNA aus Mikroorganismen

Die Isolation von genomischer DNA aus *E. coli* erfolgte durch thermische Lyse. Dazu wurde eine Übernachtskultur durch Zentrifugation (6.500 x g, 5 min) pelletiert, in 100 µL TE-Puffer resuspendiert und anschließend für zehn Minuten bei 95°C inkubiert. In Folge der Lyse entstandener Zelldebris wurde durch eine einminütige Zentrifugation bei 12.000 x g entfernt. Der Überstand wurde in ein neues Reagenzgefäß überführt und enthielt die genomische DNA.

2.2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR-Reaktion (Mullis *et al.*, 1992) wurde mit den *puRe Taq Ready-To-Go PCR Beads* (Amersham, Freiburg) durchgeführt. Der PCR-Ansatz bestand aus 1 – 50 ng

Templat-DNA, 10 pmol Vorwärts- bzw. Rückwärts-Primer, je 100 μ M dNTPs und 2,5 U *Taq*-DNA-Polymerase in 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM KCl und 1,5 mM MgCl₂. Die Wahl der *Annealing*-Temperatur und der Elongationszeit richteten sich nach der Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide sowie nach der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Dabei wurde von einer Syntheserate der im Ansatz enthaltenen *Taq*-DNA-Polymerase von 1.000 bp/min ausgegangen. Die *Annealing*-Temperatur für die Amplifikation des *uidA*- bzw. der *16S rDNA*-Gene betrug 50°C und die Elongation erfolgte in beiden Fällen für 30 sek. Um eine Matrize für Sequenzierungsreaktionen zu erstellen, wurde die *Pfu*-DNA-Polymerase, die eine *proof-reading*-Aktivität besitzt, verwendet. Diese weist eine Syntheserate von etwa 500 bp/min auf.

Bei der asymmetrischen PCR wurde der entsprechende Primer, der für die Amplifikation des nicht zu detektierenden Stranges sorgt, in einem 50-fachen Unterschuss eingesetzt.

Zur Herstellung der dsDNA-Matrizen für die komplementären miRNA-Sonden wurden 25 pmol der beiden äußeren Oligonukleotide (z. B. miR-21_1 und miR21_6) und 25 fmol der inneren Oligonukleotide verwendet (z. B. miR-21_2 bis miR21_5). Dabei betrug die *Annealing*-Temperatur 50°C und die Elongation erfolgte bei 72°C für 30 sek. Die Amplifikation wurde in dem *Personal Cycler*-Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt.

2.2.2.4 Verdau von phosphorylierten PCR-Produkten mittels λ -Exonuclease

Der Reaktionsansatz enthielt das PCR-Produkt in 67 mM Glycin-KOH (pH 9,3), 2,5 mM MgCl₂ und 5 U λ -Exonuclease. Nach einer Inkubation der Reaktion für 30 min bei 37°C wurde die λ -Exonuclease durch Zugabe von 250 mM EDTA (pH 8,0) inaktiviert. Der erzeugte DNA-Einzelstrang wurde ohne weitere Aufreinigungsschritte für den Biochip-Nachweis eingesetzt.

2.2.2.5 Reinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten, die als Matrize für Sequenzierungsreaktionen dienen, erfolgte mit Hilfe des *High Pure PCR Product Purification Kits* (Roche, Mannheim). Dieser sorgt für die Abtrennung von Nukleotiden, Oligonukleotiden, Polymerasen und des PCR-Puffers. Grundlage der Reinigung ist die Bindung von 100 bp bis 10 kbp langen DNA-Fragmenten an eine Silika-Gel-Membran der im Kit enthaltenen Säulchen.

2.2.2.6 Phenolextraktion und Ethanol fällung

Durch Phenolisieren wurden Nukleinsäuren von Proteinen und anderen Verunreinigungen befreit (Colter *et al.*, 1962). Durch die Ethanol fällung wurden Nukleinsäuren konzentriert und Salze entfernt. Die Durchführung dieser Schritte erfolgte gemäß Sambrook und Russell (2001).

2.2.2.7 *In vitro*-Transkription

Nach PCR-Amplifikation des gewünschten genomischen Bereichs unter Verwendung eines Primers mit T7-Promotor-Sequenz wurde dieses PCR-Produkt für die *in vitro*-Transkription eingesetzt. Dabei wurden 2,5 µg PCR-Produkt in Gegenwart von 5 U T7 RNA-Polymerase in 40 mM Tris-HCl (pH 8,1), 20 mM MgCl₂, 1 mM Spermidin, 5 mM DTE, 0,01% (v/v) Triton X-100, jeweils 4 mM NTP und 80 U RNasin für 3 h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 2 U RNase-freier DNase und einer weiteren Inkubation bei 37°C für 15 min wurde die RNA durch Phenolextraktion und EtOH-Fällung isoliert. Die Integrität der RNA wurde gelelektrophoretisch überprüft, während die Konzentrationsbestimmung spektralphotometrisch erfolgte.

2.2.2.8 Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen

Der Restriktionsverdau erfolgte jeweils bei den vom Hersteller angegebenen Bedingungen (Restriktionsenzyme und -puffer von NEB, Frankfurt am Main). Zu analytischen Zwecken wurden 0,5 µg Plasmid-DNA in einem Volumen von 20 µL für 1-2 h hydrolysiert. Durch eine Gelelektrophorese des Restriktionsansatzes in einem Agarosegel und nachfolgender Färbung des Gels in einer Ethidiumbromid-Lösung wurden die entsprechenden Banden unter UV-Licht lokalisiert (siehe Kapitel 2.2.1.5.1).

2.2.2.9 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Mit einem Skalpell wurde die gewünschte Bande aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten. Die Elution erfolgte mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben.

2.2.2.10 Klonierung von PCR-Fragmenten

PCR-Fragmente wurden mittels TA-Klonierung in Vektoren inseriert (Clark 1988; Hu 1993). Der pGEM-T-Vektor - ein 3003 bp großes, linearisiertes Derivat des pGEM-5Zf(+) Vektors - ist ein Vektor mit Thymidin-Überhang. Die Ligation von PCR-Amplifikaten in den pGEM-T-Klonierungsvektor wurde gemäß dem Herstellerprotokoll mit dem *pGEM-T Vector System* (Promega, Mannheim) durchgeführt.

2.2.2.11 Ligation von DNA-Molekülen

Der Reaktionsansatz für die Ligation bestand aus einer Mischung aus Insert- und Vektor-DNA, wobei die Insert-DNA in einem etwa dreifach molaren Überschuss eingesetzt wurde und aus 0,5 U T4 DNA-Ligase in 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM DTT. Das Gesamtvolumen des Ligationsansatzes betrug jeweils 20 µL. Der Ligationsansatz wurde für 18 h bei 4°C inkubiert.

2.2.2.12 Transformation von *E. coli*

2.2.2.12.1 Herstellung von chemisch-kompetenten *E. coli*

Die Herstellung und Transformation von *E. coli*-Zellen erfolgte nach dem Protokoll von Inoue *et al.* (1990). Die Arbeitsschritte bei der Anzucht kompetenter Zellen müssen alle auf Eis erfolgen.

100 mL Psi-Broth wurden mit 1 mL einer ÜN-Kultur angeimpft und bei 37°C und 170 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert. Unverzüglich wurde die Kultur für 15 min auf Eis gestellt und anschließend die Bakterienzellen für 5 min bei 5.000 x g und 4°C konzentriert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 0,4 Volumen kaltem TfbI-Puffer resuspendiert, erneut 15 min auf Eis inkubiert und wie oben beschrieben abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 0,04 Volumen kaltem TfbII-Puffer resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Aliquots von 100 µL wurden unverzüglich in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei – 80°C gelagert. Um die Kompetenz der Zellen zu testen, verwendete man frisch verdünnte Vektor-DNA, die man anschließend transformierte (s. Kapitel 2.2.2.12.2) und die Koloniezahl nach 18-stündiger Inkubation bei 37°C bestimmte.

2.2.2.12.2 Transformation von chemisch-kompetenten *E. coli*-Zellen

Zur Transformation wurde ein 100 µL Aliquot chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und 0,1 µg Plasmid-DNA bzw. 5 – 10 µL Ligationsansatz zugegeben. Die Mischung wurde für 30 min auf Eis belassen, gefolgt von einer Inkubation bei 42°C für 90 sek (Hitzeschock). Nach Abkühlen des Transformationsansatzes für zwei Minuten, wurde 1 mL LB-Medium zugegeben. Die transformierten Zellen wurden für eine Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend pelletierte man die Zellen bei 1.000 x g für 3 min bei 25°C und resuspendierte das Pellet in 100 µL LB-Medium (vorgewärmt auf 37°C). 50 – 100 µL der Zellsuspension plattierte man auf LB-Agar (vorgewärmt auf 37°C) mit dem gewünschten Antibiotikum aus und inkubierte die Platte bei 37°C für 16 – 18 h. Im Falle der Transformation des pGEM-T-Vektors gab man zur Zellsuspension 80 mM IPTG und 8 mg/mL X-Gal-Lösung (gelöst in DMF) und plattierte diese wie oben beschrieben auf LB-Agarplatten aus (Blau-Weiß-Selektion).

2.3 Analyse von Proteinen

2.3.1 Bradford-Assay zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration

Die zu messende Probe wurde mit ddH₂O auf 200 µL aufgefüllt. Nach Zugabe von 800 µL Bradford-Lösung wurde der Ansatz für exakt 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss die Absorption bei 450 und 590 nm gemessen (Zor & Selinger 1996). Als Referenz diente eine Lösung aus 800 µL Bradford-Lösung und 200

µl ddH₂O. Die Bestimmung einer unbekanntenen Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe einer BSA-Eichgeraden.

2.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die PAGE dient zur Auftrennung, Detektion und Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen. Bei der denaturierenden SDS-PAGE erfolgt eine Auftrennung der Proteine nach dem Molekulargewicht. In dieser Arbeit wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE nach *Lämmli* (Laemmli 1970) mit dem Puffersystem von *Fling* und *Gregerson* (Fling & Gregerson 1986) durchgeführt.

Es wurden zunächst Sammel- und Trenngellösungen erstellt. Das Sammelgel bestand aus 4% (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 130 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,1% SDS (v/v) in ddH₂O (5 mL). Die Polymerisation wurde durch 7 mM APS und 14 mM TEMED eingeleitet. Das Trenngel setzte sich aus 8 – 15% (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 375 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,1% SDS (v/v) in ddH₂O (10 mL) zusammen. Das Trenngel wurde mit 7 mM APS und 7 mM TEMED polymerisiert. Ein scharfer Übergang zwischen Trenn- und Sammelgel wurde durch eine Überschichtung mit Isopropanol gewährleistet, welches gleichzeitig Sauerstoff ausschloss.

Die Denaturierung der Proteine erfolgte für 5 min bei 95°C in SDS-Probenpuffer. Die Trennung der Proben erfolgte unter Wasserkühlung bei 20 V/cm für etwa 1,5 h. Danach wurde eine Färbung mittels Coomassie-Färbelösung für 30 min durchgeführt und anschließend mit Coomassie-Entfärbelösung entfärbt.

2.3.3 Bestimmung der enzymatischen Aktivität der EST2

2.3.3.1 Photometrische Bestimmung der Enzymaktivität

Die Esterase-Aktivitätsmessung basiert auf der enzymatischen Hydrolyse des Substrats *p*-Nitrophenylacetat zu *p*-Nitrophenol, welches eine stark gelbe Farbe aufweist ($\epsilon_{405} = 14.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; Manco *et al.*, 1998). Dabei wurde eine bestimmte Konzentration an EST2 in 50 mM Natriumphosphat (pH 7,5) mit 1 mM *p*-Nitrophenylacetat gemischt. Der Zeitverlauf der Bildung des Produkts *p*-Nitrophenol bei einer Wellenlänge von 405 nm in einer Küvette mit einer Pfadlänge von 1 cm wurde für eine Minute spektralphotometrisch beobachtet.

$$\text{Aktivität [U]} = \frac{\text{Steigung} [\text{min}^{-1}]}{14000 \text{ M}^{-1}} \times \frac{10^6}{10^3 \text{ mL}}; \quad 1 \text{ U} = 1 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}}$$

2.3.3.2 Esterase-Aktivitätsfärbung

Nach der elektrophoretischen Auftrennung können Proteine unspezifisch oder spezifisch nachgewiesen werden. Unspezifische Proteindarstellungen sind z.B. Färbungen mit *Coomassie Blue*-Farbstoff oder Silbernitrat. Enzyme werden spezifisch mit einer

Kombination aus biochemischen und histochemischen Verfahren visualisiert (Zymogramme).

Die Esterase-Aktivitätsfärbung wurde von Higerd und Spizzen (1973) beschrieben. Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 2-2 dargestellt. In Anwesenheit der Esterase wird das Substrat 2-Naphthylacetat über eine Esterhydrolyse in 2-Naphthol umgewandelt (1). Dieses ist aktiviert und kann durch elektrophile Substitution (Azokupplung) an die Diazoniumverbindung Echtblausalz (*Fast BB Blue Salt*) gebunden werden (2), wodurch ein roter, wasserunlöslicher Farbstoff entsteht (3).

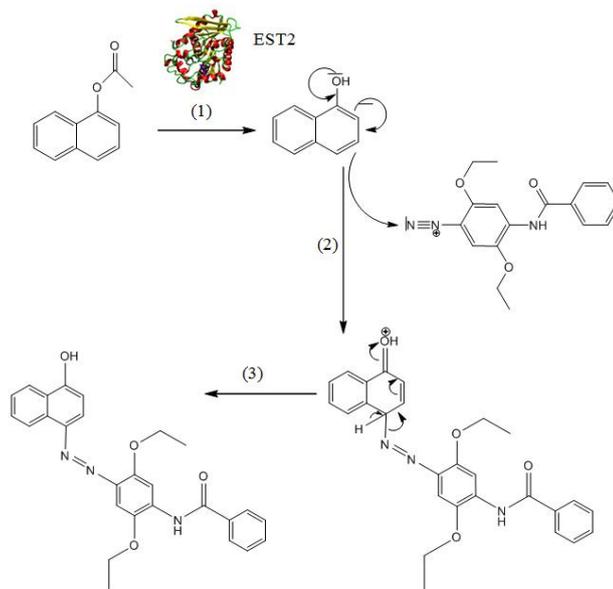


Abbildung 2-2: **Prinzip der Esterase-Aktivitätsfärbung.**

Nach erfolgter SDS-PAGE wurde das Gel mit den aufgetrennten Proben für 3 x 20 min mit 100 mM Tris-HCl (pH 7,5) gewaschen, um eine Rückfaltung der durch SDS denaturierten EST2 zu ermöglichen. Anschließend wurden dem gleichen Puffer 5 mg 2-Naphthylacetat (gelöst in Aceton) sowie 25 mg Echtblausalz (gelöst in Tris-HCl (pH 7,5)) zugegeben und das Gel für 15 min gefärbt.

2.3.4 South-Western-Blot

Der South-Western Blot verbindet die gelelektrophoretische Auftrennung eines Protein-DNA-Konjugats mit der Spezifität der Nukleinsäurehybridisierung und gibt Auskunft, ob das gewünschte Protein-DNA-Konjugat frei von restlicher DNA vorliegt.

2.3.4.1 Blotten der Protein-DNA-Konjugate auf eine Nitrocellulose-Membran

Die durch SDS-PAGE getrennten Protein-DNA-Konjugate wurden in einem ersten Schritt auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und fixiert. Dies erfolgte zwischen zwei Elektroden im elektrischen Feld. Somit erhielt man eine Kopie des Gels und gleichzeitig eine Konzentrierung der Protein-DNA-Konjugate auf der mechanisch stabileren Membran.

Zunächst wurde eine Nitrocellulose-Membran und sechs Filterpapierstücke (Whatman 3MM-Filter) auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten. Sowohl die Nitrocellulosemembran als auch das SDS-Gel und die Filterpapierstücke schwenkte man für 5 min in Transferpuffer (39 mM Glycin, 48 mM Tris, 0,037% SDS, 20% Methanol). Der Aufbau der Blotting-Apparatur wurde luftblasenfrei nach folgender Reihenfolge durchgeführt: Anode, Filterpapier (3 x), Nitrocellulose-Membran, SDS-Gel, Filterpapier (3 x), Kathode. Nach erfolgtem Proteintransfer bei 30 – 35 mA für zwei Stunden wurde die Membran für 15 min bei Raumtemperatur getrocknet und über Nacht bei 4°C gelagert.

2.3.4.2 Absättigung freier Valenzen der Membran und Inkubation mit Meerrettich Peroxidase-Streptavidin-Konjugat

Die Arbeiten wurden unter Schütteln durchgeführt, um eine optimale Verteilung der Lösungen auf der Membran zu erzielen.

Nach dem Protein-DNA-Transfer auf die Nitrocellulose-Membran schwenkte man die Membran kurz in TBS. Daraufhin wurde die Membran für 90 min in 10 mL 1% BSA in TBS inkubiert, um freie Valenzen der Membran zu sättigen und eine spezifische Detektion des gewünschten Protein-DNA-Konjugats zu gewährleisten. Nach Hybridisierung mit 10 nM komplementärem, biotinyliertem ODN in 10 mL TBS + 1% BSA für 18 h wurde die Membran zweimal für 5 min mit 10 mL 2 x SSC + 0,1% SDS gewaschen. Die Membran wurde anschließend dreimal für 15 min mit 10 mL 0,1 x SSC + 0,1% SDS inkubiert und für jeweils 5 min mit 10 mL TBS äquilibriert. Es schloss sich die Inkubation der Membran für 90 min in Gegenwart von 5 µg Meerrettich Peroxidase-Streptavidin-Konjugat (HRP-SA-Konjugat) in 10 mL TBS an. Um unspezifisch gebundenes Reporterkonjugat von der Membran zu entfernen, wurde die Membran für 5 min mit TBS, TBS + 0,05% (v/v) Tween 20 und ein weiteres mal mit TBS gewaschen. Die Detektion des gebundenen HRP-SA-Konjugats erfolgte durch Zugabe von 0,3% (w/v) Chlornaphtol in 20 mL TBS und 8,8 µL 30% Wasserstoffperoxid für 5 min im Dunkeln. Die Reaktion wurde anschließend durch Waschen der Membran mit ddH₂O gestoppt. Die graphische Auswertung erfolgte durch Einscannen des Blots.

2.3.5 Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Zur chromatographischen Auftrennung wurde eine *reversed-phase* C18-Säule (25,00 x 0,46 cm, Sigma-Aldrich, Steinheim) verwendet. Das Puffersystem bestand aus HPLC-Puffer A und B. Dabei wurde ein Gradient verwendet, der innerhalb von 30 min von 5% Puffer B zu 50% Puffer B anstieg. Die Flussrate betrug 1 mL/min und die Detektion der UV-Absorption erfolgte bei den Wellenlängen 260 und 280 nm.

2.3.6 Rekombinante Expression der EST2 (C97S E118C)

Nach Transformation der chemisch kompetenten *E. coli* BL21 (DE3) pLys mit dem Vektor pET-30a_EST2C97S/E118C und Inkubation der LB-Agarplatte mit Kanamycin und Chloramphenicol wurden zwei Vorkulturen (je 250 ml LB-Medium mit 200 µg/mL Kanamycin und 25 µg/mL Chloramphenicol) als Übernachtskultur angeimpft. Mit diesen wurde ein 10 L Fermenter (M9-Medium mit 200 µg/mL Kanamycin und 25 µg/mL Chloramphenicol) beimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 - 0,8. Die Induktion der Proteinexpression wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG gestartet und die Kultur weitere 4 h bei 37°C belassen. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation für 8 min bei 8.300 x g und 4°C pelletiert.

Die Herstellung des Zellextrakts erfolgte nach einem modifizierten Protokoll in Anlehnung an Leberman *et al.* (1980). Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. 100 g Bakterienzellen wurden in 200 mL 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM EDTA, 1 mM β-Mercaptoethanol und 5% Glycerin resuspendiert, worauf zur Zellwandlyse und Degradation der genomischen DNA 20 mg Lysozym, 2 mg DNase und 30 mM MgCl₂ zugegeben wurden. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert und im Anschluss in eine Stickstoffbombe gegeben, ein Druck von 1.500 psi Stickstoff wurde angelegt und für 30 min gehalten. Die schnelle Expansion führte zur Lyse der Zellen und ein gelartiges Produkt wurde erhalten.

Durch Zentrifugation wurde der S30-Überstand hergestellt (22.000 x g, 30 min, 4°C). Die S100-Fraktion wurde durch Ultrazentrifugation für 2 h bei 105.000 x g und 9°C gewonnen. Ein erster Reinigungsschritt stellte die Hitzedenaturierung bei 65°C für 30 min dar, bei der ein Großteil der mesophilen Proteine aus dem Expressionswirt *E. coli* entfernt wird. Danach erfolgte eine einstündige Inkubation der Lösung bei 4°C unter ständigem Rühren. Die denaturierten Proteine wurden durch Zentrifugation (30 min, 22.000 x g, 4°C) entfernt. Dem Überstand wurde 70% Ammoniumsulfat langsam zugegeben und für 30 min auf Eis unter Rühren inkubiert. Nach Zentrifugation der Fällung für 30 min bei 22.000 x g und 4°C wurde das Pellet in 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM β-Mercaptoethanol aufgenommen und gegen den gleichen dialysiert. Nach erneuter Zentrifugation (22.000 x g, 4 °C, 30 min) wurde der Überstand auf eine mit 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM β-Mercaptoethanol äquilibrierte Q-Sepharose-Säule (5 cm x 100 cm) aufgetragen. Die Flussrate lag bei 2,5 mL/min. Es wurde ein Gradient von 0 bis 100% 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 1 mM β-Mercaptoethanol verwendet (0-500 mM KCl). Die Hauptfraktionen wurden per 15%iger SDS-PAGE und Esterase-Aktivitätsfärbung analysiert und die Esterase-enthaltenden Fraktionen vereinigt. Dieser Pool wurde mittels 70% Ammoniumsulfat gefällt, abzentrifugiert, in 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 1 mM β-Mercaptoethanol resuspendiert und gegen diesen dialysiert. Die Probe wurde anschließend über eine Sephacryl S-200 HR Gelpermeationschromatographie (2 cm x 60 cm, V₀ = 57 mL) gereinigt, wobei die

Elution ebenfalls mit 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 1 mM β -Mercaptoethanol erfolgte. Die Fraktionen mit hoher Esteraseaktivität wurden vereinigt, durch 70% Ammoniumsulfat gefällt, in 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 20 mM MgCl₂, 200 mM KCl, 4 mM β -Mercaptoethanol gelöst und gegen denselben dialysiert. Das Produkt wurde nun zur Lagerung 1:1 (v/v) mit Glycerin versetzt und bei -20 °C aufbewahrt.

2.3.7 Herstellung von EST2-ODN-Konjugaten

Die Herstellung von EST2-ODN-Konjugaten erfolgte in dieser Arbeit nach einem modifizierten Protokoll nach Wang *et al.* (2007). Die Konjugation eines ODNs an EST2 gliedert sich in die Schritte 1) Aktivierung des Amino-modifizierten ODNs, 2) Reduktion der EST2, 3) Konjugationsreaktion zwischen aktiviertem ODN und EST2, 4) chromatographische Aufreinigung des EST2-ODN-Konjugats und 5) Konzentrationsbestimmung. Die einzelnen Schritte sollen im Folgenden näher erläutert werden.

Das 5' Amino-modifizierte ODN wurde in ddH₂O gelöst und auf eine Konzentration von 1 mM eingestellt. Das heterobifunktionelle Kopplungsreagenz sulfo-SMCC wurde in trockenem DMF zu einer Konzentration von 50 mM gelöst. Anstelle von sulfo-SMCC wurden ebenfalls die heterobifunktionellen Reagenzien NHS-PEO₂-Maleimid, NHS-PEO₆-Maleimid bzw. NHS-PEO₁₂-Maleimid verwendet. Die Aktivierungsreaktion erfolgte in Gegenwart von 0,5 mM ODN und 10 mM sulfo-SMCC in 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,9) für 1 h bei 25°C. Die Analyse der Reaktion erfolgte mittels Harnstoff-PAGE (Abschnitt 2.2.1.5.3) und HPLC (Abschnitt 2.3.5). Nach Ethanolpräzipitation und Resuspension des Nukleinsäurepellets in 300 μ L ddH₂O wurde der Ansatz mittels Ionenaustauschchromatographie (DEAE Sephadex A25-Säule, 1 cm x 2 cm) gereinigt, welche vorher mit 50 mM Natriumacetat (pH 5,2), 50 mM NaCl äquilibriert wurde. Nach Entfernen des Überschusses an sulfo-SMCC durch Waschen der Säule mit 50 mM Natriumacetat (pH 5,2), 500 mM NaCl erfolgte die Elution des aktivierten ODNs von der Ionenaustauschersäule mit 50 mM Natriumacetat (pH 5,2), 1 M NaCl. Die Fraktionen des eluierten ODNs wurden gesammelt und mittels Ethanolfällung (s. Abschnitt 2.2.2.6) konzentriert. Das gereinigte Endprodukt wurde mittels HPLC-Analyse charakterisiert.

50 μ M EST2 (C97S E118C) wurden in Gegenwart von 500 μ M TCEP in 50 mM Natriumphosphat (pH 6,5), 150 mM NaCl, 0,01% Triton X-100 bei 37°C für 30 min reduziert. Überschüssiges TCEP wurde durch eine Gelpermeationschromatographie (Biogel P6, 1 cm x 30 cm, V₀ = 21,5 mL) entfernt, da TCEP unter Umständen mit Maleimidgruppen reagieren kann (Shafer *et al.*, 2000). Die Äquilibrierung der Säule wurde mit 50 mM Natriumphosphat (pH 6,5), 150 mM NaCl, 0,01% Triton X-100 durchgeführt. Die Fraktionen der eluierten EST2 wurden vereinigt und die EST2-Konzentration spektralphotometrisch bestimmt.

Die Reaktion zwischen aktiviertem ODN und EST2 erfolgte in einem Verhältnis von 1:2 bei 37°C für eine Stunde. 0,1 OD der Reaktionsmischung wurde per SDS-PAGE analysiert.

Das EST2-ODN-Konjugat wurde durch Auftragen der Reaktionsmischung auf eine Ionenaustauschchromatographiesäule (DEAE Sephadex A25, 1 cm x 2 cm) gereinigt, welche zuvor mit 50 mM Natriumphosphat (pH 6,5), 150 mM NaCl, 0,01% Triton X-100 äquilibriert wurde. Nach Waschen der Säule mit 50 mM Natriumphosphat (pH 6,5), 150 mM NaCl, 0,01% Triton X-100 zum Entfernen überschüssiger EST2, wurde das EST2-ODN-Konjugat in Gegenwart von 50 mM Natriumphosphat (pH 6,5), 600 mM NaCl, 0,01% Triton X-100 eluiert. Die Fraktionen des eluierten EST2-ODN-Konjugats wurden vereinigt und mittels Ultrafiltration (Amicon Ultra-15) konzentriert und dreimal mit 10 mL 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA gewaschen. Das EST2-ODN-Konjugat wurde per 15%iger SDS-PAGE, Esterase-Aktivitätsfärbung (s. Abschnitt 2.3.3.2) und South-Western Blot (s. Abschnitt 2.3.4) analysiert und dessen Konzentration mittels Bradford-Messung (s. Abschnitt 2.3.1) bestimmt. Die Lagerung des EST2-ODN-Konjugats erfolgte bei 4°C.

2.3.8 Herstellung von EST2-Streptavidin-Konjugaten

Die Präparation von EST2-Streptavidin-Konjugaten (EST2-SA-Konjugaten) erfolgte durch Konjugation von Maleimid-modifiziertem Neutravidin an den Oberflächen-exponierten Thiolrest der EST2 (C97S E118C). Dazu wurde diese für 16 h bei 4°C gegen 100 mM Natriumphosphat (pH 7,2), 5 mM EDTA dialysiert. Nach Reduktion von 120 µM EST2 mit 2 mM immobilisierten TCEP bei 37°C für 1 h, wurden 40 µM reduzierte EST2 mit 25 µM Maleimid-aktivierten Neutravidin in 50 mM Natriumcitrat (pH 6,8) gemischt und für 2 h bei 25°C inkubiert. Die erfolgreiche Konjugationsreaktion wurde mittels 8%iger SDS-PAGE und Esterase-Aktivitätsfärbung überprüft. Die Aufreinigung der verschiedenen EST2-SA-Konjugate wurde durch eine Gelpermeationschromatographie (Sephacryl S-200HR; 2 cm x 85 cm, $V_0 = 43$ mL) erreicht. Nach der Äquilibrierung der Säule mit 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl (pH 8,1) wurde die Reaktionsmischung auf die Säule aufgetragen und mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 mL/min eluiert. Fraktionen wurden zu je 1 mL gesammelt. Einzelne Fraktionen wurden mittels 8%iger SDS-PAGE überprüft (s. Abschnitt 2.3.2.3).

2.3.9 Synthese von EST2-Dendrimer-ODN-Konjugaten

Die Präparation und Aufreinigung von EST2-Dendrimer-ODN-Konjugaten erfolgte nach dem Protokoll von Humenik *et al.* (2008).

Die Aktivierung des 5' Amino-modifizierten ODNs und die Reduktion von EST2 (C97S E118C) mit TCEP erfolgten wie bereits in Abschnitt 2.3.7 beschrieben.

100 nmol PAMAM-Dendrimer (G3) wurden in 123 mM Triethylamin in DMF und 93 mM Essigsäureanhydrid in DMF gegeben und bei 25°C für 2 h inkubiert. Die acetylierten Dendrimere wurden anschließend mit 3 Volumen 50 mM Natriumphosphat (pH 6,3), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA verdünnt und in Gegenwart von 1 µmol TCEP für 1 h bei 37°C reduziert. Die reduzierten Dendrimere wurden sofort mit 100 nmol Maleimid-aktivierten ODN (in 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6,5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA) vermischt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 25°C erfolgte eine Ultrafiltration des Reaktionsansatzes (Microcon YM10) in 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 8,0). Die Konjugation von Dendrimeren der 5. Generation an Maleimid-aktivierte ODNs verlief analog zu der beschriebenen Prozedur. Typischerweise erzielte man etwa 70% Ausbeute an Dendrimer-ODN-Konjugaten. Der Reaktionsverlauf wurde mittels HPLC und Harnstoff-PAGE analysiert.

Zur Kopplung der Dendrimer-ODN-Konjugate an EST2-Moleküle wurden diese mit Maleimid-Gruppen aktiviert. Dazu gab man 15 nmol Dendrimer-ODN-Konjugat in 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 8,0) zu 4,5 µmol heterobifunktionellem Reagenz SM(PEG)₂ (gelöst in DMF) und inkubierte diesen Ansatz für 1 h bei 25°C. Überschüssiges Kopplungsreagenz wurde durch Gelpermeationschromatographie (Biogel P6, 1 cm x 30 cm, V₀ = 21,5 mL) entfernt und das aktivierte Dendrimer-ODN-Konjugat mit 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6,3), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA eluiert.

Der Reaktionsansatz zur Herstellung von EST2-Dendrimer-ODN-Konjugaten bestand aus 0,2 mM reduzierter EST2 (C97S E118C) in 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6,3), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA und 0,1 mM Maleimid-aktivierten Dendrimer-ODN-Konjugat und wurde bei 37°C für 16 h inkubiert. Das Reaktionsprodukt wurde durch Gelpermeationschromatographie (Sephacryl S-200 HR Säule, 2 x 70 cm) aufgereinigt. Die Elution erfolgte in 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM KCl mit einer Flußrate von 1 mL/min. Der Hauptpeak wurde gesammelt, unter Vakuum einkonzentriert und erneut auf die Gelpermeationschromatographiesäule aufgetragen. Nach erneuter Elution und Konzentrierung der relevanten Fraktionen lag das EST2-Dendrimer-ODN-Konjugat analytisch rein vor.

2.3.10 Konjugation von Fänger-ODN an magnetische Partikel

Magnetische Partikel, deren Oberfläche mit Aminogruppen funktionalisiert vorliegt, wurden mit Hilfe des bifunktionellen Reagenzes sulfo-SMCC mit der 3'-Thiolgruppe von ODNs gekoppelt. Die magnetischen Partikel (Invitrogen Dynal, Oslo, Norwegen) weisen einen Durchmesser von 2,8 µm, eine spezifische Oberfläche von 2 – 5 m²/g und eine chemische Funktionalität von 0,1 – 0,2 mmol/g auf. Für die Kopplungsreaktion wurden 2 x 10⁸ magnetische Partikel und 60 µg ODN eingesetzt (Abb. 2-3).

Nach Resuspendieren der Partikel durch Auf- und Abpipettieren und Vortexen für 2 min wurden 2 x 10⁸ magnetische Partikel von der restlichen Lösung für 4 min in einem

magnetischen Separator getrennt. Die magnetischen Partikel wurden in 100 μL 150 mM NaCl, 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) resuspendiert und die magnetische Separation erneut durchgeführt. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt und die magnetischen Partikel letztendlich in 95 μL 150 mM NaCl, 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) resuspendiert. Die Konjugation der Amino-funktionalisierten Partikel erfolgte in Gegenwart von 1 mM sulfo-SMCC (gelöst in DMF) für 30 min bei 25°C unter ständigem Mischen. Nach magnetischer Separation der sulfo-SMCC-modifizierten Partikel für 4 min wurden die Partikel zweimal mit 100 μL 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) gewaschen und schließlich in 40 μL 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) aufgenommen. 100 μM Thiol-modifizierte DNA-Moleküle wurden vor der Kopplungsreaktion in Gegenwart von 2 mM TCEP für 15 min bei 37°C behandelt, unverzüglich mit den magnetischen Partikeln vermischt und für 2 h bei 25°C unter ständigem Mischen inkubiert. Zur Absättigung von nicht-reagierten Aminogruppen wurden die Partikel für weitere 15 min bei 37°C in Gegenwart von 5 mM Oktanthiol inkubiert. Zum Abschluss wurden die modifizierten Partikel viermal mit PBS, 0,5% BSA, 0,1% Tween 20 gewaschen, um überschüssiges ODN zu entfernen. Schließlich wurden die magnetischen Partikel in PBS, 0,1% BSA, 0,01% Tween 20, 0,02% Natriumazid resuspendiert und auf eine Konzentration von 1×10^9 magnetische Partikel/mL eingestellt. Die Lagerung der konjugierten Partikel erfolgte bei 4°C.

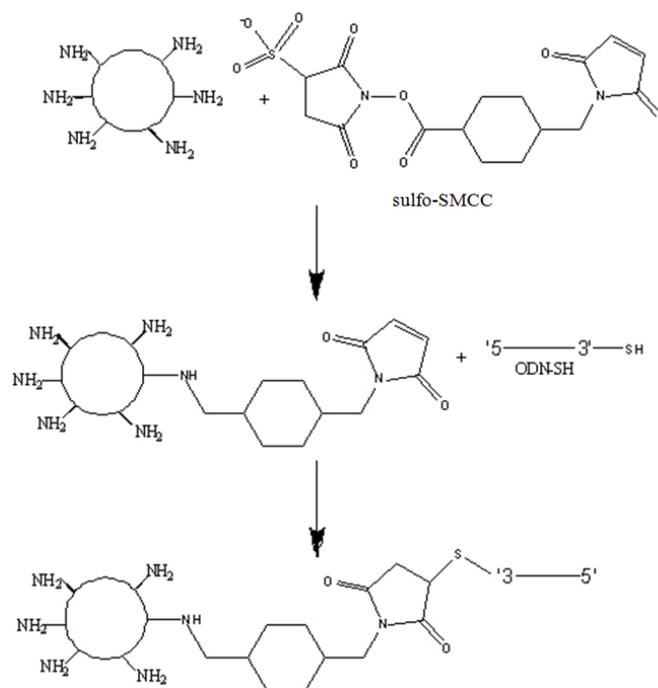


Abbildung 2-3: Schematische Darstellung der Kopplungsreaktion von Amino-modifizierten magnetischen Partikeln und Thiol-modifizierten ODNs mittels sulfo-SMCC.

2.4 Kultivierung von Bakterien

Die Anzucht von *E. coli*, *H. alvei* und *Bacillus* spp. erfolgte bei 37 °C mit LB-Medium bzw. -Agar, während *Listeria* spp. in BHI-Medium bzw. -Agar kultiviert wurde. *Leuconostoc mesenteroides* wurde bei 30°C, 170 rpm in MRS-Medium kultiviert. Tabelle 2-3 führt alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme auf. Zur Verifizierung der 16S rRNA-Sequenz von Stämmen, deren Sequenzdaten nicht in Datenbanken hinterlegt waren, wurde der relevante Bereich sequenziert (Eurofins MEG Operon, Ebersberg). Die Versuche wurden - wenn nicht anders angegeben - mit Zellen durchgeführt, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Um dies sicher zu stellen, wurde eine Wachstumskurve unter standardisierten Anzuchtbedingungen erstellt.

2.5 Bakterienquantifizierung

2.5.1 Photometrische Quantifizierung

Zur Vorbereitung der Bakterienkulturen für die Versuche erfolgte die Quantifizierung der KbE/mL durch OD₆₀₀-Messung. Anhand einer erstellten Eichgeraden wurde die der OD₆₀₀ entsprechende Keimzahl bestimmt und die Kultur mit LB-Medium verdünnt, um die höchste benötigte Keimzahl zu erhalten.

2.5.2 KbE-Bestimmung

Die KbE-Bestimmung erfolgte nach Herstellung entsprechender Verdünnungsreihen in PBS auf LB-Agarplatten nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C. Die Berechnung erfolgte entsprechend dem arithmetischen Mittel aus zwei bis drei ausgezählten Verdünnungsstufen.

2.5.3 Mikrobiologische Analyse von Fleischproben

2.5.3.1 Fleisch: Herkunft, Ursprung und Tropfsaftgewinnung

Es wurde frisches Schweine- und Rindfleisch aus unterschiedlichen Schlachtbetrieben verwendet. Das Fleisch wurde in Plastikbeutel portioniert und mit Lufteinschluss verschweißt. Anschließend erfolgte eine Lagerung der Beutel für 3 – 4 Tage bei 4°C im Kühlhaus. Der Fleischtropfsaft, der sich während der Lagerung in den Beuteln ansammelte, wurde unter sterilen Bedingungen entnommen. Nach Entnahme eines Aliquots für die mikrobiologischen Keimzahlbestimmungen wurde der Fleischtropfsaft bis zur Aufarbeitung bei -20 °C gelagert.

2.5.3.2 Mikrobiologische Keimzahlbestimmung

Sowohl die Fleischtropfsäfte nach der Entnahme, als auch die Anreicherungen in BPW wurden nach standardisierten mikrobiologischen Methoden untersucht (Baumgart 2004) (Tab. 2-6).

2.5.3.3 Anreicherung der Fleischtropfsäfte

Die Anreicherung aller Fleischtropfsäfte fand in Triplikaten statt. Hierzu wurden die Fleischtropfsäfte nach dem Auftauen gut durchmischt und anschließend 1:10 mit Anreicherungsmedium (BPW) versetzt (9 mL Tropfsaft + 21 mL BPW). Die Anreicherung erfolgte bei 37°C bei 100 rpm für 5 h. Nach der Anreicherung wurden aus jedem Kolben 1 x 1,5 mL für die sofortige RNA-Isolierung und die anschließende Biochip-Analyse entnommen.

Tabelle 2-6: **Bedingungen der mikrobiologischen Analysen für das Serienexperiment.**

Keim	Agar	Bebrütung
<i>E. coli</i> , Coliforme	<i>Brilliance E. coli/coliform selective agar</i>	37 °C, 1 Tag
Gesamtkeimzahl	ST1	30 °C, 2 Tage
Laktobazillen	MRS	25 °C, 3-4 Tage
Pseudomonaden	DHL + Oxidase-Test	30 °C, 1 Tag

2.5.3.4 Biochipmessung

Die Biochipmessung hatte den Charakter einer Blindstudie, bei der vom Institut für Biotechnologie und Mikrobiologie des Max Rubner-Instituts, je untersuchten Tropfsaftes sechs Proben ausgehändigt wurden. Drei Proben enthielten die RNA der Anreicherungen. Eine Positivkontrolle enthielt *E. coli* RNA in hoher Konzentration, die etwa der RNA-Isolierung aus 10^7 KbE *E. coli* entsprach. Weiterhin waren zwei Negativkontrollen enthalten, die entweder aus Wasser, aus RNA-Isolaten von Anreicherungen, die mikrobiologisch *E. coli* negativ waren, oder aus RNA lebensmittelrelevanter Keime bestanden. Die Stammbestimmung erfolgte mittels rDNA-Sequenzierung und biochemischen Methoden (Heidenreich *et al.*, 2009).

2.6 Kultivierung von eukaryontischen Zelllinien

Alle Arbeiten mit eukaryontischen Zelllinien wurden zum einen ausschließlich unter Verwendung steriler Lösungen, Medien und Verbrauchsmaterialien und zum anderen stets unter der Sterilbank durchgeführt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in T185-Zellkulturflaschen (185 cm²) (Nunc, Wiesbaden) in 30 mL Medium bei 37°C und ca. 90% Luftfeuchtigkeit in einem mit 5%

CO₂ begasten Wärmeschrank. Nach etwa 2 – 3 Tagen etablierte sich in den Zellkulturflaschen eine unter dem Lichtmikroskop sichtbare semikonfluente Zellschicht, worauf man die Zellen im Verhältnis 1:3 bis 1:10 subkultivieren konnte. Das Ablösen der Zellen von der Flaschenwand erfolgte durch leichtes Klopfen nach Abpipettieren des verbrauchten Mediums, Waschen mit PBS-Puffer und Zugabe von 3 mL Trypsin-EDTA. Daraufhin inkubierte man die Zellen je nach Zelllinie für zwei bis fünf Minuten bei Raumtemperatur oder bei 37°C im Wärmeschrank und stoppte die Wirkung von Trypsin-EDTA durch Zugabe von 7 mL Zellkulturmedium ab. Zur Analyse der Gen- bzw. miRNA-Expression wurden 6-Loch-Platten (Nunc, Wiesbaden) verwendet, in die Zellen einen Tag vor Benutzung ebenfalls im Verhältnis 1:5 bis 1:10 eingesät wurden (12 mL Medium pro Platte).

Die eukaryontischen Zelllinien sollen im Folgenden kurz beschrieben werden:

MCF-7 (Humane Brustkrebszelllinie mit Östrogenrezeptor):

Diese Zelllinie wurde 1970 von H. D. Soule aus dem Pleuraerguß einer Patientin mit einem Adenokarzinom der Mamma isoliert (Soule *et al.*, 1973). Dabei handelt es sich um in der Kultur adhärent wachsende, epitheliale Zellen. Die Zelllinie wurde vom Lehrstuhl für Organische Chemie (Prof. Schoberth) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte in RPMI 1640-Medium mit 10% (v/v) Hitze-inaktiviertem fötalem Rinderserum (Biochrom KG Seromed, Berlin), Streptomycin (1 mg/mL) und Penicillin (1.000 U/L) (Gibco, Berlin) bei 37°C und 5% CO₂/95% Luftfeuchtigkeit bis zur Konfluenz.

HCT116 und HCT116 *hSecurin*^{-/-} (Kolonkarzinomzelllinie):

Die Kolonkarzinomzelllinie HCT116 und Derivate wurde vom Lehrstuhl für Genetik (Prof. Stemmann) zur Verfügung gestellt. HCT-116-Zellen wurden in DMEM *high glucose*-Medium (Gibco, Berlin) mit 10% (v/v) fötalem Kälberserum (Gibco, Berlin) und 1% (v/v) Penicillin (1.000 U/L) und Streptomycin (1 mg/L) bei 37°C und 5% CO₂/95% Luftfeuchtigkeit bis zur Konfluenz kultiviert. Neben der Wildtypzelllinie wurde auch die *Knockout*-Zelllinie, bei der das Securin-Gen deletiert wurde, unter analogen Bedingungen kultiviert (Jallepalli *et al.*, 2001).

2.7 Elektrochemischer Nachweis von Hybridisierungsereignissen

2.7.1 Fluidik

Da die Auslesung des DNA-Biochips zum einen unter physiologischen Bedingungen, d.h. in einer gepufferten Salzlösung erfolgen soll, um die Aktivität des Reporterenzym zu gewährleisten, zum anderen die freie Diffusion zwischen den Elektroden möglich sein muss, ist der Aufbau eines entsprechenden Fluidiksystems notwendig. Dieses

besteht aus einer Durchflusszelle mit einem Durchflussvolumen von 10 μL , welche den Chip umschließt, sowie Zu- und Ablaufkanülen zum Flüssigkeitsaustausch. Die zur Messung benötigte Flüssigkeit wird über Silikonschläuche (Innendurchmesser 0,89 mm, Wanddicke 0,85 mm, 2 Stopper, Liquid-Scan, Überlingen) mittels einer Peristaltikpumpe durch die Messkammer gepumpt. Das Fördervolumen der Pumpe bei den verwendeten Schläuchen liegt bei etwa 0,1-0,8 mL/min bei 10 bis 100 Umdrehungen pro Minute (gemessen mit 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0)) (Abb. 2-4).

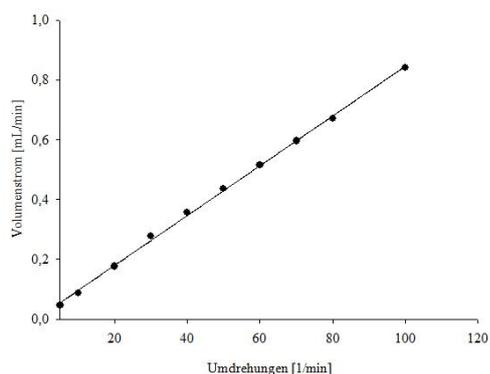


Abbildung 2-4: Volumenstrom der Peristaltikpumpe in Abhängigkeit von der Drehzahl.

2.7.2 Aufbau der Biochip-Apparatur

Die Biochip-Apparatur“ des Biochemielehrstuhls der Universität Bayreuth besteht aus den in Abbildung 2-5 dargestellten Komponenten. Der Aufbau umfasst eine peristaltische Pumpe (LKB-Pumpe P-1, Pharmacia Biotech, Freiburg), die die Lösungen durch die Hybridisierungskammer pumpt. Die Chips sind eine Anfertigung von Heraeus (Hanau). Die elektrische Auslesung und die Steuerung der Pulsfolge erfolgt über einen Adapter (Analog-Digital-Wandler), der über ein SCB-68 Interface (National Instruments, Austin, USA) mit der PCI-6052E Karte (National Instruments, Austin, USA) in einem Personalcomputer (Celsius 420 P III 800 von Fujitsu Siemens, München) verbunden ist. Die Steuerung der Biochip-Apparatur erfolgt über ein von P. Paulicka (Siemens, Erlangen) auf der Basis von *LabView* 6.1 (National Instruments, Austin, USA) programmiertes virtuelles Instrument.

2.7.3 Messprinzip der Biochip-Apparatur

2.7.3.1 Präparation der Chips

Die Chips wurden als Doppelmodule geliefert, wobei die acht Goldelektroden jedes Moduls noch miteinander kurzgeschlossen sind (Abb. 2-6). Um die Kurzschlüsse zu entfernen, wurden die Module jeweils mit einer Schere ausgeschnitten. Die einzelnen Module bestehen aus zwei Reihen mit jeweils vier Goldelektroden. Die jeweils äußeren Goldelektroden wurden mit einer 3:2-Silber/Silberchloridlösung (Electrodag® 6037 SS,

Acheson Colloiden B.V., Scheemda, Niederlande) beschichtet, um sie als Referenzelektroden einsetzen zu können.

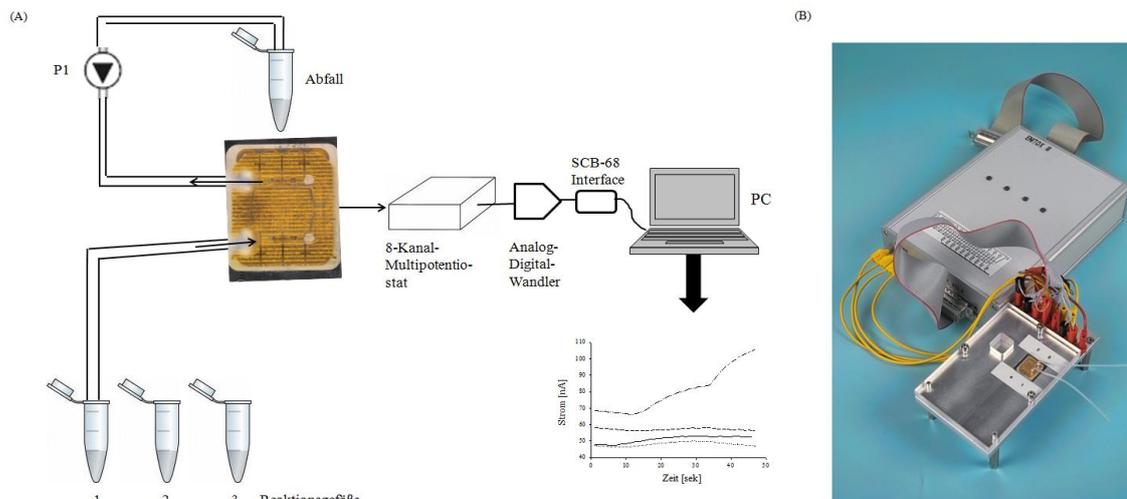


Abbildung 2-5: Schematische Darstellung des Aufbaus der Chip-Apparatur (A) und Photo der Chip-Apparatur einschließlich Multipotentio- stat (B).

Dazu wurde 1 g Electrodag[®] mit 250 μ L Acrosolv versetzt, diese Lösung wurde in einer Plastikspritze aufgenommen und mit Hilfe von *Precision Tips*-Nadeln (GLT, Pforzheim) auf die äußersten Goldelektroden aufgetragen. Anschließend wurden die Module für mindestens 30 min bei 70°C im Trockenschrank getrocknet, um Lösungsmittel aus der Silber/Silberchloridlösung zu entfernen.

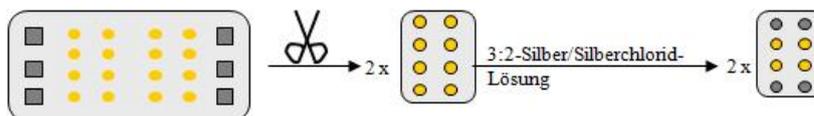


Abbildung 2-6: Schematische Darstellung der Präparation der Chips. Aus dem Doppelmodul werden die einzelnen Module herausgeschnitten und anschließend durch Auftragung von Silber/Silberchlorid mit Referenzelektroden versehen.

2.7.3.2 Pulsfolge und Messprinzip

Der Aufbau des verwendeten Chiplesers trennt die beiden Reihen eines Chipmoduls voneinander, so dass je vier Elektroden einen Reaktionsraum bilden. Die beiden äußeren Elektroden wurden kurzgeschlossen und geerdet. Die Pulsfolge konnte folglich nur an die beiden Goldelektroden, die Messelektroden, angelegt werden. An beide Goldelektroden wurde zunächst für 250 ms ein Rechteckpuls von +200 mV angelegt. Die Potentialdifferenz reicht aus, um *p*-Aminophenol zum Quinonimin zu oxidieren (Abb. 2-7). Die freigesetzten Elektroden wurden als Stromfluss detektiert, allerdings wurde stets nur die Stromstärke der letzten 37,5 ms des 250 ms-Pulses aufgezeichnet und ausgewertet. Im Anschluss an den 250 ms-Puls wurden die Goldelektroden umgepolt und für 750 ms wurde ein -200 mV-Puls angelegt. In dieser Zeit wurde

Quinonimin zu *p*-Aminophenol reduziert. Parallel zur Oxidation von *p*-Aminophenol bzw. zur Reduktion von Quinonimin erfolgte an der Referenzelektrode die Reduktion von Silber(I)-chlorid bzw. die Oxidation von Silber.

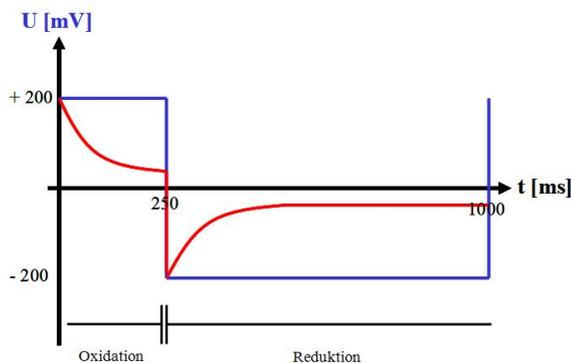


Abbildung 2-7: **Pulsfolge und Verlauf der Stromstärke.** Die blauen Linien entsprechen dem Verlauf der an eine Goldelektrode angelegten Spannung. Die roten Linien verdeutlichen den Verlauf der Stromstärke bei mittleren Konzentrationen von *p*-Aminophenol.

2.7.3.3 Generelles Vorgehen bei Messungen mit der Biochip-Apparatur

Ein mit Silber/Silberchlorid-Lösung präpariertes ausgeschnittenes Chipmodul wurde in den Chipleser eingesetzt, wobei die Elektroden nach oben zeigten und das Modul durch die Silikonmatte fixiert wurde. Es wurde so verkabelt, dass die beiden Silber/Silberchlorid-Elektroden kurzgeschlossen und geerdet wurden. Die Goldelektrode, die dem Einlass am nächsten ist, wurde mit Kanal 2 verbunden, die zweite Goldelektrode eines Reaktionsraums mit Kanal 1. Die darauffolgende Goldelektrode wurde mit Kanal 3, die Elektrode, die dem Auslass am nächsten ist, wurde folglich mit Kanal 4 verbunden. Die Kanäle wurden im *LabView*-Messprogramm entsprechend ausgegeben.

Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur und mit einer Flussrate von 250 $\mu\text{L}/\text{min}$ durchgeführt.

Zwischen zwei Messungen wurde stets mit dem verwendeten Puffer gewaschen, nach jeder Messreihe wurde der Chipleser und die Pumpe mit 2 - 5 mL 1% SDS und anschließend mit 2 - 5 mL ddH₂O gereinigt. Wichtig war Luftblasen zu vermeiden, da sie zum einen die Messung verfälschen und zum anderen die Lebensdauer des Chips verringern.

2.7.3.4 Temperaturkontrolle der Biochip-Apparatur

Zur aktiven Erwärmung bzw. Kühlung des Biochips wurde ein Peltier-Element verwendet. Die Temperatursteuerung wurde mit einem Oberflächenthermometer (Testo 601 testoterm, Testo AG, Lenzkirch) kalibriert. Dabei ergab sich ein linearer Zusammenhang zwischen einzustellender Spannung und erreichter Temperatur des Peltier-Elements (Abb. 2-8).

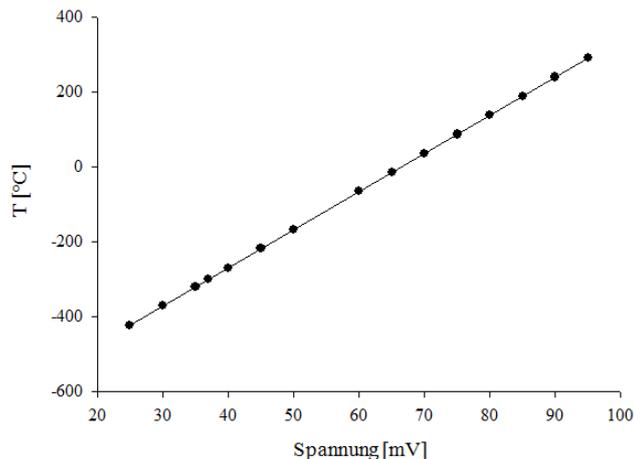


Abbildung 2-8: **Temperatur in Abhängigkeit der eingestellten Spannung am Peltier-Element.** Die Geradengleichung lautet: $y = 0,098x + 66,489$.

2.7.4 Reinigung der Goldelektroden und Immobilisierung der DNA-Fänger

Zur Reinigung der Goldelektroden wurde der komplette Chip mit EtOH (abs.) überschichtet und für 5 min bei 25°C inkubiert. Der Chip wurde darauf gründlich mit ddH₂O gespült, um alle EtOH-Reste zu entfernen. Nach vollständigem Trocknen des Chips unter einem gefilterten Luftstrom (0,2 µm PTFE-Filter) wurde dieser zur Immobilisierung in eine feuchte Kammer (Petrischale mit ddH₂O befeuchtetem Filterpapier und daraufliegenden Parafilm) gelegt. Zur Immobilisierung wurden 0,2 µM 3'-Thiol modifizierte Fänger-ODN in 300 mM NaCl, 2 mM TCEP und 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) für 5 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert, um intermolekulare Disulfidbrücken zwischen Fängermolekülen zu reduzieren. Je 0,8 µL Fänger wurde auf eine Goldelektrode aufgebracht und der Chip für 18 h bei 25°C im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Goldelektroden mit 300 mM NaCl, 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) wurde jede Goldelektrode mit 1 mM Oktanthiol (wenn nicht anders angegeben) für 1 h bei 25°C im Dunkeln behandelt. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit 300 mM NaCl, 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) konnte der Biochip für Hybridisierungsexperimente genutzt oder bei 4°C gelagert werden. Die Modifikation der Goldelektrode mit Methyl-PEO₈-NHS-Ester erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurde 1 mM Cysteamin, welches vorher in Gegenwart von 100 mM TCEP bei 37°C für 30 min reduziert wurde, für 4 h bei 25°C auf den Goldelektroden immobilisiert. Nach dreimaligem Waschen der Goldelektroden mit PBS wurden die Goldelektroden für 1 h 30 min bei 25°C mit 20 mM Methyl-PEO₈-NHS-Ester behandelt. Überschüssiges Reagenz wurde anschließend durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt.

2.7.5 Detektion ribosomaler RNA

2.7.5.1 Vier-Komponenten-*Sandwich*-Hybridisierung

2.7.5.1.1 Nachweis bakterieller ribosomaler RNA

Der Nachweis bakterieller 16S rRNA erfolgte in dieser Arbeit meist mit kovalent verknüpften EST2-ODN-Konjugaten.

Die Gesamt-RNA wurde in Gegenwart von 30 mM Mg(OAc)₂, 100 mM KOAc, 5 μM Helfer-ODN und 40 mM Tris-Acetat (pH 8,1) für 5 min bei 95°C fragmentiert. Danach inkubierte man die Gesamt-RNA für 5 min bei 25°C, um ein Anlagern der Helfer-DNA an die fragmentierte RNA zu gewährleisten. Die fragmentierte RNA wurde in Gegenwart von 450 mM NaCl, 1 mg/mL BSA, 0,025% Tween 20, 25 mM EDTA, 30 mM NaH₂PO₄ (pH 7,4) und 200 nM EST2-ODN-Konjugat bzw. 200 nM EST2-Dendrimer-ODN-Konjugat für 20 min bei 65°C auf dem Biochip hybridisiert. Wenn nicht anders angegeben wurde das Konjugat EST2-UD1082 verwendet. Nach Inkubation des Biochips für 5 min bei 65°C wurde dieser dreimal mit 75 mM NaCl, 4 mM EDTA, 0,05% Tween 20 und 5 mM NaH₂PO₄ (pH 7,4) gewaschen, um unspezifisch gebundene RNA bzw. EST2-ODN-Konjugate zu entfernen. Der Chip wurde anschließend in das Chipgerät eingelegt, die Elektroden mit den Kontakten verbunden und mit einer Fließgeschwindigkeit von 25 μL/min 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) durch die Hybridisierungskammer gepumpt bis eine stabile Basislinie des Stromes aller vier Elektroden erreicht war. Nach Zugabe von 2 mM Substrat pAPB im Durchfluß kam es in Gegenwart von Analyt zu einem Anstieg des Stromes und nach Erreichen einer Plateauphase wurde der Substratfluss gestoppt. Danach kam es in den ersten Sekunden zu einem linearen Stromanstieg, der proportional zur immobilisierten Menge an EST2 ist (Nebling *et al.*, 2004).

2.7.5.1.2 Auswertung der Meßdaten

Zur Auswertung der elektrochemischen Messung wurde der Anstieg des Stroms in den ersten fünf Sekunden (nA/sek) unmittelbar nach Stoppen des Flusses ermittelt.

2.7.5.2 Detektion von RNA mittels Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung

Um das EST2-ODN-Konjugat mit dem EST2-SA-Konjugat zu vergleichen, wurde letzteres zur Detektion von 16S rRNA verwendet.

2.7.5.2.1 Detektion ribosomaler RNA mittels *Sandwich*-Hybridisierung

Fragmentierungs- und Hybridisierungsbedingungen wurden wie im vorherigen Kapitel gewählt. Bei der Hybridisierung war anstatt 200 nM EST2-ODN-Konjugat hier 200 nM biotinyliertes Detektor-ODN anwesend. Nach dem Waschschrift wurde in diesem Fall die Elektrode mit 0,5 mg/mL EST2-SA-Konjugat in 750 mM NaCl, 1 mg/mL BSA, 0,025% Tween 20 und 75 mM Natriumcitrat (pH 7,0) für 10 min bei 25°C behandelt.

Ungebundenes Reporterkonjugat wurde durch Waschen mit 75 mM NaCl, 1 mg/mL BSA, 0,05% Tween 20 und 7,5 mM Natriumcitrat (pH 7,0) entfernt. Die elektrochemische Detektion von immobilisierter EST2 erfolgte analog zu 2.7.5.1.1 mit 2 mM pAPB in 100 mM Natriumphosphat (pH 7,0).

2.7.5.2.2 Detektion Biotin-markierter RNA

2.7.5.2.2.1 Enzymatische Biotin-Markierung von Gesamt-RNA

Die T4 Polynukleotidkinase katalysiert in Gegenwart des Substrats ATP γ S die 5'-Thiolmarkierung von RNA. Der Thiolrest wurde anschließend mit Maleimid-modifiziertem Biotin umgesetzt.

In einem ersten Schritt wurde *E. coli* Gesamt-RNA (1,0 μ g) in Gegenwart von 30 mM Mg(OAc) $_2$, 100 mM KOAc und 40 mM Tris-Acetat (pH 8,1) bei 95°C für 5 min fragmentiert und anschließend der Reaktionsansatz bei 25°C für 5 min abgekühlt. Für die Dephosphorylierung des 5'-Endes inkubierte man 1 μ g fragmentierte *E. coli* Gesamt-RNA in 50 mM Tris-HCl (pH 7,9), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl $_2$, 1 mM DTT und 1 U Alkalischer Phosphatase bei 37°C für 30 min. Darauf inkubierte man die dephosphorylierten RNA-Fragmente in 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl $_2$, 5 mM DTT, 1 mM ATP γ S und 10 U T4 Polynukleotidkinase bei 37°C für 30 min. Die Biotin-Markierung wurde darauf durch Zugabe von 1 mM Biotin-Maleimid (gelöst in DMF) eingebracht und die Reaktionsmischung für 30 min bei 65°C inkubiert. Dabei kommt es gleichzeitig zur Hitzeinaktivierung der T4 Polynukleotidkinase. Die Aufreinigung des Reaktionsansatzes erfolgte durch Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließender EtOH-Fällung (s. Kapitel 2.2.2.6).

2.7.5.2.2.2 Dot Blot-Analyse der Biotin-markierten RNA-Fragmente

Die erfolgreiche Biotin-Markierung der RNA-Fragmente aus *E. coli* wurde mittels Dot Blot überprüft. Um eine quantitative Aussage zu ermöglichen, wurden parallel definierte Mengen an Biotin-markierter Kontroll-DNA analysiert.

Auf eine Nitrocellulose-Membran wurden je 1 μ L 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg und 0 pg einer biotinylierten Kontroll-DNA in 6 x SSC aufgebracht. Von der Biotin-markierten RNA-Probe wurde 1 μ L unverdünnt und 1 μ L 1:10 in 6 x SSC verdünnt auf die Membran aufgetropft. Nach Fixierung der Nukleinsäure auf der Nitrocellulosemembran durch UV-Crosslinking bei einer Wellenlänge von 254 nm für 3 min wurde die Membran für 30 min in 1%iger BSA-Lösung in TBS-Puffer geschwenkt, um freie Bindungsstellen der Membran zu blockieren. Nach Anbindung von 0,4 U/mL AP-SA-Konjugat in TBS an die immobilisierte Nukleinsäure für 30 min bei 25°C wurde die Membran zweimal für 20 min mit TBS, 1% Tween 20 gewaschen. Die gebundene Alkalische Phosphatase wurde nach Zugabe des Substrats BCIP/NBT (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat/Nitroblau-Tetrazoliumsals) (400 μ L BCIP/NBT-

Stammlösung in 20 mL 100 mM Tris-HCl (pH 9,5), 100 mM NaCl und 50 mM MgCl₂) für 10 min bei 25°C im Dunkeln nachgewiesen. Die Membran wurde anschließend eingescannt und per Software (*UTHSCSA ImageTool*, Version 3, *University of Texas Health Science Center*, USA) die Pixel der einzelnen Spots ausgewertet und so die Menge an biotinylierter RNA durch Korrelation mit der Kontroll-DNA abgeschätzt.

2.7.5.2.2.3 Elektrochemischer Nachweis Biotin-markierter 16S rRNA

Für diese Experimente wurden Fänger mit einem 5'-modifizierten Thiolende verwendet, um die Bindung zwischen Biotin und EST2-SA-Konjugat sterisch nicht zu behindern.

Die Biotin-markierten RNA-Fragmente wurden in Gegenwart von 450 mM NaCl, 1 mg/mL BSA, 0,025% Tween 20, 25 mM EDTA, 30 mM NaH₂PO₄ (pH 7,4) und 5 µM Helfer-ODN bei 45°C für 20 min an die immobilisierten Fänger-ODNs hybridisiert. Die niedrigere Hybridisierungstemperatur im Vergleich zu den vorherigen Experimenten resultiert aus dem geringeren T_m für die hier vorliegende Zwei-Komponenten-Hybridisierung. Nach 5-minütiger Inkubation des Biochips bei 25°C wurden unspezifisch gebundene RNA-Fragmente durch dreimaliges Waschen mit 75 mM NaCl, 4 mM EDTA, 0,05% Tween 20 und 5 mM NaH₂PO₄ (pH 7,4) entfernt. Die Anbindung des EST2-SA-Konjugats und die elektrochemische Detektion erfolgten wie in Abschnitt 2.7.5.2.1 beschrieben.

2.7.5.2.3 Detektion ribosomaler RNA durch Immobilisierung an magnetische Partikel und enzymatischer Nachweis

Die Vertiefungen einer 96-Loch-Platte (konische Vertiefungen) wurden für 15 min bei 25°C mit 1% (w/v) BSA in TBS blockiert, um unspezifische Bindungen der magnetischen Partikel, der RNA bzw. des EST2-ODN-Konjugats zu unterbinden. Die Fragmentierung der RNA erfolgte in Gegenwart von 30 mM Mg(OAc)₂, 100 mM KOAc, 5 µM Helfer-ODN und 40 mM Tris-Acetat (pH 8,1) für 5 min bei 95°C. Das Volumen des Fragmentierungsansatzes betrug 70 µL. Danach inkubierte man die Gesamt-RNA für 5 min bei 25°C, um ein Anlagern der Helfer-DNA an die fragmentierte RNA zu gewährleisten. Die mit dem gewünschten Fänger-ODN modifizierten magnetischen Partikel wurden dreimal mit 450 mM NaCl, 1 mg/mL BSA, 0,025% Tween 20, 25 mM EDTA und 30 mM NaH₂PO₄ (pH 7,4) gewaschen und in diesem Puffer resuspendiert. Je 200 µg (ca. 7 x 10⁷ magnetische Partikel) wurden in die Vertiefungen der 96-Loch-Platte in Gegenwart von 50 µL 450 mM NaCl, 1 mg/mL BSA, 0,025% Tween 20, 25 mM EDTA und 30 mM NaH₂PO₄ (pH 7,4) vorgelegt und bei 65°C und 800 rpm für 5 min inkubiert. Nach Zugabe von 40 µL fragmentierter RNA und 200 nM EST2-ODN-Konjugat (Gesamtvolumen des Hybridisierungsansatzes 100 µL) erfolgte die Hybridisierung komplementärer Nukleinsäure bei 65°C und 800 rpm für 20 min. Nach dreimaligen Waschen jeder Vertiefung mit 75 mM NaCl, 4 mM EDTA, 0,05% Tween 20 und 5 mM NaH₂PO₄ (pH 7,4) und anschließender

magnetischer Separation für 1 min wurden die magnetischen Partikel in 100 μ L 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) und 4 mM *p*-Nitrophenylacetat resuspendiert, für 30 min bei 37°C und 800 rpm inkubiert und der Überstand nach magnetischer Separation in die entsprechenden Vertiefungen einer 96-Loch-Platte 20-fach verdünnt überführt. Die Bestimmung der EST2-Aktivität erfolgte durch Absorptionsmessung des gebildeten *p*-Nitrophenols bei einer Wellenlänge von 405 nm mittels eines 96-Loch-Platten-Lesers.

2.7.5.3 Detektion von DNA und ribosomaler RNA mittels immobilisiertem *Molecular Beacon*

2.7.5.3.1 Beschichtung der Goldelektroden mit Fängermolekülen

Die Co-Immobilisierung der DNA-Moleküle mit Stamm-Schleife-Struktur und der oligo-(dT)-Molekülen in unterschiedlichen molaren Verhältnissen erfolgte in 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0), 1 M NaCl und 2 mM TCEP. Die Reduktion möglicherweise ausgebildeter intermolekularer Disulfidbrücken erfolgte bei 37°C für 5 min. Je 1 μ L 2 μ M *Molecular Beacon* und 6 μ M oligo-(dT) (wenn nicht anders angegeben) wurden für 18 h bei 25°C im Dunkeln immobilisiert. Unspezifisch gebundener Fänger wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Nachsättigung der Goldelektrode erfolgte mit 1 mM Oktanthiol in PBS für 1 h bei 25°C im Dunkeln. Erneut wurden unspezifisch gebundene Fänger durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Der so behandelte Chip konnte in einer feuchten Kammer bei 4°C gelagert werden.

2.7.5.3.2 Nachweis komplementärer DNA

Zur Hybridisierung zwischen Zielanalyt und immobilisiertem *Molecular Beacon* wurden unterschiedliche Konzentrationen an komplementärer DNA in 750 mM NaCl, 1 mg/mL BSA, 0,025% Tween 20 und 75 mM Natriumcitrat (pH 7,0) für 30 min bei 25°C hybridisiert. Ungebundener Analyt wurde durch dreimaliges Waschen bei 25°C mit 75 mM NaCl, 1 mg/mL BSA, 0,05% Tween 20 und 7,5 mM Natriumcitrat (pH 7,0) entfernt. Die Anbindung von 0,5 mg/mL EST2-Streptavidin-Konjugat in 750 mM NaCl, 1 mg/mL BSA, 0,025% Tween 20 und 75 mM Natriumcitrat (pH 7,0) an den geöffneten *Molecular Beacon* erfolgte bei 4°C für 5 min. Ungebundenes Reporterkonjugat wurde durch Waschen mit eiskaltem 75 mM NaCl, 1 mg/mL BSA, 0,05% Tween 20 und 7,5 mM Natriumcitrat (pH 7,0) entfernt. Die elektrochemische Detektion von immobilisierter EST2 erfolgte mit 2 mM pAPB in 100 mM Natriumphosphat (pH 7,0).

2.7.5.3.3 Nachweis ribosomaler RNA mittels immobilisiertem *Molecular Beacon*

Die Gesamt-RNA wurde wie beschrieben für 15 min bei 95°C fragmentiert (s. Abschnitt 2.7.5.1.1). Danach inkubierte man diese für 5 min bei 25°C. Die fragmentierte bakterielle RNA wurde in 750 mM NaCl, 1 mg/mL BSA, 0,025% Tween

20 und 75 mM Natriumcitrat (pH 7,0) für 30 min bei 25°C hybridisiert. Ungebundener Analyt wurde durch dreimaliges Waschen bei 25°C mit 75 mM NaCl, 1 mg/mL BSA, 0,05% Tween 20 und 7,5 mM Natriumcitrat (pH 7,0) entfernt. Die EST2-SA-Konjugat-Anbindung und die Detektion erfolgten wie in Abschnitt 2.7.5.2.1 beschrieben.

2.7.5.4 *Rolling Circle* Amplifikation des 16S rRNA-Nachweises

2.7.5.4.1 Herstellung der zirkulären DNA

Die Synthese eines zirkulären DNA-Konstrukts wurde nach einem modifizierten Protokoll von Kuhn *et al.* (2002) durchgeführt.

0,5 mM eines am 5'-Ende phosphorylierten DNA-Oligonukleotids wurden in Gegenwart von 50 µM ATP, 2,5 mM MnCl₂, 5 U ssDNA-Ligase (*CircLigase*) in 50 mM MOPS (pH 7,5), 5 mM MgCl₂ und 1 mM DTT für 1 h bei 60°C inkubiert. Nach Inaktivierung der ssDNA-Ligase bei 80°C für 10 min wurde überschüssiges lineares ODN durch Exonuclease VII-Behandlung (0,2 U) bei 37°C für 30 min entfernt. Nach Entsalzen der Probe durch Ultrafiltration, zweimaliger Phenol/Chlorform-Extraktion und Ethanol-Fällung wurde das Pellet in TE-Puffer (pH 8,0) gelöst. Die entstandene zirkuläre ssDNA wurde mittels Harnstoff-PAGE (Abschnitt 2.2.1.5.3) analysiert.

2.7.5.4.2 *On-Chip Rolling Circle*-Reaktion

Die Vorbereitung der Biochips, die Immobilisierung der Fänger auf den Goldelektroden und die Fragmentierung der RNA in Gegenwart von Helfer-ODN erfolgten nach der in den Abschnitten 2.7.4 & 2.7.5.1.1 beschriebenen Vorgehensweise. Die Hybridisierung der fragmentierten RNA in Gegenwart der immobilisierten Fänger und von 200 nM UD1082-PM fand in 450 mM NaCl, 1 mg/mL BSA, 0,025% Tween 20, 25 mM EDTA und 30 mM NaH₂PO₄ (pH 7,4) bei 65°C für 20 min statt. Nach Inkubation des Biochips für 5 min bei 25°C wurde unspezifisch gebundene Nukleinsäure durch dreimaliges Waschen mit 75 mM NaCl, 4 mM EDTA, 0,05% Tween 20 und 5 mM NaH₂PO₄ (pH 7,4) entfernt. Für die *Rolling Circle*-Reaktion auf dem Chip wurden 200 nM A31-PM, 100 nM zirkuläre DNA, 33 mM Tris-Acetat (pH 7,9), 10 mM Mg(OAc)₂, 66 mM KOAc, 0,1% Tween 20, 1 mM DTT und 1 nM dNTPs für 30 min bei 37°C vorinkubiert, um eine Anlagerung des Primers (A31-PM) an die zirkuläre DNA zu erreichen. Danach gab man der Reaktionslösung 5 U φ29 DNA-Polymerase zu und inkubierte diese auf dem Biochip bei 37°C für 45 min. Nach Waschen des Biochips mit 75 mM NaCl, 4 mM EDTA, 0,05% Tween 20 und 5 mM NaH₂PO₄ (pH 7,4) bei 25°C hybridisierte man je 200 nM EST2-RCA1, EST2-RCA2 und EST2-RCA3 in 450 mM NaCl, 1 mg/mL BSA, 0,025% Tween 20, 25 mM EDTA und 30 mM NaH₂PO₄ (pH 7,4) für 60 min bei 25°C. Nach Waschen des Biochips mit 75 mM NaCl, 4 mM EDTA, 0,05% Tween 20 und 5 mM NaH₂PO₄ (pH 7,4) bei 25°C wurde der Biochip mit 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) bis zum Erreichen einer konstanten Strombasislinie gespült. Die Detektion erfolgte wie bereits beschrieben (Abschnitt 2.7.5.1.1).

2.7.6 Detektion von DNA-Oligonukleotiden (Zwei-Komponenten-Hybridisierung)

Die Reinigung der Goldelektroden und Immobilisierung der DNA-Fänger erfolgte wie in Abschnitt 2.7.4 beschrieben. Das Detektionslimit von EST2-ODN- bzw. EST2-Dendrimer-ODN-Konjugaten wurde mittels DNA/DNA-Hybridisierung ermittelt (Abb. 1-5). Dabei wurden verschiedene Konzentrationen an EST2-ODN- bzw. EST2-Dendrimer-ODN-Konjugaten in 450 mM NaCl, 1 mg/mL BSA, 0,025% Tween 20, 25 mM EDTA und 30 mM NaH₂PO₄ (pH 7,4) auf den Biochip mit komplementären Fänger-ODNs gegeben und für 20 min bei 25°C inkubiert. Unspezifisch gebundene Nucleinsäure wurde durch dreimaliges Waschen mit 75 mM NaCl, 4 mM EDTA, 0,05% Tween 20 und 5 mM NaH₂PO₄ (pH 7,4) entfernt. Für die Untersuchung der Diskriminierungsfähigkeit von Fehlbasenpaarungen wurde derselbe Aufbau gewählt, jedoch fand die Hybridisierung bei 50°C statt, um selektivere Hybridisierungsbedingungen zu gewährleisten. Die Messung erfolgte wie bereits beschrieben (Abschnitt 2.7.5.1).

Die Enzymkinetik wurde in Gegenwart von 5 nM EST2-ODN- bzw. EST2-Dendrimer-ODN-Konjugat und perfekt komplementären immobilisierten Fänger-ODNs gemessen. Verschiedene Konzentrationen an pAPB in 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) wurden anschließend durch die Hybridisierungskammer gepumpt und der Stromverlauf analysiert.

2.7.7 Detektion von PCR-Produkten

Die Immobilisierung der Fänger für die elektrochemische Detektion von PCR-Produkten mittels Biochip erfolgte wie bereits beschrieben (s. Kapitel 2.7.4). Um die beiden Stränge der DNA zu trennen oder um mögliche Sekundärstrukturen der DNA aufzulösen, wurde das PCR-Produkt in Gegenwart von 450 mM NaCl, 1 mg/mL BSA, 0,025% Tween 20, 25 mM EDTA und 30 mM NaH₂PO₄ (pH 7,4) und 5 µM Helfer-ODNs bei 95°C für 5 min denaturiert. Nach Anlagerung der Helfer-ODNs für 1 min bei 50°C wurde 200 nM EST2-ODN-Konjugat zugegeben und der Hybridisierungsansatz auf den Biochip gegeben. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei 45°C und einer 5-minütigen Inkubation bei 25°C wurde unspezifisch gebundenes EST2-ODN-Konjugat durch dreimaliges Waschen mit 75 mM NaCl, 4 mM EDTA, 0,05% Tween 20 und 5 mM NaH₂PO₄ (pH 7,4) entfernt. Die Detektion erfolgte wie bereits im vorhergehenden Kapitel beschrieben.

2.7.8 Detektion von microRNAs

Die Immobilisierung von DNA-Fängern auf Goldelektroden erfolgte wie bereits beschrieben (s. Abschnitt 2.7.4). Eukaryontische Gesamt-RNA bzw. die RNA-Fraktion mit Nucleinsäuren < 200 nt (Abschnitt 2.2.1.3) wurde in Gegenwart von 450 mM NaCl, 1 mg/mL BSA, 0,025% Tween 20, 25 mM EDTA, 30 mM NaH₂PO₄ (pH 7,4) und 200 nM EST2-UD1082-Konjugat für 20 min bei 65°C hybridisiert. Nach Inkubation des

Biochips für 5 min bei 25°C wurde dieser dreimal mit 75 mM NaCl, 4 mM EDTA, 0,05% Tween 20 und 5 mM NaH₂PO₄ (pH 7,4) gewaschen. Die weitere Vorgehensweise der elektrochemischen Detektion wurde bereits beschrieben (Abschnitt 2.7.5.1.1). Zur Detektion von miRNAs wurde stets EST2-miR verwendet.

2.7.9 Detektion von mRNAs

Die Detektion von mRNA erfolgte analog zur Detektion von miRNAs (Abschnitt 2.7.8). Zur Fragmentierung der mRNAs wurde jedoch vor der Hybridisierung die Gesamt-RNA in Gegenwart von 30 mM Mg(OAc)₂, 100 mM KOAc, und 40 mM Tris-Acetat (pH 8,1) für 15 min bei 95°C fragmentiert und danach für 3 min bei 4°C abgekühlt.

3 Ergebnisse

Die Verwendung von sensitiven und robusten Enzymen, welche die Nukleinsäuredetektion durch Hybridisierung elektrochemisch amplifizieren, stellt einen viel versprechenden Ansatz dar. Die elektrochemische Detektion erweist sich in diesem Zusammenhang als vorteilhaft, da sie schnell und einfach automatisierbar ist (Drummond *et al.*, 2003). Die Anwendbarkeit des thermostabilen Enzyms Esterase 2 als Reporterenzym wurde bereits in der Vergangenheit gezeigt (Agafonov *et al.*, 2005b; Huang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007) und sollte hier für die Detektion verschiedener Nukleinsäurespezies etabliert werden.

3.1 Elektrochemische Detektion bakterieller 16S rRNA

Die sensitive, schnelle und zuverlässige Detektion von lebensmittelpathogenen Keimen ist ein essentieller Aspekt der Lebensmittelsicherheit. Jedoch benötigen nahezu alle der heute verwendeten Routine-Nachweismethoden mindestens 48 Stunden, oft bis zu einer Woche, bis ein positives Ergebnis feststeht (de Boer & Beumer 1999). In dieser Arbeit sollte eine elektrochemische Nachweismethode für die bakterielle 16S rRNA-Detektion etabliert werden. Im Gegensatz zu anderen DNA-Biosensoren soll hier die Anbindung des Reporterenzym nicht über Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung erfolgen (Lucarelli *et al.*, 2008), sondern über ein kovalent verknüpftes Esterase 2-Oligodesoxynukleotid (EST2-ODN)-Reporterkonjugat.

Als Modellorganismen wurden die Gram-negativen Bakterien *Escherichia coli*, *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii* und *Shigella dysenteriae* und die Gram-positiven Mikroorganismen *Listeria innocua*, *L. monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *B. atrophaeus* und *Leuconostoc mesenteroides* gewählt. Die zur Familie der *Enterobacteriaceae* zugehörigen *E. coli*, *H. alvei*, *C. freundii* und *S. dysenteriae* dienen als Markerorganismen für fäkale Lebensmittelkontaminationen (Gauthier & Archibald 2001; LaGier *et al.*, 2005). *L. monocytogenes* ist ein bedeutender pathogener Keim, dessen zuverlässige und schnelle Detektion in der Lebensmittelindustrie angestrebt wird (Grow *et al.*, 2003). Dagegen ist *L. innocua* ein apathogener Vertreter der *Listeria* spp., dessen Nachweis nicht mit dem von *L. monocytogenes* interferieren darf. *B. subtilis* wurde als Modellorganismus für den lebensmittelpathogenen Keim *B. cereus* untersucht.

3.1.1 Aufbau des Biochip-Detektionssystems

Aufgrund der Verwendung der thermostabilen EST2 kann das Reporterenzym bei diesem Detektionssystem bereits während der Hybridisierung anwesend sein. Dies ist

bei herkömmlichen Reporterenzymen nicht realisierbar, da diese durch die stringenten Hybridisierungsbedingungen denaturiert werden (Kynclova *et al.*, 1995).

In einem ersten Schritt erfolgt die Isolierung der bakteriellen Gesamt-RNA (Abb. 3-1, (1)), die in einem zweiten Schritt fragmentiert und mit Helfer-Oligodesoxynukleotiden (ODNs) hybridisiert wird (Abb. 3-1, (2)). Sowohl die Fragmentierung als auch die Helfer-ODNs bewirken eine Auflösung der komplexen Tertiärstrukturelemente der 16S rRNA (siehe Abb. 1-9), was eine effizientere Hybridisierung an komplementäre Fänger- bzw. Detektions-ODNs erlaubt (Chandler *et al.*, 2003). Somit kann der Bereich der fragmentierten 16S rRNA an den komplementären, bakterienspezifischen Fänger, der mittels Thiol-Gold-Wechselwirkung auf der Goldelektrode immobilisiert ist, hybridisieren. Der konservierte Bereich der 16S rRNA-Fragmente erlaubt die Hybridisierung mit dem EST2-ODN-Reporterkonjugat (Abb. 3-1, (3)) (s. Abschnitt 3.1.2). Das Helfer-ODN ermöglicht bei diesem Schritt die Ausbildung einer sehr stabilen Helixstruktur auf der Elektrode aufgrund einer durchgängigen coaxialen Basenstapelung (Vier-Komponenten-*Sandwich*-Komplex) (Lane *et al.*, 1997). Durch das Hybridisierungsereignis wird das Reporterenzym, EST2, in die Nähe der Goldelektrode immobilisiert und katalysiert nach Zugabe des elektroinaktiven Substrats, *p*-Aminophenylbutyrat (pAPB), die hydrolytische Spaltung zum elektroaktiven *p*-Aminophenol (pAP). Dieses durchläuft einen *Redox-Recycling*-Prozess zwischen Quinonimin und pAP, in Folge dessen je Zyklus zwei Elektronen generiert werden (Abb. 3-1, (4)), die amperometrisch erfasst werden. Bei der Datenanalyse werden die Ströme der einzelnen Elektroden simultan erfasst und gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 3-1, (5)).

Dieser Hybridisierungsansatz nutzt neben der Wahl des natürlicherweise vermehrt vorkommenden Zielmoleküls zwei weitere Amplifikationsschritte aus. Zum einen die hohe katalytische Effizienz enzymatischer Reaktionen, zum anderen das *Recycling* des Produktes über einen elektrochemischen Redox-Prozess (Niwa *et al.*, 1993).

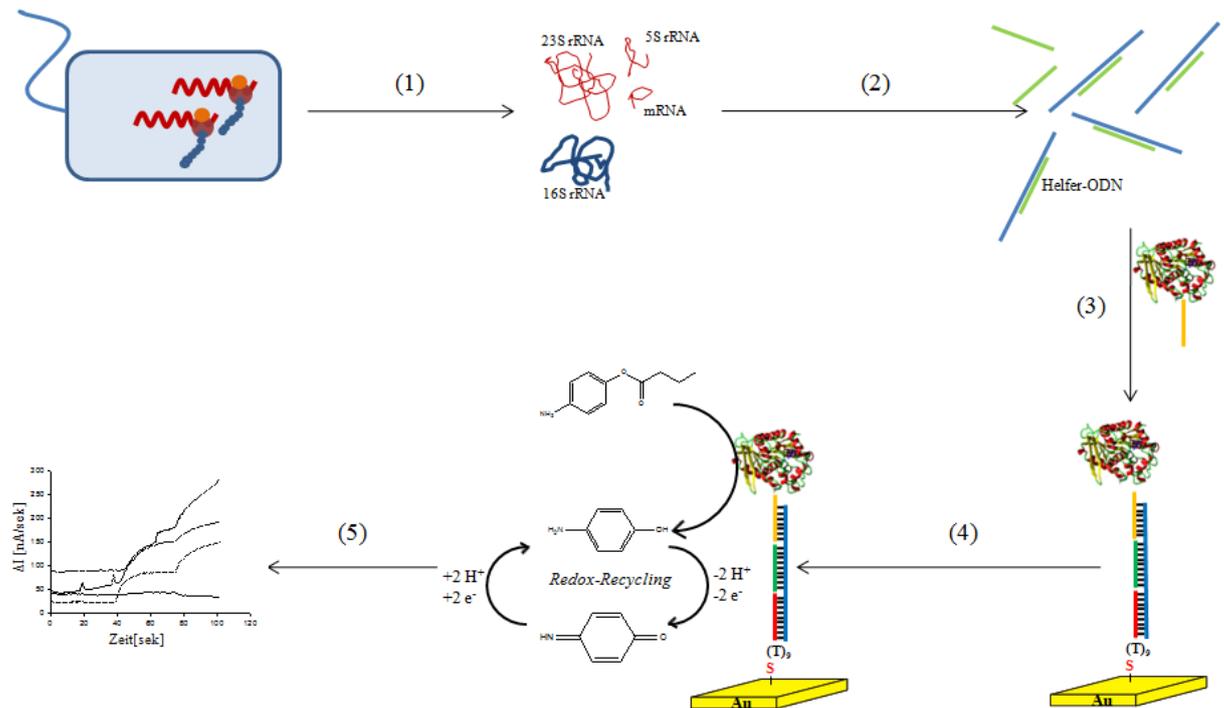


Abbildung 3-1: **Prinzipieller Aufbau der bakteriellen 16S rRNA-Detektion mit EST2-ODN-Reporterkonjugat.** Die 16S rRNA ist in blau, die Fänger-, Helfer- bzw. Detektionsoligonukleotide sind in rot, grün bzw. gelb dargestellt. Folgende Schritte sind dargestellt: (1) Isolation der Gesamt-RNA aus der mikrobiellen Probe. (2) Fragmentierung der RNA und Hybridisierung der Helfer-Oligonukleotide an komplementäre 16S rRNA-Bereiche. (3) Hybridisierung in Anwesenheit des EST2-ODN-Reporterkonjugats und Ausbildung des Vier-Komponenten-Sandwich-Komplexes auf der Goldelektrode. (4) Hydrolyse des Substrats pAPB durch EST2 zu pAP, welches einen *Redox-Recycling*-Prozess zwischen Quinonimin und pAP durchläuft, infolge dessen je Molekül und Zyklus zwei amperometrisch detektierbare Elektronen generiert werden. (5) Temporale Analyse der gemessenen Ströme an den vier Elektroden.

3.1.2 Synthese von EST2-ODN-Konjugaten

Zur Verwendung der EST2 als Reporterenzym im beschriebenen Nachweissystem wurde diese mit einem ODN, welches komplementär zu einem konservierten Bereich der 16S rRNA ist, konjugiert.

Da die Wildtyp-Esterase 2 aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* nur einen Cystein-Rest an Position 97 trägt, welcher darüber hinaus nicht solvensexponiert ist und deshalb für chemische Modifikationen nicht zugänglich ist (De Simone *et al.*, 2000), wurde der Glutamatrest an Position 118 durch ortsgerichtete Mutagenese in einen Cystein-Rest überführt (Abb. 3-2 A) (Wang *et al.*, 2007).

Mit Hilfe des bifunktionellen Reagenzes sulfo-SMCC konnte nun die Konjugation zwischen dem 5'-Amino-modifiziertem ODN und der Sulfhydrylgruppe des Cysteins an Position 118 der EST2 hergestellt werden (Abb. 3-2 B). Um eine mögliche Ausbildung von intramolekularen Disulfidbrückenbindungen zwischen den Cysteinresten 97 und 118 und mögliche Nebenreaktionen mit dem schlechter zugänglichen Cysteinrest 97 zu

unterbinden, wurde dieser Cystein- durch einen Serinrest ausgetauscht (Humenik *et al.*, 2008).

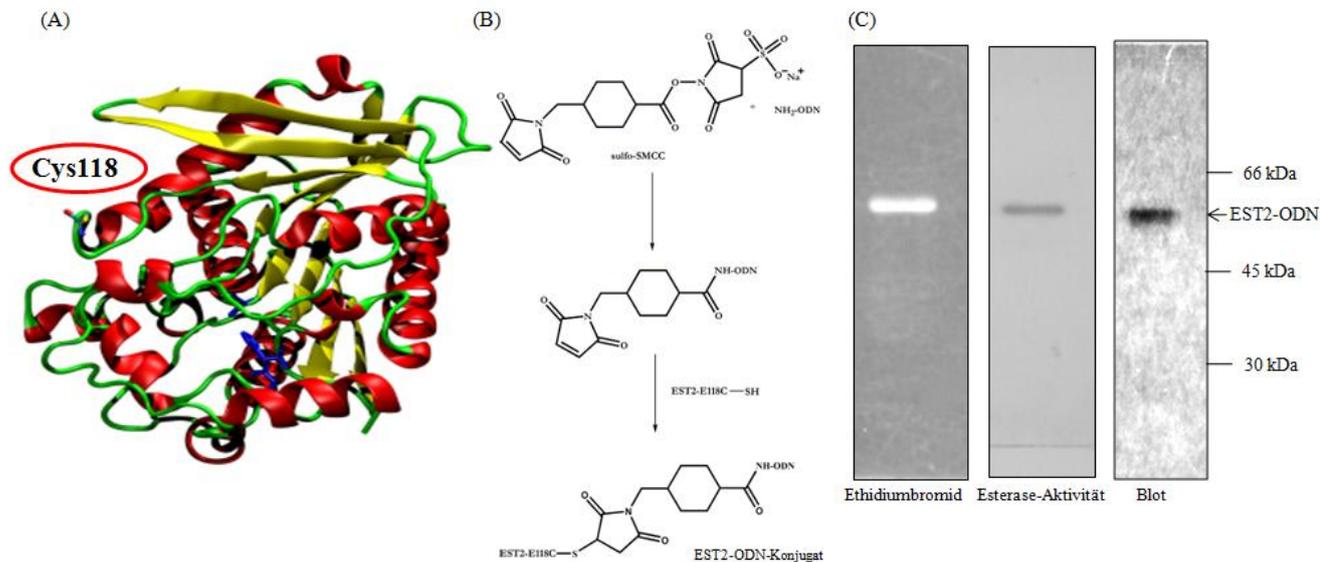


Abbildung 3-2: **Herstellung von EST2-ODN-Konjugaten.** (A) Darstellung der EST2 als 3D-Modell. Der eingefügte Cysteinrest an Position 118 und die katalytische Triade sind als Kalottenmodell dargestellt. (B) Kopplung von EST2 (C97S E118C) an NH_2 -modifiziertes ODN mittels sulfo-SMCC. (C) SDS-PAGE mit Ethidiumbromid- bzw. Aktivitätsfärbung der EST2-ODN-Konjugate nach chromatographischer Reinigung. South-Western-Blot von EST2-ODN-Konjugat und Hybridisierung mit komplementären Biotin-modifizierten ODN. Detektion der Hybridisierungsreaktion durch Anbindung eines HRP-SA-Konjugats und kolorimetrische Detektion der Enzymreaktion. Zur Orientierung sind relevante Positionen des Größenstandards angegeben.

Diese Mutationen und das Anfügen des ODNs hatten nur einen geringen Einfluss auf die enzymatischen Eigenschaften der EST2 (Tab. 3-1).

Nach der Konjugation erfolgte die Reinigung mittels Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration. Die Reinheit des Konjugats wurde durch elektrophoretische Auftrennung im Polyacrylamidgel und durch South-Western-Blot bestätigt (Abb. 3-2 C).

Tabelle 3-1: **Enzymkinetische Konstanten von EST2 und Mutanten.**

	K_M (M)	V_{\max} ($\text{M} \times \text{s}^{-1}$)	k_{kat} (s^{-1})	k_{kat}/K_M ($\text{M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$)
EST2 (WT)	$1,67 \times 10^{-4}$	$1,15 \times 10^{-6}$	290,5	$1,73 \times 10^6$
EST2 (C97S E118C)	$2,33 \times 10^{-4}$	$6,64 \times 10^{-7}$	142,8	$0,61 \times 10^6$
EST2-ODN-Konjugat	$3,33 \times 10^{-4}$	$1,37 \times 10^{-6}$	342,5	$1,03 \times 10^6$

3.1.3 Design der Sequenzen für Fänger-, Helfer- und Detektionsoligonukleotide

Die Spezifität eines DNA-Biosensors wird unter anderem durch die Auswahl geeigneter Sondenbereiche bestimmt. In dieser Arbeit wurde versucht, einen Bereich der 16S

rRNA zu wählen, der es erlaubt viele lebensmittelrelevante Mikroorganismen bei Verwendung nur eines konservierten Detektoroligonukleotids nachzuweisen.

Zur Ermittlung der relevanten Fänger-, Helfer- und Detektionsbereiche wurde eine Datenbankrecherche in der NCBI- und RDP-Datenbank durchgeführt (Cole *et al.*, 2007). Die *Accession*-Nummern sowie die entsprechenden Sequenzen wurden für die Auswahl der Sonden festgehalten (Tabelle A-4). Die Sequenzen wurden mittels multiplen Alignment mit dem Programm *ClustalW* verglichen und mit der Software *VectorNTI* oder *BioEdit* analysiert (Hall 1999). Mögliche SONDENSEQUENZEN wurden auf Selektivität getestet, indem die Sequenzen mittels *blastn* und in der RDP-Datenbank abgeglichen wurden (Altschul *et al.*, 1990).

Abbildung 3-3 A zeigt einen Sequenzvergleich des ausgewählten 16S rRNA-Bereichs (V6-Region) wichtiger pathogener und für das Hygienemonitoring relevanter Bakterien. Es wird deutlich, dass die Sequenz des Fängerbereichs hochvariabel ist, während der Sequenzabschnitt des Detektor-ODNs unter den Prokaryoten konserviert ist. Die Sequenz des Helfer-ODNs unterscheidet sich lediglich für Gram-positive und Gram-negative Bakterien. Die Lage der Sondenbindungsstellen innerhalb der 16S rRNA aus *E. coli* ist in Abbildung 3-3 B dargestellt.

Neben spezifischen Fängern für verschiedene Bakterienspezies wurde ebenfalls ein universeller Fänger anhand der 23S rRNA entwickelt (Abbildung 3-4). Aufgrund des längeren Abstandes (74 Nukleotide) zwischen Fänger- und Detektorregion im Vergleich zum 16S rRNA-basierten Bakterien-spezifischen Nachweis (41 Nukleotide) wurden für den universellen Bakteriennachweis zwei Helfer-ODNs verwendet, um eine stabile, durch koaxiale Basenstapelung stabilisierte Nukleinsäurehybridisierung zu gewährleisten.

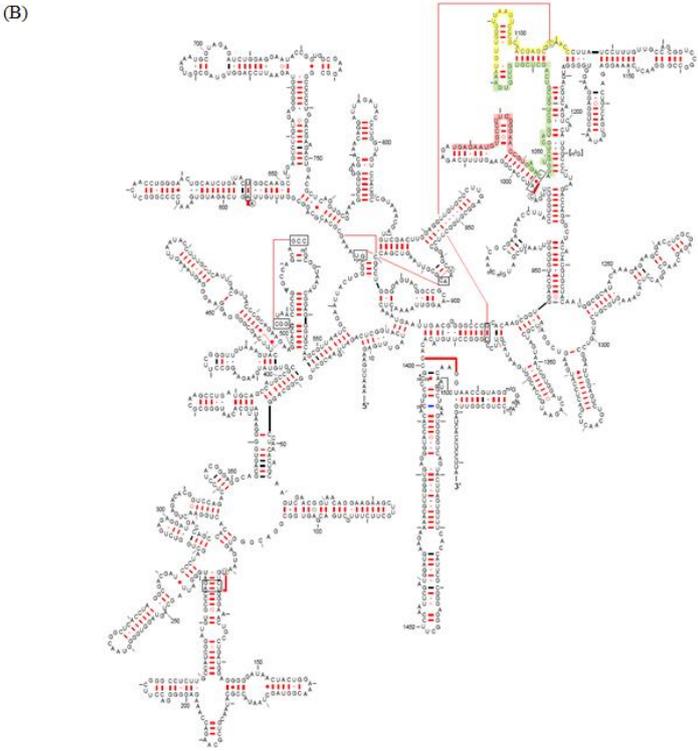


Abbildung 3-3: Lage der Sondenbindungsstellen in der 16S rRNA von *E. coli*. (A) Sequenzvergleich des zur Sondenherstellung herangezogenen 16S rRNA-Bereichs. Der Fängerbereich ist rot, der Detektionsbereich gelb und der Helferbereich grün markiert. (B) Lage der Sondenbindungsstellen

innerhalb der 16S rRNA von *E. coli*. Dargestellt sind die Bindungsstellen für den Fänger (rot), den Helfer (grün) und den Detektor (gelb). Nach: www.rna.icmb.utexas.edu (Cannone *et al.*, 2002).

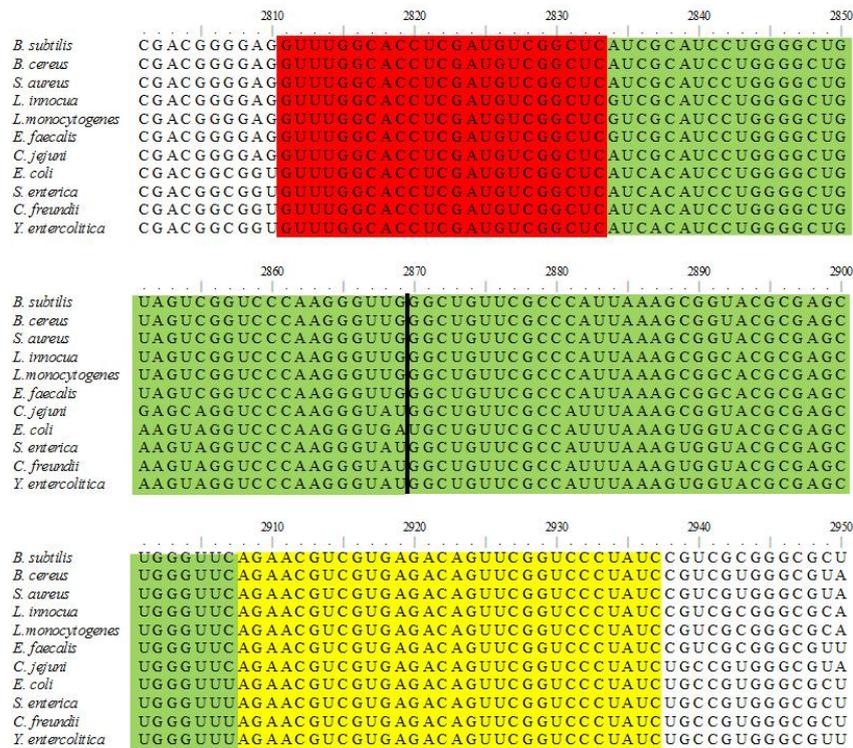


Abbildung 3-4: **Sequenzvergleich des zur Sondenerstellung verwendeten 23S rRNA-Bereichs.** Der Fängerbereich ist rot, der Detektionsbereich gelb und der Helferbereich grün markiert. Die beiden Helferbereiche sind durch einen schwarzen Strich getrennt.

3.1.4 Optimierung der Biochip-Messung

Eine spezifische und sensitive Detektion bakterieller 16S rRNA erfordert die Optimierung einer Vielzahl von Faktoren.

3.1.4.1 Immobilisierung von Fänger-Molekülen

Die Immobilisierung Thiol-modifizierter Fänger-ODNs auf der Goldelektrode ist für eine sensitive, selektive und reproduzierbare Analyse bakterieller 16S rRNA ein essentieller Faktor. Dabei spielt nicht nur die Konzentration des immobilisierten Fängers, sondern auch die Nachsättigung mit anderen Thiol-modifizierten Reagenzien eine wichtige Rolle, um mögliche unspezifische Wechselwirkungen von interferierenden Substanzen (z.B. Proteine oder Nukleinsäuren) mit der Goldoberfläche zu unterbinden.

3.1.4.1.1 Einfluss der Fängerkonzentration auf das elektrochemische Messsignal

Die elektrochemische Signalstärke hängt von der zur Immobilisierung eingesetzten Fänger-ODN-Konzentration ab. Dazu wurde die Goldelektrode mit unterschiedlichen Konzentrationen an Fänger-ODN für 18 Stunden behandelt und das resultierende

Biochip-Signal nach Hybridisierung mit komplementärer 16S rRNA gemessen (Abb. 3-5).

Geringe Fängerkonzentrationen von 0,002 und 0,02 μM ergaben lediglich eine Signalstärke von etwa 7 % bzw. 12 % gegenüber einer Fängerkonzentration von 0,2 μM (100% Signalstärke). Eine weitere Steigerung der Konzentration an Fängermolekülen hatte keinen signifikanten Anstieg des Messsignals zur Folge (Abb. 3-5). Das heißt, die Goldelektrode ist mit Oligonukleotiden vollständig besetzt. Weiterhin zeigt dieses Experiment, dass eine Goldelektrode ohne Fänger unter den angewandten Bedingungen nahezu kein Messsignal (0,03 nA/sek) produziert und somit keine unspezifische Bindung des EST2-ODN-Konjugats an der Goldelektrode stattfindet.

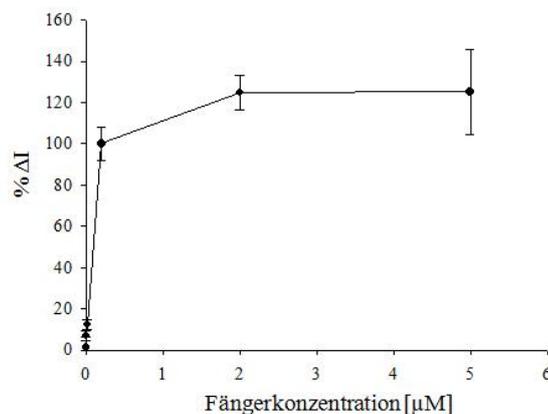


Abbildung 3-5: **Abhängigkeit des elektrochemischen Messsignals von der für die Immobilisierung eingesetzten Fängerkonzentration.** Goldelektroden wurden mit den angegebenen Konzentrationen reduziertem Fänger-ODN inkubiert und anschließend mit 1 mM Oktanthiol behandelt. Das elektrochemische Signal bei Verwendung von 0,2 μM Fängerkonzentration wurde als 100% Steigung definiert.

3.1.4.1.2 Reale Fängerkonzentration auf der Goldelektrode nach Immobilisierung

Das Ergebnis aus dem vorherigen Abschnitt zeigt, dass ab einer bestimmten Konzentration an Fänger-ODN die Goldelektrode vollständig gesättigt vorliegt. Daraus lässt sich aber nicht die Konzentration an immobilisierten Fängermolekülen auf der Elektrode ableiten. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurde eine Methode, die ursprünglich zur Bestimmung der Oligonukleotidkonzentration auf Goldnanopartikeln entwickelt wurde, verwendet (Hurst *et al.*, 2006). Das Prinzip dieser Methode ist in Abbildung 3-6 A dargestellt.

Fänger-ODNs, die am 3'-Ende eine Thiol- und am 5'-Ende eine Fluoresceingruppe tragen, wurden für 18 h in Kontakt mit einer gesäuberten Goldelektrode gebracht, wodurch sich die Fängeroligonukleotide an die Goldelektrode adsorbieren und nach einiger Zeit eine selbst-assemblierte Monoschicht (SAM) ausbilden. Diese Monoschicht wurde mit einem Überschuss an Mercaptoethanol für 18 Stunden behandelt, dessen

schnellere Immobilisierungskinetik eine Verdrängung der Fängeroligonukleotide zur Folge hat. Die in Lösung vorliegenden Fluorescein-markierten Fängermoleküle konnten nun mittels Fluoreszenzspektroskopie detektiert werden. Nach Erstellung einer Kalibrationsgeraden (Abb. 3-6 B) konnte eine Stoffmenge von 8,32 pmol Fänger-ODN pro cm^2 Goldelektrode bestimmt werden. Dies entspricht 5×10^{12} Molekülen/ cm^2 und in etwa der Menge an immobilisierten Fängermolekülen, die bereits mit elektrochemischen Methoden (Steel *et al.*, 1998) bzw. mit radioaktiv markierter DNA (Boon *et al.*, 2002b) ermittelt wurde. Dies zeigt die Zuverlässigkeit der etablierten Methode zur Bestimmung der Oberflächenbesetzung mit Fängeroligonukleotiden. Dagegen führte etwa die elektrochemische Bestimmung der Fängerkonzentration auf Goldoberflächen zu Fehlerraten von bis zu 65% innerhalb eines Experiments (Ceres *et al.*, 2007).

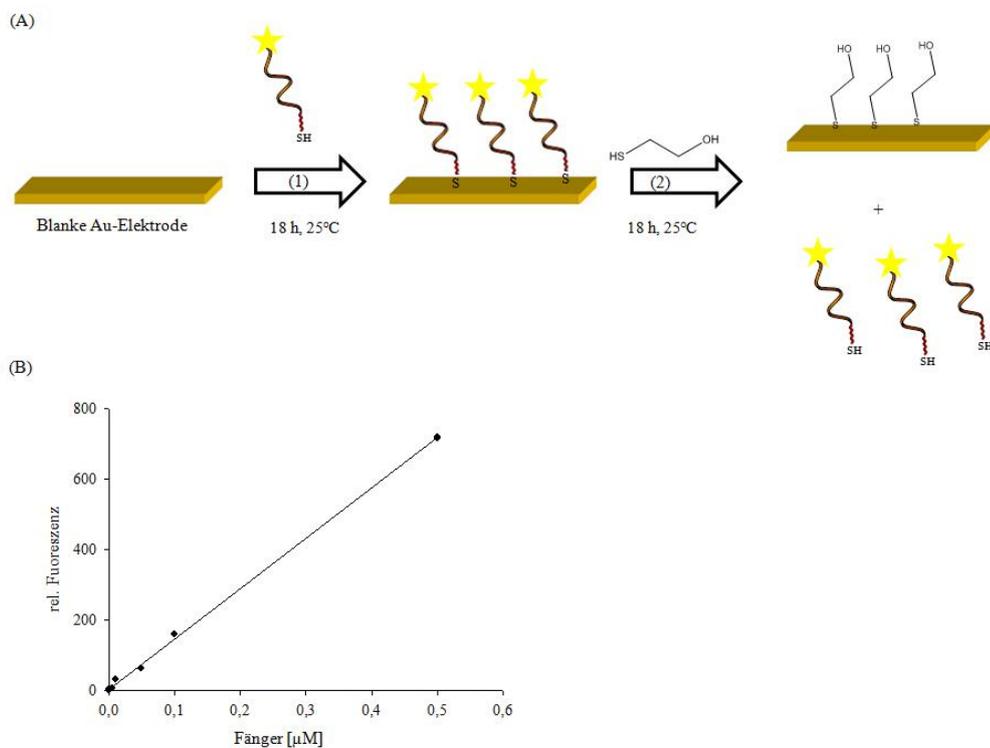


Abbildung 3-6: **Fluorometrische Bestimmung der immobilisierten Fängerkonzentration.** (A) Nach Behandlung einer blanken Goldelektrode mit Thiol- und Fluorescein-modifizierten Fänger-ODNs (1) bildete sich auf der Elektrode eine Schicht mit Fängern aus. Diese wurden in einem weiteren Schritt (2) durch Behandlung der Elektrode mit Mercaptoethanol desorbiert und liegen anschließend in Lösung vor. Der Fluoreszenzmesswert der Lösung erlaubte die Bestimmung der Konzentration an immobilisierten Fängermolekülen. (B) Ermittelte Standardkurve zwischen der Konzentration an Fluorescein-modifiziertem Fänger und Fluoreszenzsignal. Die Anregungswellenlänge λ_{ex} betrug 495 nm, während bei einer Emissionswellenlänge λ_{em} von 525 nm die Messung durchgeführt wurde. Die ermittelte Geradengleichung lautet $y = 1433,43x + 3,23$.

3.1.4.1.3 Nachsättigung mit Thiol-modifizierten Blockierungsreagenzien

Da unterschiedliche Blockierungsreagenzien Einfluss auf die Parameter Sensitivität, Selektivität und Reproduzierbarkeit ausüben können, sollte die Verwendung unterschiedlicher Reagenzien verglichen werden. Abbildung 3-7 zeigt schematisch den Effekt der Nachsättigung mit Mercaptohexanol. Eine Behandlung einer mit Fängeroligonukleotiden besetzten Elektrode mit Mercaptohexanol führte zur Entfernung unspezifisch adsorbierter Fängermoleküle. Zusätzlich stellt diese ausgebildete selbst-assemblierte Monoschicht eine Art Blockierung der Goldoberfläche gegenüber unspezifischer Bindung von Proteinen an der Goldelektrode dar (Herne & Tarlov 1997).

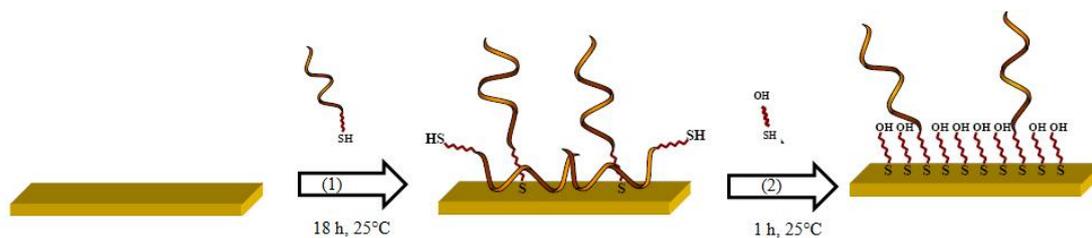


Abbildung 3-7: **Nachsättigung einer mit Fängeroligonukleotiden besetzten Goldelektrode mit Thiol-modifizierten Reagenzien.** Im ersten Schritt erfolgte die Chemisorption der Thiol-modifizierten Fänger-ODNs an die blanke Goldelektrode für 18 h bei 25°C (1). Darauf wurde die Goldelektrode für 1 h mit einem Thiol-Reagenz – hier beispielhaft Mercaptohexanol – behandelt.

Mehrere potentielle Blockierungsreagenzien, die sich hinsichtlich ihrer funktionellen Gruppen und auch ihrer chemischen Zusammensetzung unterscheiden, wurden getestet. In der Literatur wird vor allem die Anwendung von Mercaptohexanol (MCH) beschrieben (Herne & Tarlov 1997). In dieser Arbeit wurden weiterhin Oktanthiol (OT), oligo-Thymidin-SH (oligo-(dT)), Methyl-PEO₈-NHS-Ester (PEG), Triethylglykolmono-11-mercaptundecylether (TEG), BSA und das kommerziell erhältliche Blockierungsreagenz BlockIT verwendet.

Grundsätzlich führte die nachträgliche Behandlung der Goldelektrode mit diesen Reagenzien zu reproduzierbareren Messsignalen als ohne Behandlung (nicht gezeigt), da – wie bereits beschrieben – eine gleichmäßige Schicht an Fängermolekülen ausgebildet wurde, an die komplementäre Nukleinsäure effizient binden konnte. Dagegen kann es ohne Nachsättigung zu stärkeren molekularen Defekten in der Fänger-Monoschicht kommen, was zu unterschiedlichen Hybridisierungseffizienzen führt (Ceres & Barton 2003; Love *et al.*, 2005).

Der Einfluss der Nachsättigungsreagenzien ist in Abbildung 3-8 gezeigt. Die Elektroden ohne Fänger (BLANK) bzw. mit LISTERIA-Fänger gaben unabhängig vom Blockierungsreagenz kein Signal. Ohne jede Absättigung der Goldelektrode kam es dagegen zu Hintergrundsignalen von etwa 10% - 15% für diese beiden Fängermoleküle (nicht gezeigt). Die Elektrode, auf der Fängermoleküle für das mit *E. coli* näher

verwandte Enterobacteriaceae *H. alvei* immobilisiert sind, zeigte ein Signal von etwa 20 – 30% für die Nachsättigung mit BSA, MCH, oligo-(dT), OT und BlockIT, jedoch lediglich ein Signal von etwa 1% - 5% für PEG bzw. TEG. Bei keiner nachträglichen Absättigung beobachtet man für die HALVEI-Elektrode ein starkes Hintergrundsignal (nicht gezeigt).

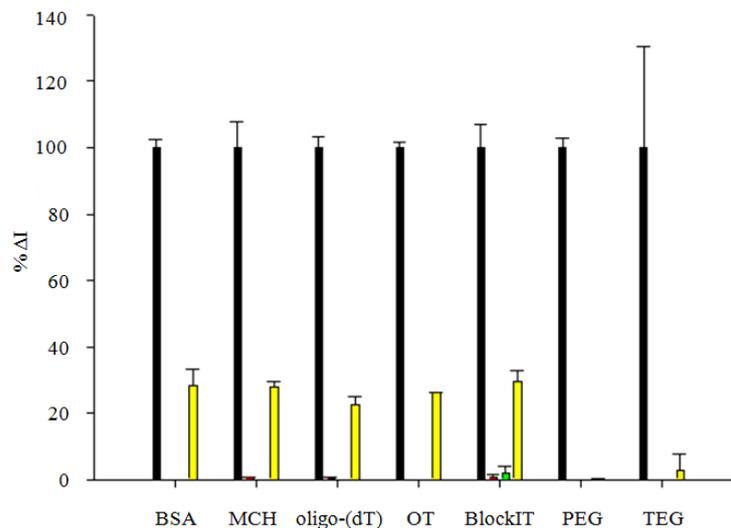


Abbildung 3-8: **Einfluss unterschiedlicher Blockierungsreagenzien auf die Selektivität der Bakterienidentifizierung mittels elektrochemischen Biochip.** Gesamt-RNA aus 10^8 KBE *E. coli* wurde für die Hybridisierung eingesetzt und auf Goldelektroden mit ECOLI- (schwarz), LISTERIA- (grün) und HALVEI-Fängern (gelb) bzw. unbehandelten Goldelektroden (BLANK, rot) nachgewiesen. Das Signal der ECOLI-Elektrode wurde jeweils als 100% Signal definiert.

Die hohe Spezifität für PEG ist bedingt durch eine effiziente und homogene Ausbildung einer Monoschicht aus PEG-Molekülen, die sich durch van der Waals-Wechselwirkungen und hydrophobe Wechselwirkungen anziehen (Jans *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008). Dadurch wird ein Binden der Zielnukleinsäure an sehr ähnliche Fänger (HALVEI) unterbunden.

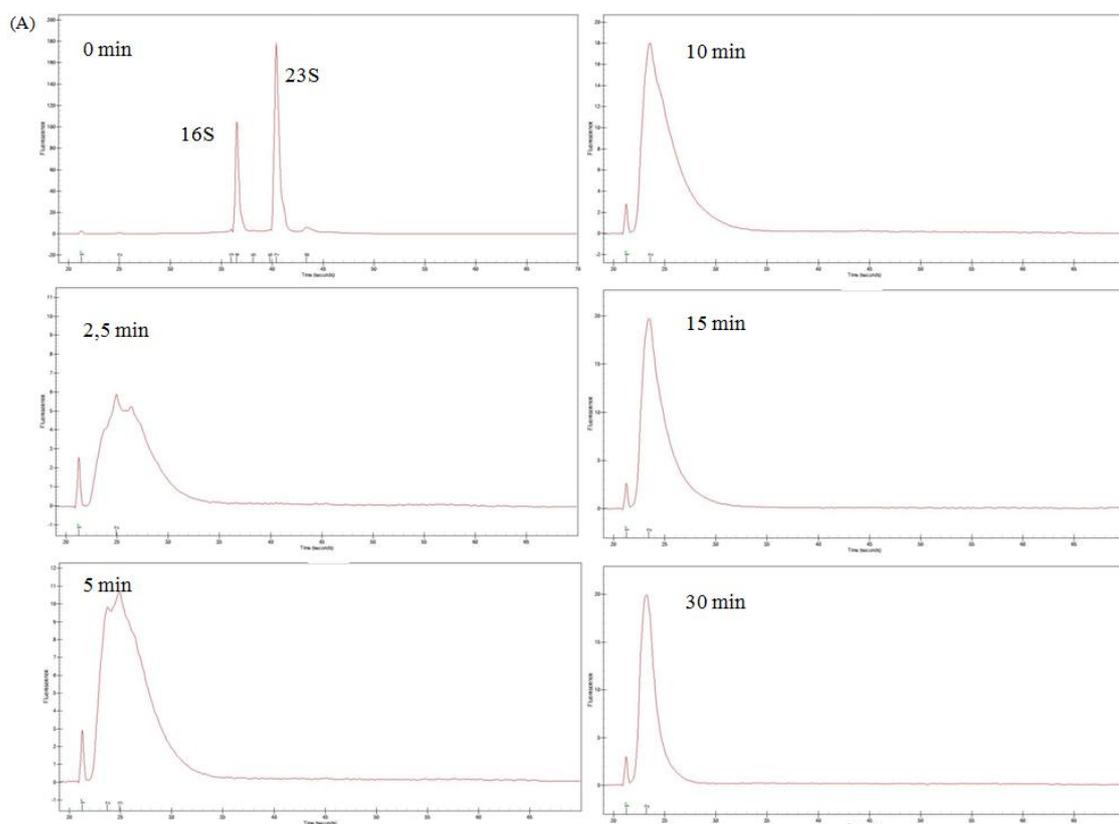
Neben PEG zeigte auch TEG eine höhere Spezifität im Vergleich zu den anderen Blockierungsreagenzien. Jedoch weist TEG neben einer Thiolgruppe am anderen Ende eine Hydroxylgruppe auf, die bei den Hybridisierungsbedingungen negativ geladen ist. Dies hat eine abstoßende Wirkung auf die Analytnukleinsäure zur Folge, wodurch geringere Signalstärken erreicht wurden ($6,47 \pm 1,98$ nA/sek für TEG im Vergleich zu $18,32 \pm 0,51$ nA/sek). Eine Nachsättigung mit PEG zeigte das beste Ergebnis in Hinblick auf Selektivität und Sensitivität.

3.1.5 Fragmentierung der Gesamt-RNA

3.1.5.1 Fragmentierung der RNA durch zweiwertige Ionen

Einer der ersten Schritte der mikrobiellen Biochip-Analyse ist die Fragmentierung der RNA. Dies ist nötig aufgrund der Länge und der komplexen Tertiärstruktur ribosomaler RNAs. Die Hybridisierungseffizienz von strukturreichen Nukleinsäuren an Festphasen-gebundene Fängersonden ist relativ gering (Shchepinov *et al.*, 1997). Die Lage der Sondenbindungsstellen (s. Abb. 3-3 B) wurde so gewählt, dass Fänger- und Detektor-ODN möglichst nahe benachbart an die 16S rRNA binden. Ein zu großer Abstand zwischen den beiden Bindungsstellen erhöht während der Fragmentierung die Wahrscheinlichkeit der Spaltung der Detektionsregion. Darüberhinaus nimmt die Anzahl und Stärke an Tertiärstrukturelementen mit der Länge der RNA-Fragmente zu (Uhlenbeck *et al.*, 1970; Xin *et al.*, 2008). Ein weiterer Aspekt der bei der Wahl der Detektionsregion berücksichtigt wurde, ist die Tatsache, dass zweiwertige Metallionen RNA bevorzugt in einzelsträngigen Bereichen oder in Schleifenstrukturen schneiden, jedoch weniger häufig in doppelsträngigen Regionen (Gornicki *et al.*, 1989; Ciesiolka *et al.*, 1992). Sowohl die Fänger- als auch die Detektorregion des 16S rRNA-Nachweises sind überwiegend doppelsträngige Bereiche (Abb. 3-3 B).

Die Fragmentierung der isolierten *E. coli* Gesamt-RNA erfolgte für die angegebenen Zeiten in Gegenwart eines alkalischen Milieus und 30 mM Mg^{2+} (Abb. 3-9).



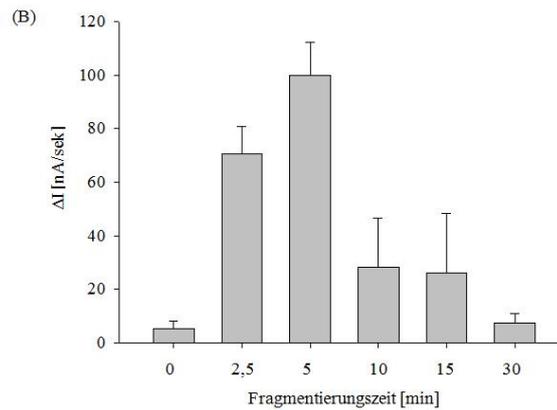


Abbildung 3-9: **Einfluss der Fragmentierungszeit auf die Signalstärke der Biochipmessung.** (A). Analyse der Fragmentgrößenverteilung in Abhängigkeit von der Fragmentierungszeit, durchgeführt mit dem *Experion Automated Electrophoresis System*. Angegeben sind die jeweiligen Fragmentierungszeiten von 3 μg *E. coli* Gesamt-RNA in Gegenwart von 30 mM Mg^{2+} (pH 8,1) bei 95 °C. (B) Abhängigkeit des gemessenen Biochip-Signals der mit ECOLI-Fängern immobilisierten Goldelektroden von der Fragmentierungszeit von *E. coli* 16S rRNA.

Eine Fragmentierungszeit von fünf Minuten lieferte für *E. coli* das deutlichste Signal (Abb. 3-9 B). Bei längerer Fragmentierung nahm das Signal ab, da die RNA-Fragmente dann oft kleiner als 200 nt waren und somit immer weniger der intakten Nachweisregion zur Verfügung stand (Abb. 3-9 A). Bei kürzerer Fragmentierungszeit dagegen waren die längeren RNA-Fragmente aufgrund von Sekundärstrukturausbildung und sterischer Hinderung nicht zu einer effizienten Hybridisierung an immobilisierte Fänger in der Lage. Desweiteren wurde gezeigt, dass die gebildeten Fragmentgrößen nicht von der eingesetzten RNA-Konzentration abhängen, da bei Fragmentierung von 1 μg bzw. 0,4 μg Gesamt-RNA dieselben Fragmentgrößen wie in Abbildung 3-9 A generiert wurden.

Auch die Abhängigkeit der Signalstärke von der Magnesiumionenkonzentration wurde untersucht. Das deutlichste Signal wurde bei 30 mM Mg^{2+} erhalten, während die Signalstärke bei 5 mM bzw. 15 mM Mg^{2+} nur etwa 30% bzw. 50% der bei 30 mM Mg^{2+} -Konzentration entsprach.

3.1.5.2 Fragmentierung der 16S rRNA durch DNAzym-Spaltung

Ein bisher noch nicht beschriebener, alternativer Ansatz ist die spezifische Fragmentierung von 16S rRNA mittels DNAzymen. Die von Santoro & Joyce (1997) durch *in vitro*-Selektion gewonnenen DNAzyme 10-23 und 8-17 stellen ein exzellentes Werkzeug für eine sequenzspezifische RNA-Spaltung dar (Abb. 3-10). Das 10-23 DNAzym besteht aus einem konservierten, ungepaarten Motiv (15 Basen), das die katalytische Domäne des DNAzyms formt. Diese wird von zwei variablen Bindungsdomänen flankiert. Das 10-23 DNAzym ist in der Lage, Purin-Pyrimidin Bindungen mit unterschiedlicher Effektivität zu spalten: $\text{AU} = \text{GU} \geq \text{GC} \gg \text{AC}$.

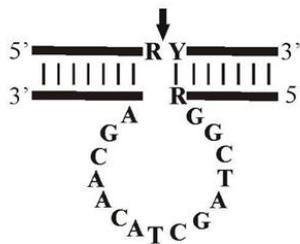


Abbildung 3-10: **Allgemeiner Aufbau des 10-23 DNAzyms.** R steht für Purin (Adenin oder Guanin), während Y Pyrimidin (Thymin oder Cytosin) bezeichnet.

Es wurden zwei 10-23 DNAzyme konstruiert, welche spezifisch das nachzuweisende 16S rRNA-Fragment ausschneiden. Nach einer kurzen Denaturierung der 16S rRNA bei 95°C behandelte man die 16S rRNA mit jeweils 15 µM der beiden DNAzyme bei 37°C für unterschiedliche Zeiten (Abb. 3-11 A). Bereits nach 15 min ist das gewünschte Spaltprodukt zu erkennen, jedoch findet selbst nach 60 Minuten kein 100%iger Umsatz der 16S rRNA statt. Auch Vester *et al.* (2002) beobachteten mit einem 50-fachen Überschuss an DNAzym und 23S rRNA als Substrat nur eine geringe Spaltungseffizienz. Die lange Fragmentierungszeit ist ein eindeutiger Nachteil dieser Methode gegenüber der Fragmentierung in Gegenwart von zweiwertigen Magnesiumionen. Die so fragmentierte 16S rRNA aus *E. coli* wurde auch für Hybridisierungsversuche auf dem Biochip verwendet (Abb. 3-11 B). Das Biochipsignal nach DNAzym-Spaltung war dem nach Fragmentierung mit Magnesiumionen ähnlich. Dies zeigt das Potential der dargestellten Methode zur spezifischen Vorbereitung von Analytmolekülen für die Biochip-Messung.

Aufgrund der längeren Fragmentierungszeit (60 min) und der kostenintensiveren Durchführung (zwei zusätzliche Oligonukleotide, welche im hohen Überschuss eingesetzt werden müssen) im Vergleich zur bisherigen Methode (5 min) wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

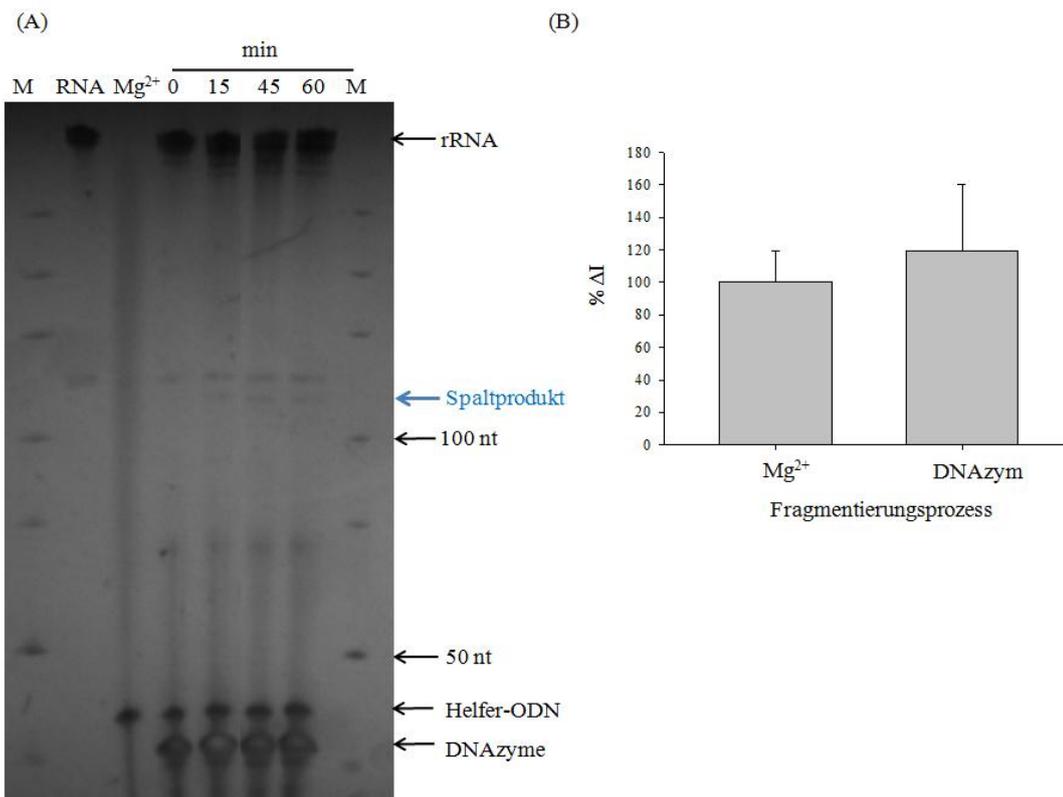


Abbildung 3-11: **Fragmentierung von 2 µg *E. coli* 16S rRNA mit sequenzspezifischen 10-23 DNAsen und elektrochemische Detektion des Spaltprodukts.** (A) 8%ige Harnstoff-PAGE der Fragmentierungskinetik der 16S rRNA-Spaltung durch DNAsen. Dargestellt sind ein Basenmarker (M), nicht-fragmentierte Gesamt-RNA (RNA), mit Mg²⁺ unter alkalischen Bedingungen gespaltene RNA (Mg²⁺) und für 0, 15, 45 und 60 min mit 10-23 DNAsen behandelte Gesamt-RNA. Markiert sind die 100 und 50 nt Markerbanden, die Banden der rRNA, des Helfer-ODNs bzw. der beiden eingesetzten DNAsen und des Spaltprodukts. (B) Elektrochemische Messung des 16S rRNA-Spaltprodukts nach Behandlung mit Mg²⁺ bzw. mit DNAsen (60 min Reaktionszeit). Das Messsignal nach Magnesiumionenfragmentierung wurde als 100% definiert.

3.1.6 Bedeutung der Länge des Helfer-Oligonukleotids für das Detektionssignal

Neben der Fragmentierung wurden Helferoligonukleotide eingesetzt, um die Tertiärstruktur der 16S rRNA im Detektionsbereich aufzulösen. Des Weiteren sorgten die Helferoligonukleotide dafür, dass der Detektionsbereich nicht oder weniger stark fragmentiert wird (Chandler *et al.*, 2003).

Die Helferoligonukleotide wurden so gewählt, dass sie in einem Bereich liegen, der relativ stark konserviert ist. Deshalb mussten nur zwei Helferoligonukleotide – für Gram-positive bzw. Gram-negative Bakterien konstruiert werden.

Um die Auswirkung des Abstandes der Helferoligonukleotide zu Fänger- bzw. Detektor-ODN auf die Signalstärke zu untersuchen, verwendete man hier Gesamt-RNA isoliert aus 10⁸ KBE *B. subtilis*. Als Fänger wurden komplementäre Sequenzen für *B. subtilis* auf den Goldelektroden immobilisiert. Es wurden nun zum einen das reguläre Helfer-ODN für Gram-positive Mikroorganismen verwendet, zum anderen aber auch

Helfer-ODNs, die jeweils 3, 6 bzw. 10 Nukleotide (nt) Abstand zwischen Helfer- und Fänger-/Detektor-ODN aufwiesen (Abb. 3-12).

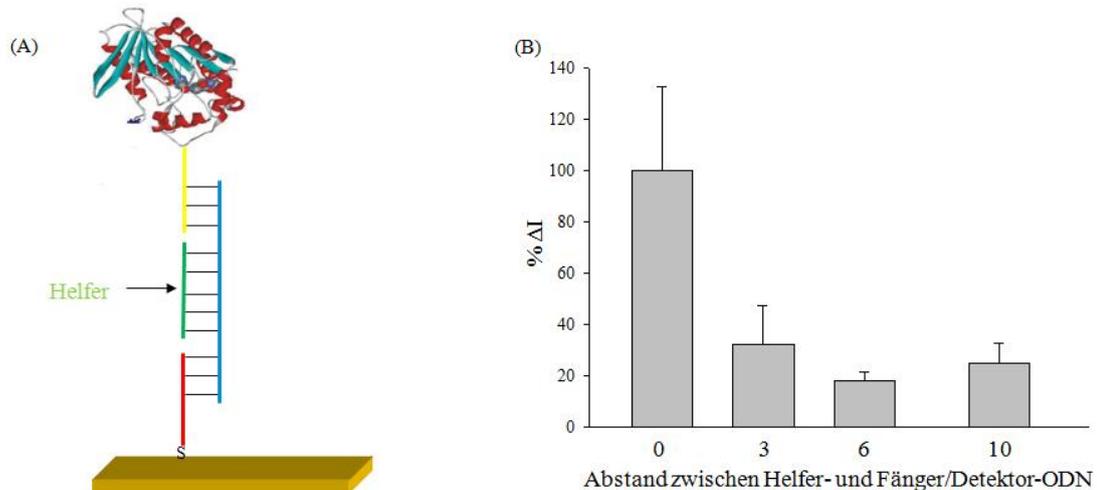


Abbildung 3-12: **Einfluss der koaxialen Basenstapelung auf das elektrochemische Signal.** (A) Aufbau der Vier-Komponenten-Sandwich-Hybridisierung aus immobilisiertem Fänger- (rot), Helfer- (grün), EST2-ODN-Konjugat (gelb) und fragmentierter 16S rRNA (blau). Verschieden lange Helfer-ODNs wurden verwendet. (B) Abhängigkeit der Signalstärke nach Hybridisierung fragmentierter 16S rRNA aus *B. subtilis* mit immobilisierten BSUBTILIS-Fängern. Helfer-ODNs, die den Bereich zwischen Fänger- und Detektor-ODN vollständig oder mit Lücken von 3, 6 bzw. 10 nt ausfüllen, wurden bei der Hybridisierung eingesetzt.

Ein Abstand von 3,6 und 10 nt zwischen Helfer- und Fänger-/Detektions-ODN resultierte in einer deutlichen Abnahme des Hybridisierungssignals verglichen mit einem Helfer, der die Lücke zwischen Fänger- und Detektor-ODN vollständig ausspannt. Neben der erwähnten Auflösung der Sekundärstruktur haben die Helfer-ODNs also eine zweite wichtige Aufgabe. Sie füllen die Lücke zwischen Fänger- und Detektor-ODN und schaffen somit eine perfekte koaxiale Basenstapelung.

3.1.7 Hybridisierung

3.1.7.1 Einfluss eines Abstandshalters zwischen Goldelektrode und Fänger auf das elektrochemische Messsignal

Ein ausreichender Abstand zwischen planarer Oberfläche und Fängermolekülen ist entscheidend für eine effiziente Hybridisierungskinetik (Shchepinov *et al.*, 1997). Fänger-ODNs mit verschiedenen langen Thymidin-Basen als Abstandshalter zwischen Thiolgruppe und spezifischer Fängersequenz wurden auf Goldelektroden immobilisiert und das elektrochemische Biochipsignal nach Hybridisierung mit komplementärer 16S rRNA verglichen. Thymidin als Abstandshalter eignet sich besonders gut, da diese Base am wenigsten Tendenz zu unspezifischer Chemisorption an Gold aufweist (Piana & Bilic 2006). Fänger ohne jegliche Thymidinbasen als Abstandshalter produzierten nach Hybridisierung mit 16S rRNA, Helfer-ODN und EST2-ODN-Konjugat lediglich ein

Signal von etwa 40% des Signals von Fängern mit 3, 6, 9 bzw. 12 Thymidinnukleotiden als Abstandshalter (Abb. 3-13). Der Einsatz eines Thymidinspacers von 9 nt zeigte das beste Biochip-signal und wurde deshalb für die Konstruktion der Fänger-ODNs verwendet.

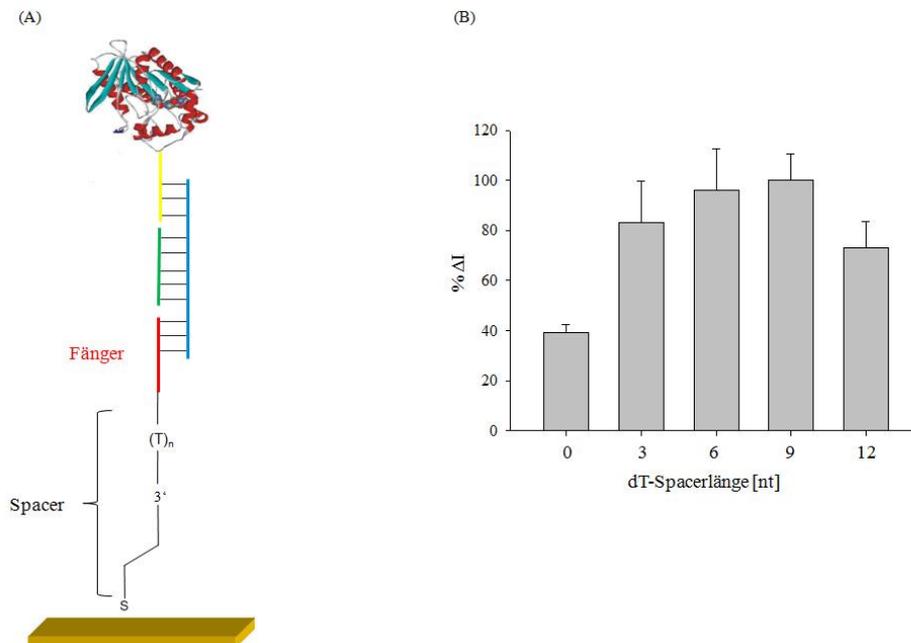


Abbildung 3-13: **Signalstärke in Abhängigkeit des Thymidinspacers am 3'-Ende der Fänger-ODNs.** (A) Aufbau der Vier-Komponenten-Sandwich-Hybridisierung aus immobilisiertem Fänger-ODN (rot), Helfer-ODN (grün), EST2-ODN-Konjugat (gelb) und fragmentierter 16S rRNA (blau). Verschieden lange Abstandshalter bestehend aus Thymidinbasen wurden verwendet. (B) Abhängigkeit der Signalstärke nach Hybridisierung fragmentierter 16S rRNA aus 10^7 KBE *E. coli* an immobilisierte ECOLI-Fänger mit Spacerlängen von 0, 3, 6, 9 und 12 Thymidinbasen.

3.1.7.2 Einfluss von Temperatur und Zeit auf die Hybridisierung

Der entscheidende Schritt des verwendeten Nachweissystems ist die effiziente Hybridisierung der fragmentierten ribosomalen RNA an die Fänger-, Helfer- und Detektionssequenzen.

Hier müssen unterschiedliche Parameter in Betracht gezogen werden. Zum einen spielt die Temperatur der Hybridisierung eine wichtige Rolle. Die gemessenen Signalstärken nach Hybridisierung von *E. coli* Gesamt-RNA bei unterschiedlichen Hybridisierungstemperaturen sind in Abbildung 3-14 dargestellt. Die Hybridisierungszeit betrug 20 Minuten in Gegenwart von 450 mM NaCl, 28 mM EDTA, 1 mg/mL BSA, 0,025% Tween 20 und 30 mM NaH_2PO_4 (pH 7,4). Bei einer Temperatur von 65 °C wurde das stärkste elektrochemische Signal erzielt. Bei 20 °C und 35 °C erhielt man nur sehr schwache Signale. Erhöhte Temperaturen sind in der Lage, die 16S rRNA-Fragmente in einer linearen Struktur zu halten, während 16S rRNA unter normalen Bedingungen eine komplexe Tertiärstruktur ausbildet (Leontis & Westhof 1998) (Abb. 3-3 B). Gleichzeitig führt eine höhere Temperatur natürlich auch

zu einer schnelleren Hybridisierungsgeschwindigkeit (Nygaard & Hall 1964). Höhere Hybridisierungstemperaturen als 70°C führen zu einem Aktivitätsverlust der EST2 (Temperaturoptimum 70°C), zum anderen behindern diese eine effiziente Hybridisierung, da sie nahe bzw. über dem Schmelzpunkt der ODN/RNA-Wechselwirkung liegen.

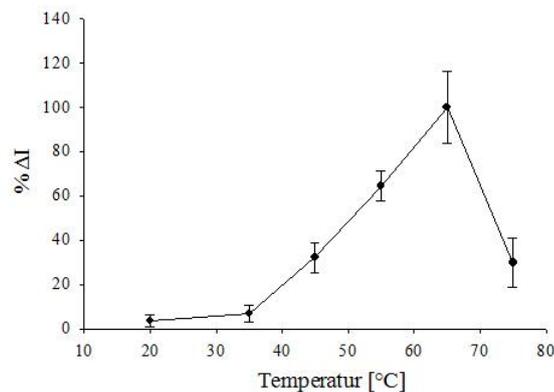


Abbildung 3-14: **Abhängigkeit des elektrochemischen Signals von der Hybridisierungstemperatur.** 2,0 µg *E. coli* Gesamt-RNA wurden für die 20-minütige Hybridisierung eingesetzt. Das elektrochemische Signal nach Hybridisierung bei einer Temperatur von 65°C wurde als 100% definiert.

Neben der Temperatur ist auch die Hybridisierungszeit von Bedeutung. Nach zehn Minuten Hybridisierung betrug das Messsignal etwa 75 % von dem Wert, der nach 20 Minuten Hybridisierung bei 65 °C und dem oben genannten Hybridisierungspuffer erreicht wurde. Eine Verlängerung der Hybridisierungszeit zeigte keinen weiteren positiven Einfluss auf die Signalstärke (Tabelle 3-2). Diese relativ kurze Hybridisierungszeit erklärt sich mit dem geringen Hybridisierungsvolumen, was Diffusionsprozesse wesentlich beschleunigt (Lenigk *et al.*, 2002).

Tabelle 3-2: **Abhängigkeit der elektrochemischen Signalstärke von unterschiedlichen Hybridisierungszeiten bei 65°C in Gegenwart von 2,0 µg *E. coli* Gesamt-RNA.** Das elektrochemische Signal für 20 min Hybridisierung wurde als 100% gesetzt.

Hybridisierungszeit [min]	Signal [%ΔI ± SD]
0	0,0 ± 1,9
10	52,9 ± 24,0
20	100,0 ± 20,3
30	100,2 ± 11,3

3.1.7.3 Signalstärke in Abhängigkeit unterschiedlicher Hybridisierungspuffer

In der Literatur kommen eine Vielzahl unterschiedlicher Hybridisierungspuffer zum Einsatz (Liu *et al.*, 2008b). Das quartäre Ammoniumsalz Tetramethylammoniumchlorid

(TMAC) ist in der Lage die Auswirkung unterschiedlicher GC-Gehalte von Sequenzen bei der Hybridisierung zu unterdrücken (Wood *et al.*, 1985). Inwieweit diese die Hybridisierungseffizienz beeinflussen, wurde mittels Hybridisierung von 1 µg fragmentierter *E. coli* Gesamt-RNA mit immobilisierten ECOLI-, LISTERIA- und HALVEI-Fängern untersucht. Eine weitere Elektrode wurde ohne Fänger behandelt, um gegebenenfalls unspezifische Bindung von EST2 an Gold zu detektieren (Tab. 3-3).

Tabelle 3-3: **Einfluss der Signalstärke in Abhängigkeit von der Verwendung unterschiedlicher Hybridisierungspuffer.** Die Steigung des Stromes der ECOLI-Elektrode nach Pumpenstopp wurde jeweils als 100% gesetzt. SSPE = 450 mM NaCl, 25 mM EDTA, 1 mg/mL BSA, 0,05% Tween 20, 30 mM NaH₂PO₄ (pH 7,4); SSC = 450 mM NaCl, 25 mM EDTA, 1 mg/mL BSA, 0,05% Tween 20, 45 mM Natriumcitrat (pH 7,0); TMAC = 450 mM Tetramethylammoniumchlorid, 25 mM EDTA, 1 mg/mL BSA, 0,05% Tween 20, 30 mM Tris-HCl (pH 7,4).

Hybridisierungspuffer	Elektrode 1: ECOLI [%ΔI]	Elektrode 2: BLANK [%ΔI]	Elektrode 3: LISTERIA [%ΔI]	Elektrode 4: HALVEI [%ΔI]
SSPE	100,0 ± 16,1	0,0 ± 2,5	0,0 ± 1,1	0,0 ± 1,7
SSC	100,0 ± 10,3	0,0 ± 8,4	0,0 ± 4,2	32,2 ± 6,6
TMAC	100,0 ± 23,9	0,0 ± 5,1	0,0 ± 6,2	0,0 ± 4,4

Bei Verwendung von SSC-Puffer produzierte neben der ECOLI-Elektrode auch die HALVEI-Elektrode ein Signal von etwa 32%. *H. alvei* und *E. coli* sind beide nah verwandte *Enterobacteriaceae*. Die anderen Negativ-Kontrollen produzierten kein Signal. Lediglich die ECOLI-Elektrode zeigte ein spezifisches elektrochemisches Signal mit SSPE- und TMAC-Hybridisierungspuffer. Hinsichtlich der Sensitivität konnte in diesem Experiment zwischen den einzelnen Hybridisierungspuffern nur ein nicht-signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Steigungen für die ECOLI-Elektrode betragen für alle Hybridisierungslösungen etwa $2,0 \pm 0,5$ nA/sek.

3.1.7.4 Einfluss unterschiedlicher Additive auf die Hybridisierungskinetik

Gewisse Zusätze in der Hybridisierungslösung, wie etwa Polyethylenglykol (PEG) und Dextransulfat haben einen beschleunigenden Einfluss auf die Hybridisierungskinetik, während anderen Additiven, wie Heringssperma-DNA, eine Oberfläche-absättigende Eigenschaft zugeschrieben wird (Ku *et al.*, 2004; Carletti *et al.*, 2006). Im Folgenden wurde der Einfluss dieser Substanzen im Hybridisierungspuffer auf das resultierende Messsignal untersucht.

Tabelle 3-4: **Einfluss unterschiedlicher Additive auf die Selektivität der Identifizierung von *E. coli* 16S rRNA mittels elektrochemischen Biochip.** Die Steigung der ECOLI-Elektrode wurde jeweils als 100% gesetzt.

Hybridisierungspuffer zusätzlich	Elektrode 1: ECOLI [%ΔI]	Elektrode 2: BLANK [%ΔI]	Elektrode 3: LISTERIA [%ΔI]	Elektrode 4: HALVEI [%ΔI]
-	100,0 ± 28,4	0,0 ± 2,5	0,0 ± 3,1	0,0 ± 1,7
10% PEG	100,0 ± 10,7	0,0 ± 2,5	0,0 ± 2,6	33,7 ± 2,0
10% Dextransulfat	100,0 ± 13,0	0,0 ± 2,1	0,0 ± 3,4	50,2 ± 10,4
50 µg/mL Heringssperma DNA	100 ± 6,7	6,7 ± 7,7	0,0 ± 2,3	15,9 ± 5,1

Tabelle 3-4 zeigt, dass alle Additive im Hybridisierungspuffer unter den gewählten Bedingungen eine geringere Spezifität der elektrochemischen Messung zur Folge hatten. Jedoch zeigte sich für Dextransulfat und PEG eine Steigerung der Hybridisierungskinetik auf 491,4% bzw. 593,9%, während das Signal der ECOLI-Elektrode im Vergleich zur Verwendung von Hybridisierungspuffer ohne Zusätze 100% betrug. Folglich ist die Selektivität der Biochip-Messung in erster Linie durch die Assoziation der komplementären Nukleinsäuren bestimmt. Möglicherweise ist die Hybridisierungszeit mit PEG oder Dextransulfat stark zu verkürzen, um eine optimale Spezifität und Sensitivität zu erreichen. Bei zugesetzter Heringssperma-DNA beobachtete man ein Signal von 99,0% der ECOLI-Elektrode. Im Überschuss zugesetzte unspezifische Nukleinsäure hat demnach keinen Einfluss auf die Sensitivität der RNA-Detektion.

3.1.7.5 Abhängigkeit des Biochip-Signals vom Abstand zwischen Detektor-ODN und EST2

Die freie Beweglichkeit eines Enzyms hat Einfluss auf seine katalytische Aktivität (Merkel *et al.*, 2005). Um eine schnelle und effektive Übertragung von messbaren Elektronen zur Elektrodenoberfläche zu gewährleisten, ist der Abstand zwischen Reporterenzym und Elektrode zusätzlich ein wichtiger Aspekt bei der Etablierung dieses Nachweissystems. Die Länge der chemischen Verknüpfung zwischen Detektor-ODN und EST2 sollte so gewählt sein, dass das Reporterenzym nicht sterisch behindert vorliegt und gleichzeitig relativ nahe an der Goldelektrode immobilisiert wird. Zur Herstellung von EST2-ODN-Konjugaten wurden bifunktionelle Reagenzien verwendet, welche als reaktive Gruppen eine NHS-Ester- bzw. eine Maleimidfunktion besitzen. Beide funktionellen Gruppen sind entweder durch Cyclohexan oder durch Polyethylenoxidgruppen verknüpft und weisen unterschiedliche Abstände voneinander auf (Tab. 3-5).

Tabelle 3-5: **Übersicht der zur EST2-ODN-Konjugat-Herstellung verwendeten bifunktionellen Reagenzien und der Einfluss der Länge des Spacerarms zwischen Detektor-ODN und EST2 auf das elektrochemische Signal.** Angegeben ist die Abhängigkeit der Signalstärke nach Hybridisierung fragmentierter 16S rRNA aus *E. coli* (2,0 µg) mit immobilisierten ECOLI-Fängern.

Bifunktionelles Reagenz	Länge des Spacerarms [Å]	$\Delta I \pm SD$ [nA/sek]
sulfo-SMCC	8,3	13,37 \pm 4,80
NHS-(PEO) ₂ -Maleimid	17,6	11,57 \pm 2,48
NHS-(PEO) ₆ -Maleimid	32,5	13,77 \pm 2,91
NHS-(PEO) ₁₂ -Maleimid	53,4	9,75 \pm 1,75

Spacerarmlängen zwischen 8,3 Å und 32,5 Å zeigten kein signifikant unterschiedliches Hybridisierungssignal bei Verwendung von *E. coli* 16S rRNA. Dagegen resultierte die Anwendung von einem EST2-ODN-Konjugat mit einer Spacerarmlänge von 53,4 Å in einem etwas geringeren Signal verglichen mit einer Spacerarmlänge von 8,3 Å. Bereits ein Abstand von 8,3 Å zum Detektor-ODN bringt der EST2 ausreichend räumliche Freiheit um optimale Aktivität zu gewährleisten. Ein Abstand von etwas mehr als 50 Å zwischen EST2 und Detektor-ODN entfernt die EST2 zu weit von der Goldelektrode, um einen schnellen und effektiven Elektronentransfer zu erreichen.

3.1.7.6 Einfluss des Waschschrilles auf unspezifische Bindung und Spezifität

Um unspezifisch gebundene RNA von Fängersonden zu lösen, kann man stringente Waschbedingungen anwenden. Grundsätzlich verwendet man Waschpuffer mit geringerer Ionenstärke und höherer Konzentration an Detergenz als im Hybridisierungspuffer. Um stringente Bedingungen herzustellen, kann man die Waschprozedur bei erhöhten Temperaturen durchführen (Anderson 1999).

Es wurde festgestellt, dass ein zusätzlicher stringenter Waschschrill bei 65°C keinen Einfluss auf die Spezifität des Detektionssystems hatte. Dies bestätigt, dass für die Spezifität in erster Linie die Assoziation der Hybridisierungspartner, nicht aber die Dissoziation verantwortlich ist. Auch Tabelle 3-4 legt diese Schlussfolgerung nahe, da die Gegenwart aller die Hybridisierungsreaktion beschleunigenden Additive zu einer niedrigeren Spezifität führten.

3.1.8 Untersuchungen zur Selektivität und Lebend-Tod Differenzierung

3.1.8.1 Differenzierung von *E. coli* innerhalb der Familie der *Enterobacteriaceae*

Entscheidende Parameter eines Biosensors sind Spezifität, Sensitivität, Zuverlässigkeit und Wiederverwendbarkeit. Eine gute Selektivität ist ein wichtiges Merkmal einer Biochip-Anwendung in der Diagnostik, v.a. im Bereich der Genotypisierung von SNPs (Kwok 2001).

Sowohl *E. coli* als auch *H. alvei* gehören der Familie der *Enterobacteriaceae* an, d.h. sie sind phylogenetisch sehr eng miteinander verwandt. Im Folgenden sollte überprüft

werden, ob auch hier eine Differenzierung mittels Biochip-Analyse möglich ist. Ebenfalls zur Familie der *Enterobacteriaceae* gehören *Citrobacter freundii* und *Shigella dysenteriae*, für deren 16S rRNA-Sequenz ein komplementäres Fänger-ODN konstruiert wurde. Diese dienen als Negativ-Kontrolle zur Untersuchung von Kreuzreaktivitäten mit *E. coli* 16S rRNA. In einem ersten Experiment wurde RNA aus 10^7 KbE *E. coli* isoliert, fragmentiert und auf einem Biochip hybridisiert, auf dem jeweils eine Goldelektrode mit Fänger-ODNs spezifisch für 16S rRNA von *E. coli*, *H. alvei*, *S. dysenteriae* und *C. freundii* belegt ist. Es stellte sich eine sehr deutliche Selektivität zugunsten der mit *E. coli*-Fänger belegten Elektrode heraus (Abb. 3-15 A). Die anderen Elektroden zeigten lediglich ein Hintergrundsignal.

Dieses Experiment demonstriert das Potential dieses Nachweissystems für die Analyse und Differenzierung auch von phylogenetisch näher in Beziehung stehenden Mikroorganismen. Darüber hinaus sollte erwähnt werden, dass die meisten Mitglieder der *Enterobacteriaceae* eine Rolle als Fäkalindikatoren in der Lebensmittelindustrie spielen oder Lebensmittelpathogene sind (LaGier *et al.*, 2005).

3.1.8.2 Multiplex-Analyse von vier Bakterien

Ein entscheidender Vorteil von Biochip-Nachweissystemen in der diagnostischen Mikrobiologie ist die Möglichkeit der parallelen und schnellen Identifikation von Mikroorganismen (Call 2005).

RNA isoliert aus 5×10^3 KbE *E. coli*, 5×10^5 KbE *H. alvei*, 1×10^7 KbE *L. innocua* und 5×10^6 KbE *B. subtilis* wurde verwendet, um in einem ersten Experiment die genannten Mikroorganismen getrennt voneinander zu detektieren. Dazu bereitete man einen Biochip vor, bei dem je eine Goldelektrode mit Fängern spezifisch für je einen Mikroorganismus belegt war. Um die Möglichkeit der schnellen, parallelen Identifikation zu demonstrieren, erfolgte die RNA-Isolierung aus einer Mischung der genannten Bakterien (Zellzahlen wie oben genannt). Im Fall der Verwendung der isolierten RNA aus nur einem Bakterium zeigte nur die relevante Elektrode ein spezifisches Signal. Die anderen Elektroden wiesen kein Signal bzw. Signale kleiner 0,05 nA/sek auf. Bei Verwendung der RNA-Mischung aus allen Bakterien sprachen alle Elektroden positiv an (Abb. 3-15 B). Darüber hinaus entspricht das Messsignal in der Mischung relativ gut dem der Reinkultur. Dies deutet darauf hin, dass die Hybridisierung durch die anderen anwesenden RNAs nicht beeinflusst wird.

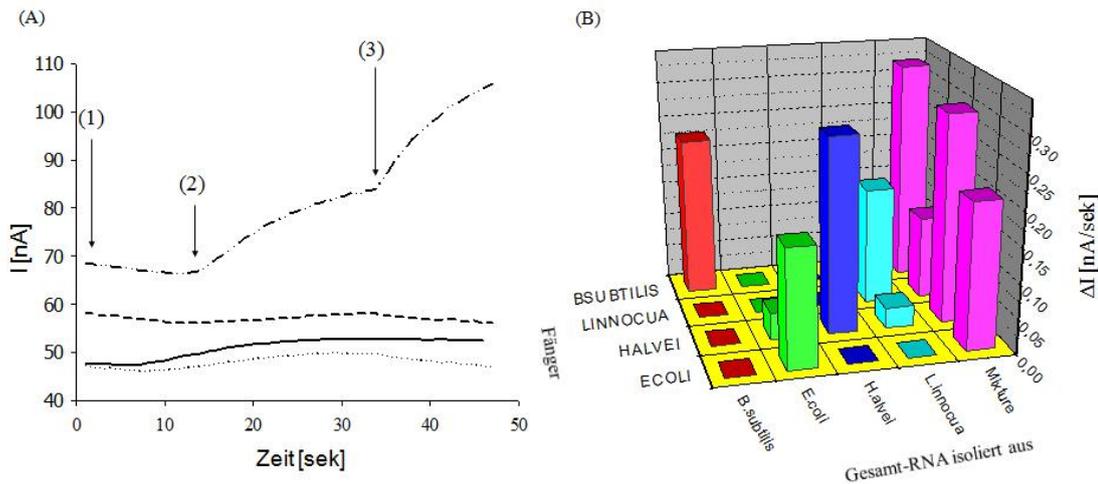


Abbildung 3-15: **Selektivität der bakteriellen Biochip-Analyse.** (A) Biochip-Analyse von aus 5×10^6 KbE *E. coli* isolierter 16S rRNA zur Differenzierung von anderen Mitgliedern aus der Familie der *Enterobacteriaceae*. Die einzelnen Elektroden wurden mit Fängern spezifisch für *E. coli* (---), *S. dysenteriae* (-), *C. freundii* (—) und *H. alvei* (···) immobilisiert. Auftragung der Stromverläufe einer Biochip-Messung gegen die Zeit. In den ersten zehn Sekunden floss durch die Hybridisierungskammer lediglich Puffer (1). Darauf folgte der Substratzufluss (2). Nach Erreichen der Plateauphase wurde der Fluss gestoppt und es folgte ein in den ersten Sekunden nahezu linearer Anstieg des Stroms, der proportional zur durch Hybridisierung gebundenen EST2-Menge war (3). (B) Paralleler Nachweis von vier Mikroorganismen mittels Biochip-Analyse. Die Gesamt-RNA-Isolation erfolgte aus 5×10^3 KbE *E. coli*, 5×10^5 KbE *H. alvei*, 1×10^7 KbE *L. innocua* und 5×10^6 KbE *B. subtilis*. Für die Gram-negativen Zellen wurde die Zelllyse enzymatisch, für die Gram-positiven und die Mischkultur mechanisch durchgeführt. Es sind die Mittelwerte aus drei Messungen dargestellt.

3.1.8.3 Universeller Bakteriennachweis durch 23S rRNA/DNA-Hybridisierung

Neben einem spezifischen Bakteriennachweis ist unter Umständen auch die generelle Detektion bakterieller Kontaminationen in Probenmaterialien wünschenswert. Deshalb wurde in dieser Arbeit auf Basis der 23S rRNA eine universelle Detektionsregion identifiziert (Abschnitt 3.1.3) und getestet.

Dazu wurde Gesamt-RNA aus *E. coli* isoliert und auf einem Chip aufgebracht, welcher spezifische Fänger für *E. coli* und *B. subtilis* bzw. die universelle Sonde aufwies. Zu beachten ist, dass die Lücke zwischen ECOLI-Fänger und Detektor-ODN nur von einem Helfer-ODN ausgefüllt wird, während zwischen universellem Fänger-ODN und 23S rRNA Detektor-ODN zwei Helfer-ODNs platziert sind (Abb. 3-16 A). Sowohl die mit *E. coli*-spezifischen Fängern als auch die mit der universellen Sonde belegten Elektroden generierten signifikante Signale. Kein Signal war für die Elektrode mit Fängern spezifisch für *B. subtilis* detektierbar (Abb. 3-16 B). Jedoch lieferte die *E. coli*-spezifische Elektrode, die auf 16S rRNA-Nachweis beruhte, ein etwa fünffach höheres Signal als die Elektrode mit 23S rRNA komplementären universellen Fängern. Grund dafür kann eine ineffizientere Fragmentierung der im Vergleich zur 16S rRNA längeren 23S rRNA sein. Weiterhin wurde das Reporterenzym im Falle des 23S rRNA-

Nachweises durch die Anwesenheit zweier Helfer-ODNs weiter von der Elektrode entfernt platziert, was das elektrochemische Signal negativ beeinflusst (Abschnitt 3.1.7.5).

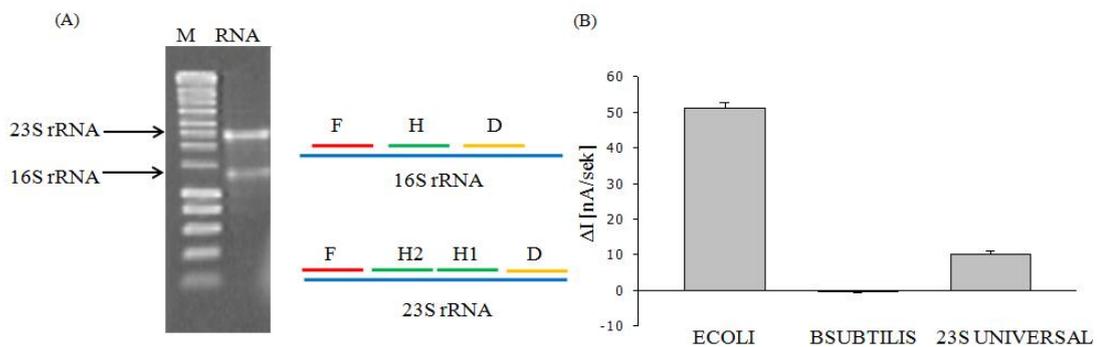


Abbildung 3-16: Verwendung eines universellen Fänger-ODNs zum bakteriellen Nachweis mittels 23S rRNA/DNA-Hybridisierung. (A) 1,5% Agarose-Gelelektrophorese von aus 10^8 KbE *E. coli* isolierter Gesamt-RNA. Die Banden der 23S und 16S rRNA sind markiert. Zur Orientierung wurde ein DNA-Größenstandard mitgeführt (M). Ebenfalls ist die Anordnung der verschiedenen ODNs beim 16S und 23S rRNA-Nachweis dargestellt. Fragmentierte ribosomale RNA ist blau, Fänger (F)-, Helfer (H)- bzw. Detektor (D)-ODN rot, grün bzw. gelb dargestellt. (B) Detektion von *E. coli* RNA mittels elektrochemischer Messung der RNA/DNA-Hybridisierung. Auf den Goldelektroden des Biochips wurden Fänger-ODNs spezifisch für *E. coli* (ECOLI), *B. subtilis* (BSUBTILIS) und eine universelle Fängersonde (23S UNIVERSAL) immobilisiert. Als Reporterenzym-ODN-Konjugate wurden EST2-UD1082 und EST2-UD2866_23S rRNA verwendet.

3.1.8.4 Einfluss eines Überschusses an unspezifischer RNA auf das Detektionssignal

In realen Lebensmittelproben besteht die Möglichkeit der Anwesenheit von eukaryontischer ribosomaler RNA. Deshalb sollte untersucht werden, ob ein Überschuss an ribosomaler RNA aus *S. cerevisiae* Einfluss auf die Hybridisierung nimmt.

Dazu wurde RNA aus *S. cerevisiae* in verschiedenen Verhältnissen mit *E. coli* Gesamt-RNA gemischt (Tab. 3-6). Als Kontrollen wurden zum einen ausschließlich isolierte *E. coli* Gesamt-RNA, zum anderen nur *S. cerevisiae* Gesamt-RNA für die Hybridisierung mit Fängern spezifisch für *E. coli* eingesetzt. Dabei erhielt man im ersten Fall ein Signal von etwa 0,6 nA/sek, im zweiten Fall kein Signal. Tabelle 3-6 zeigt zudem, dass sich das Hybridisierungssignal bis zu einem 100-fachen Überschuss an *S. cerevisiae* RNA nicht signifikant ändert. Somit besteht keine Kreuzreaktivität zwischen Hefe-RNA und ECOLI-Fänger bzw. EST2-ODN-Konjugat. Desweiteren wurde trotz 100-fachen Überschusses ein Signal mit nahezu unveränderter Intensität beobachtet, was eine Verlangsamung der Hybridisierungskinetik in dieser komplexen Probe ausschließt.

Tabelle 3-6: Signalstärke in Abhängigkeit des Verhältnisses von *E. coli* und *S. cerevisiae* RNA.

Verhältnis <i>E. coli</i> / <i>S. cerevisiae</i> RNA	$\Delta I \pm SD$ [nA/sek]
1:0	0,59 \pm 0,20
1:1	0,54 \pm 0,35
1:10	0,52 \pm 0,24
1:100	0,50 \pm 0,16
0:1	-0,31 \pm 0,16

3.1.8.5 Differenzierung von *Bacillus* spp.

Die Lebensmitteldiagnostik konzentriert sich primär auf die Detektion von *Enterobacteriaceae*, *Listeria monocytogens*, *Bacillus* spp. und *Campylobacter* spp. (de Boer & Beumer 1999; Lazcka *et al.*, 2007). Daneben spielt die Identifizierung von Noroviren in letzter Zeit eine immer wichtigere Rolle (Bosch *et al.*, 2008).

Die Differenzierung von *Bacillus* spp. ist nicht nur in der Lebensmitteldiagnostik (*B. cereus* und *B. weihenstephanensis*) wichtig, sondern gewinnt auch in der frühzeitigen Erkennung von biologischen Kampfstoffen (*Bacillus anthracis* Sporen) zunehmend an Bedeutung (Edwards *et al.*, 2006). Die variable Region V6 der 16S rRNA eignet sich sehr gut zur Differenzierung von *Bacillus* spp. (Chakravorty *et al.*, 2007). Das sollte am Beispiel der beiden nah verwandten Mikroorganismen *B. subtilis* und *B. atrophaeus* gezeigt werden, die sich in der Fängerregion jeweils nur durch zwei Basenaustausche unterscheiden (siehe Abb. 3-3 A). Durch Hybridisierung von fragmentierter Gesamt-RNA aus *B. subtilis* bzw. *B. atrophaeus* auf einem Biochip mit immobilisierten BSUBTILIS- bzw. BATROPHAEUS-Fängern konnte die hohe Spezifität des elektrochemischen Nachweissystems bestätigt werden. Das resultierende Signal für 16S rRNA isoliert aus 5×10^7 KbE *B. atrophaeus* betrug mit komplementären Fänger $2,05 \pm 0,11$ nA/sek, während die BSUBTILIS-Elektrode lediglich ein Signal von $0,64 \pm 0,16$ nA/sek produzierte. Eine Hybridisierung mit RNA isoliert aus 5×10^7 KbE *B. subtilis* lieferte ähnliche Ergebnisse (BATROPHAEUS-Elektroden: $0,42 \pm 0,44$ nA/sek; BSUBTILIS-Elektroden: $2,57 \pm 0,81$ nA/sek). In Anwesenheit beider Fänger auf einem Chip ist es also möglich diese nah verwandten Mikroorganismen zu unterscheiden, was mit traditionell mikrobiologischen bzw. biochemischen Methoden nur schwer möglich ist (Vilas-Boas *et al.*, 2007).

3.1.8.6 Differenzierung von *Listeria* spp.

In dieser Arbeit wurde weiterhin die Selektivität der Biochip-Analyse für die Identifikation von *Listeria monocytogenes* getestet. Neben der V6-Region der 16S rRNA benutzte man hierfür einen weiteren Bereich der 16S rRNA, in dem sich *Listeria* spp. voneinander unterscheiden (Abb. 3-17 A). Auf einem Biochip mit immobilisiertem LISTERIA-, LINNOCUA- und LMONO-Fänger bzw. ECOLI-Fänger als Negativkontrolle wurde fragmentierte Gesamt-RNA aus *L. monocytogenes* hybridisiert und elektrochemisch vermessen. Die ECOLI-Elektrode produzierte kein Signal, während die Elektrode mit Fänger spezifisch für *L. innocua* lediglich ein Hintergrundsignal lieferte. Dagegen zeigten die Elektroden mit Fängern spezifisch für *L. monocytogenes* und *Listeria* spp. ein deutliches elektrochemisches Signal (Abb. 3-17 B). Dies zeigt das Potential dieser Methode zur Entwicklung eines elektrochemischen Biochips für die Detektion von *L. monocytogenes* ohne PCR-Amplifikationsschritt. Für die Detektion von *L. monocytogenes* ohne Optimierungsversuche zur RNA-Isolation wurde ein Detektionslimit von etwa 1×10^7 KbE erreicht, was – verglichen mit ähnlichen Methoden - bereits ein gutes Detektionslimit darstellt (Gasanov *et al.*, 2005).

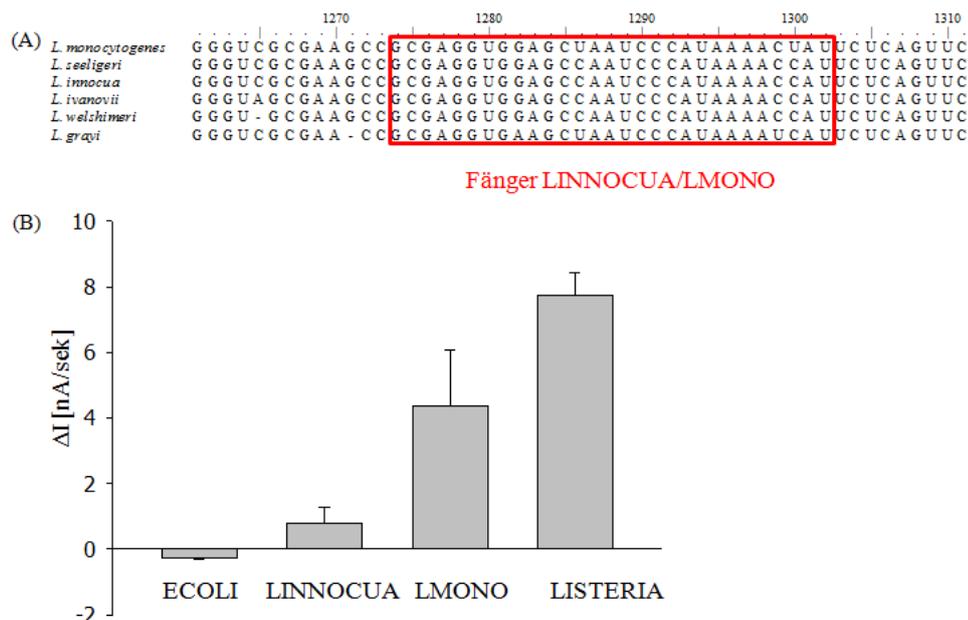


Abbildung 3-17: **Detektion von *Listeria monocytogenes* mittels elektrochemischer Vier-Komponenten-Sandwich-Hybridisierung.** (A) Sequenzvergleich der zur Diskriminierung von *Listeria* spp. verwendeten 16S rRNA-Region (roter Kasten). (B) Hybridisierung mit Gesamt-RNA aus 10^7 KbE *L. monocytogenes*. Als Reporterenzym-ODN-Konjugate wurden EST2-UD1082 und EST2-UD_LISTERIA eingesetzt.

3.1.8.7 Differenzierung innerhalb der Spezies *E. coli*

Neben den apathogenen *E. coli*-Stämmen, die für die Hygieneüberwachung in Lebensmittelverarbeitenden Betrieben verwendet werden, existieren auch sogenannte

pathogene *E. coli*-Stämme, z. B. enterohämorrhagische *Escherichia coli* O157:H7 (EHEC). EHEC ATCC 43895 weist in der Fängerregion fünf Basenunterschiede verglichen mit dem ECOLI-Fänger auf (Abb. 3-18 A). Lediglich Elektroden mit vollständig komplementären Fängersequenzen zeigten nach Hybridisierung mit der entsprechenden RNA ein Signal (Abb. 3-18 B).

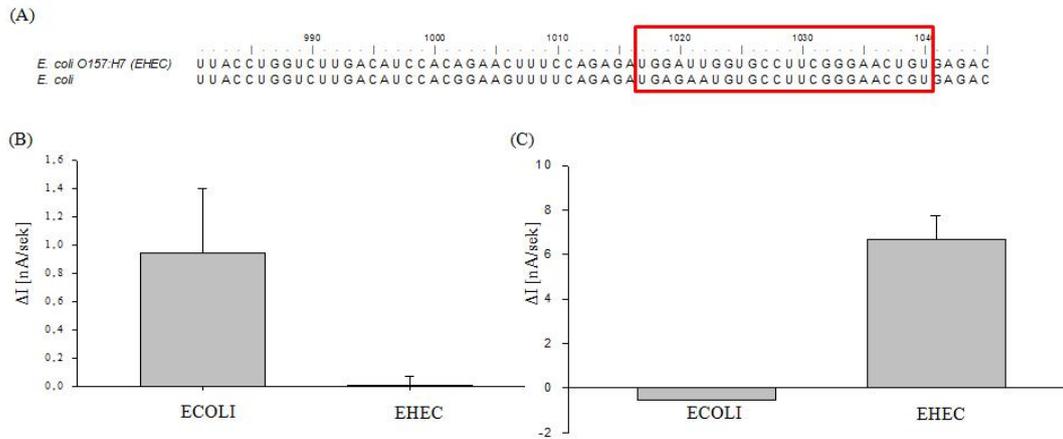


Abbildung 3-18: **Differenzierung zwischen einem apathogenen *E. coli*-Stamm und dem pathogenen *E. coli*-Stamm ATCC 43895.** (A) Vergleich der relevanten 16S rRNA-Sequenzen von *E. coli* und *E. coli* O157:H7. Der Fängerbereich ist rot markiert. (B) Elektrochemisches Biochip-Signal nach Hybridisierung mit Gesamt-RNA isoliert aus 10^5 KbE *E. coli*. (C) Analoges Experiment zu (B), jedoch wurde hier Gesamt-RNA aus 10^7 KbE *E. coli* O157:H7 eingesetzt.

Weiterhin wurde der Einfluss eines Überschusses von *E. coli* 16S rRNA in Gegenwart von EHEC 16S rRNA auf das elektrochemische Signal der mit EHEC-Fängern besetzten Elektroden ermittelt. Tabelle 3-7 zeigt, dass das Chipsignal selbst bei einem 100-fachen Überschuss an *E. coli* 16S rRNA nahezu identisch zu dem Signal ist, bei dem nur EHEC 16S rRNA verwendet wurde.

Tabelle 3-7: **Einfluss eines Überschusses an *E. coli* 16S rRNA auf das Hybridisierungssignal der EHEC-Elektrode in Gegenwart einer Mischung aus *E. coli* und EHEC Gesamt-RNA.**

Verhältnis EHEC/ <i>E. coli</i> RNA	$\Delta I \pm SD$ [nA/sek]
1:0	$0,55 \pm 0,38$
1:1	$0,62 \pm 0,14$
1:10	$1,38 \pm 0,19$
1:100	$0,60 \pm 0,11$
0:1	$-0,02 \pm 0,15$

Da in der gewählten Detektionsregion (V6) sich selbst einige nah verwandte pathogene *E. coli*-Stämme (z.B. *E. coli* O157:H7 ATCC 43895) von der konstruierten *E. coli*-Sonde unterscheiden, sollte untersucht werden, ob auch andere apathogene *E. coli*-

Stämme Unterschiede in der Fängerregion besitzen. Dazu wurde aus 13 verschiedenen *E. coli*-Stämmen Gesamt-RNA isoliert und für alle Hybridisierungsversuche jeweils die gleiche RNA-Menge eingesetzt. Die Vermessung am Biochip erfolgte mit immobilisierten ECOLI-Fängern (Abb. 3-19).

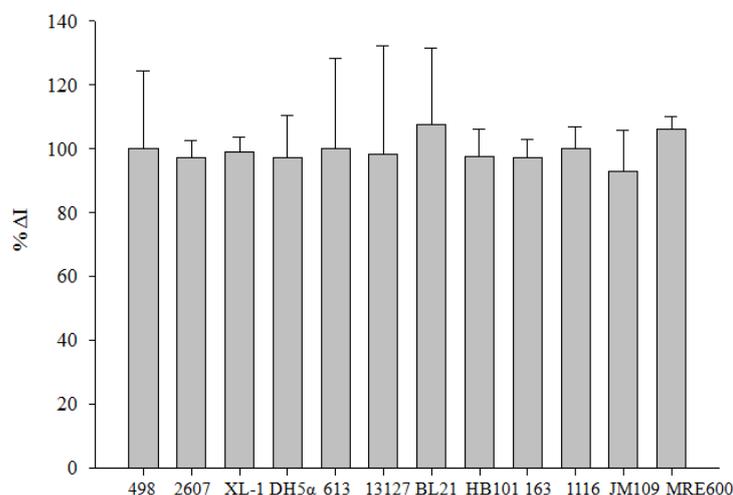


Abbildung 3-19: **Elektrochemische Detektion von verschiedenen *E. coli*-Stämmen.** Für jede Messung wurden 1,5 µg Gesamt-RNA aus den angegebenen Stämmen isoliert und für die Hybridisierung auf dem Biochip verwendet. Das Signal der ECOLI-Elektrode für die RNA aus *E. coli* DSM 498 wurde als 100% definiert. Dargestellt sind die *E. coli*-Stämme DSM 498, DSM 2607, XL-1 blue, DH5α, DSM 613, DSM 13127, BL21 (DE3), HB101, 163 (Lebensmittelisolat), DSM 1116, JM109 und MRE600.

Alle *E. coli*-Stämme produzierten nach Hybridisierung ihrer RNA auf dem Biochip nahezu identische elektrochemische Signale. Dies lässt darauf schließen, dass die verwendete *E. coli*-Fängersequenz komplementär zu den eingesetzten 16S rRNA-Sequenzen ist.

Insgesamt zeigte das vorgestellte Biochipsystem eine sehr gute Spezifität. Gram-positive und Gram-negative Bakterien konnten deutlich und ohne Hintergrund unterschieden werden. Bakterien innerhalb einer Familie produzierten mit ihrem komplementären Fänger spezifische Signale. Selbst sehr nah verwandte Bakterien (z. B. *Bacillus* spp. oder *Listeria* spp.) konnten mittels Biochip-Analyse in kurzer Zeit relativ gut differenziert werden.

3.1.8.8 Einfluss der Wachstumsphase von *E. coli* auf das Biochip-Signal

Zur Etablierung der Nachweismethode wurde grundsätzlich mit Gesamt-RNA aus exponentiell wachsenden Bakterien gearbeitet, da in dieser Wachstumsphase am meisten Ribosomen vorhanden sind. Um den Einfluss der Wachstumsphase auf das Hybridisierungssignal zu untersuchen, kamen sowohl LB-Medium als auch gepuffertes Peptonwasser (BPW) als typische Vertreter von Voll- bzw. Minimalmedium zum Einsatz. Nach Animpfen von LB-Medium und Kultivierung für 18 h bei 37°C und 170 rpm wurde eine frische Kultur angeimpft, indem sie 1:100 mit der Übernachtskultur

verdünnt wurde und darauf für 24 h bei 37°C und 170 rpm inkubiert wurde. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, die Zellzahl mikrobiologisch und der OD₆₀₀ spektralphotometrisch bestimmt, RNA isoliert und das für *E. coli* spezifische elektrochemische Biochip-Signal ermittelt (Abb. 3-20).

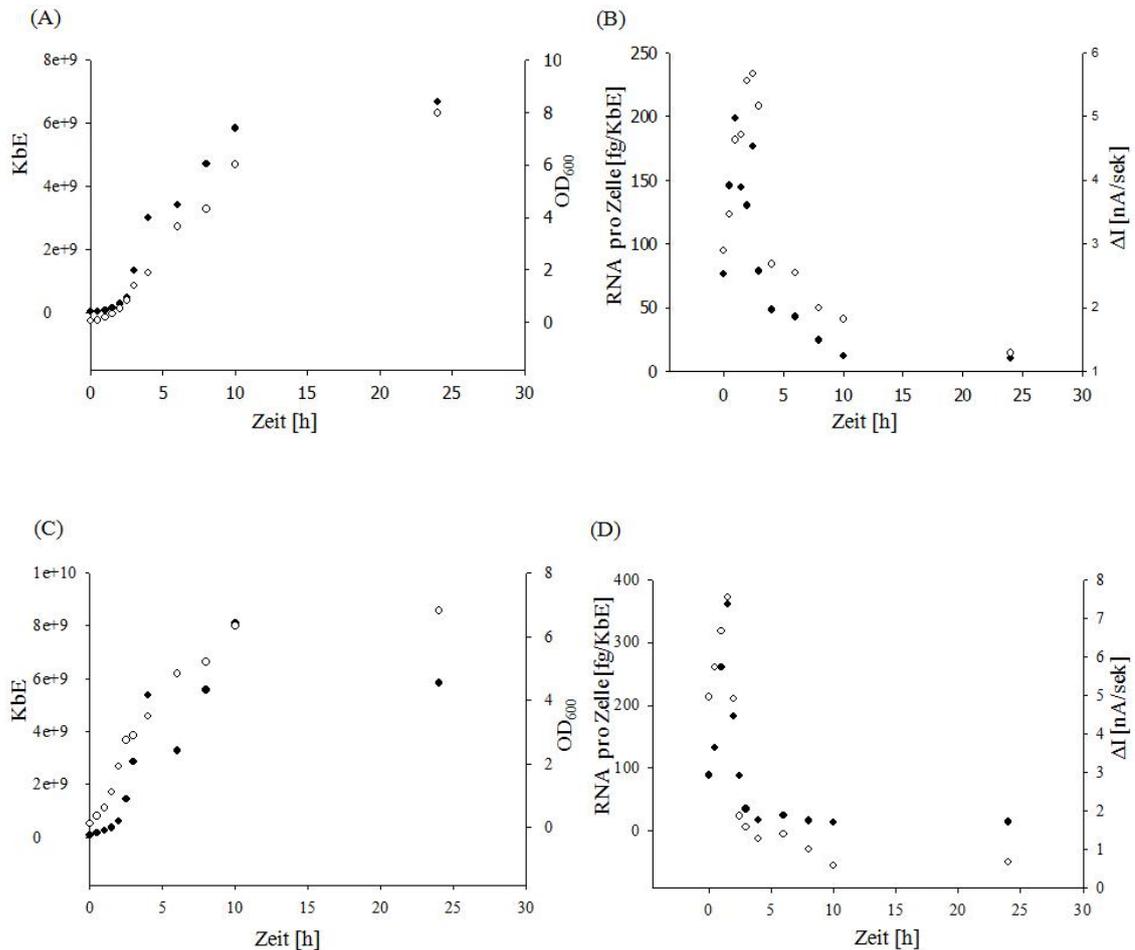


Abbildung 3-20: **Abhängigkeit des Messsignals von der Wachstumsphase der Mikroorganismen in LB- Medium (A, B) und gepuffertem Peptonwasser (C, D).** (A, C) Zeitabhängige Auftragung der KBE (●) und der OD₆₀₀ (○) des *E. coli*-Wachstums in LB-Medium bzw. gepuffertem Peptonwasser. (B, D) Zeitabhängige Auftragung des RNA-Gehalts pro Zelle (●) und des elektrochemischen Messsignals (○). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus jeweils drei Messungen.

In BPW kam es schneller zu einem Anstieg des OD₆₀₀-Wertes und der Zellzahl als in LB-Medium. In beiden Medien wurde nach etwa 10 h Kultivierung die stationäre Phase erreicht, d.h. weder Zellzahl noch OD₆₀₀ nahmen danach noch signifikant zu (Abb. 3-20 A und C). Es wurde deutlich, dass in beiden Medien das Biochip-Signal mit der Menge an RNA pro Zelle korrelierte (Abb. 3-20 B und D). In LB-Medium erreichte das Biochip-Signal nach etwa 2,5 h Wachstum die maximale Intensität. Auch die RNA-Menge zeigte nahezu den Maximalwert von 200 fg pro Zelle. Nach 4 h Wachstum in LB-Medium kam es zu einer deutlichen Verringerung der RNA-Menge pro Zelle und auch zu einem signifikanten Absinken des Biochip-Signals obwohl die Zellzahl weiter

exponentiell zunahm. In dieser Phase kam es zu einem Absinken der Ribosomenzahl pro Zelle aufgrund verringerter Translationsaktivität und dem Anstieg anderer regulatorischer RNA-Transkripte (Windbichler *et al.*, 2008). In BPW kam es zu einem sehr schnellen Anstieg der Zellzahl, gefolgt vom RNA-Gehalt pro Zelle und dem Biochip-Signal. Bereits nach 1,5 h Wachstum war eine RNA-Menge von etwa 300 fg/Zelle und ein Biochip-Signal von etwa 7,5 nA/sek erreicht. Nach 2,5 h kam es bereits zu einem dramatischen Absinken der RNA-Menge pro Zelle und somit auch des Biochip-Signals, obwohl auch hier weiterhin eine exponentielle Zunahme der Zellzahl zu beobachten war. Die in diesem Minimalmedium vorhandenen Aminosäuren führen zu einem schnellen Anstieg der Translationsrate. Dies hat aber auch einen schnellen Verbrauch dieser Aminosäuren zur Folge. Es kommt in der A-Stelle des Ribosoms zu Wechselwirkungen zwischen dem Codon einer mRNA und dem Anticodon einer unbeladenen tRNA. Daraufhin kommt es zu einer Signalkaskade, welche Einfluss auf die rRNA-Biosynthese nimmt (Dennis *et al.*, 2004).

Dieses Experiment zeigt, dass der RNA-Gehalt pro Zelle einen Einfluss auf das elektrochemische Biochip-Signal hat und deshalb die Voranreicherungszeit Medium-abhängig optimiert werden muss.

Weiterhin wurde untersucht, inwiefern eine Lagerung bei 4 °C einer exponentiell wachsenden *E. coli*- bzw. *L. innocua*-Kultur die Signalstärke bei der Biochip-Messung beeinflusst. Dies ist bedeutend, da viele Lebensmittel bei dieser Temperatur gelagert werden. Sowohl das Hybridisierungssignal für *E. coli* als auch für *L. innocua* blieben bei einer Lagerungstemperatur von 4°C über 96 Stunden relativ konstant (Abb. 3-21).

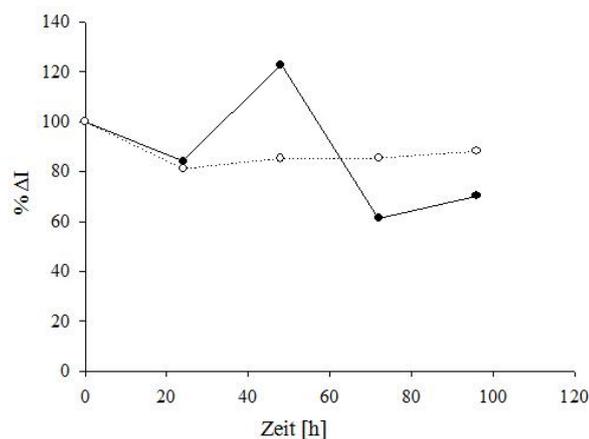


Abbildung 3-21: **Signalstärke nach Hybridisierung in Abhängigkeit der Lagerung einer exponentiellen *E. coli*- (···) bzw. *L. innocua*- (—) Kultur bei 4 °C.** RNA wurde aus 5×10^8 KbE *E. coli* 163 bzw. 1×10^9 KbE *L. innocua* isoliert. Die gezeigten Messwerte sind Mittelwerte aus drei Messungen. Der Messwert für die nicht gelagerte Kultur (0 h) ist auf 100 % normiert.

Somit bleibt der Gehalt an Ribosomen in exponentiell wachsenden Kulturen bei dieser Lagerung konserviert, wobei *L. innocua* bei 4 °C geringes Wachstum zeigen sollte.

Jedoch bleibt auch für *L. innocua* die ausplattierte Zellzahl über die 96 Stunden Lagerung konstant, was darauf hindeutet, dass bereits alle Nährstoffe im Medium aufgebraucht sein könnten. Eine Lagerung bei 4 °C wirkte sich also nicht nachteilig auf die Biochip-Analyse aus. Ein analoges Experiment für *E. coli* wurde mit einer Lagertemperatur von -20°C durchgeführt und zeigte ähnliche Ergebnisse wie hier dargestellt (nicht gezeigt).

3.1.8.9 Untersuchungen zur Lebend-Tod Differenzierung

Ein Vorteil der Verwendung von 16S rRNA als Zielmolekül gegenüber DNA ist, dass die labilere RNA nach Tod des Mikroorganismus schneller degradiert wird als die stabile DNA (Keer & Birch 2003). Um dies zu bestätigen, wurde eine exponentielle *E. coli*-Kultur durch UV- bzw. Hitze-Behandlung inaktiviert. Das erfolgreiche Abtöten der Bakterien wurde durch Ausplattieren der inaktivierten Kulturen und anschließende Inkubation bei 37°C für 48 h bestätigt. Aus den behandelten *E. coli*-Zellen wurde Gesamt-RNA isoliert und mittels Biochip-Messung analysiert. Die 15-minütige UV-Behandlung führte zu einem Restsignal von etwa 30%, wohingegen eine 90-minütige Hitzebehandlung die RNA komplett degradierte und kein Biochip-Signal detektierbar war (Abb. 3-22). Im Gegensatz zur Amplifikation von 16S rRNA durch RT-PCR, wo noch nach längerer Hitzebehandlung ein Amplifikationsprodukt detektiert werden konnte (Sheridan *et al.*, 1998), kommt hier zum Tragen, dass die Hitzebehandlung bereits eine Degradation der 16S rRNA bewirkt, welche durch die anschließende Fragmentierung der 16S rRNA, jedoch vollständig in nicht-detektierbare RNA-Bruchstücke zerlegt wird.

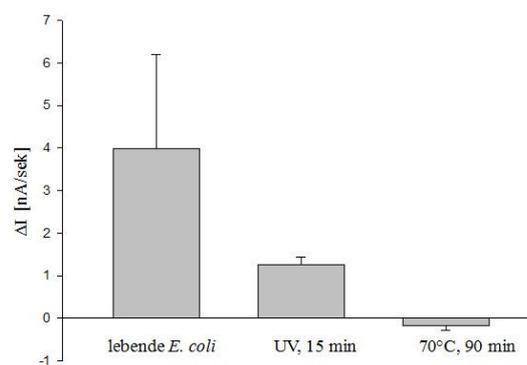


Abbildung 3-22: **Elektrochemische Detektion von durch UV- bzw. Hitzebehandlung abgetöteten *E. coli*.** Nach Isolation der Gesamt-RNA aus 1×10^7 KBE *E. coli* wurde diese fragmentiert und mit immobilisiertem ECOLI-Fänger in Gegenwart von Helfer-ODN und EST2-ODN-Reporterkonjugat hybridisiert.

In einer Lebensmittelmatrix kommt es zu einem noch schnellerem Abbau mikrobieller RNA aufgrund der großen Zahl an RNasen (Churruca *et al.*, 2007).

3.1.9 Sensitivität der Biochip-Analyse von *E. coli*

Neben der Selektivität ist die Sensitivität der entscheidende Parameter für den Einsatz von Biochips in der diagnostischen Mikrobiologie. Durch eine PCR-Amplifikation des Zielmoleküls vor der Analyse ist eine Erhöhung der Sensitivität möglich, jedoch verliert man so die Möglichkeit zur quantitativen Analyse und verschiebt möglicherweise die Verhältnisse der Mengen an vorhandenen Mikroorganismen, je nach Amplifikationsausbeute der einzelnen DNA-Moleküle (Hugenholtz *et al.*, 1998). Deshalb sollte hier auf eine PCR-Amplifikation verzichtet werden und direkt der Nachweis der 16S rRNA erfolgen. Durch die Anwesenheit von bis zu 70.000 rRNA-Molekülen pro wachsender Zelle (Curtiss *et al.*, 1996) enthält diese Art von Nachweissystem ein intrinsisches Amplifikationspotential.

Bisher wurden in der Literatur in der Regel nur RNA-Verdünnungen mittels verschiedener Nachweismethoden vermessen, um Standardkurven zu erstellen (Elsholz *et al.*, 2006). Praktisch ist aber die Messung von isolierter RNA aus unterschiedlichen Zellzahlen wesentlich relevanter.

In dieser Arbeit erfolgte die Erstellung einer Standardkurve durch dezimale Verdünnung einer exponentiellen *E. coli*-Kultur und anschließender RNA-Isolation aus den unterschiedlichen Zellzahlen. Diese RNA zog man nun für die Biochip-Experimente heran und erstellte eine Standardkurve durch Auftragung von Zellzahl gegen Signalstärke (Abb. 3-23). Als Detektionslimit wurden etwa 500 KbE *E. coli* bestimmt. Dies ist für Nachweismethoden ohne Amplifikation ein sehr gutes Detektionslimit (Pedrero *et al.*, 2009).

Analog dazu wurden auch anhand von unterschiedlichen Zellzahlen an *H. alvei*, *L. innocua* und *B. subtilis* die Nachweisgrenzen bestimmt. Für *H. alvei* beträgt die Nachweisgrenze etwa 1.000 KbE, was relativ gut mit dem Detektionslimit für *E. coli* übereinstimmt.

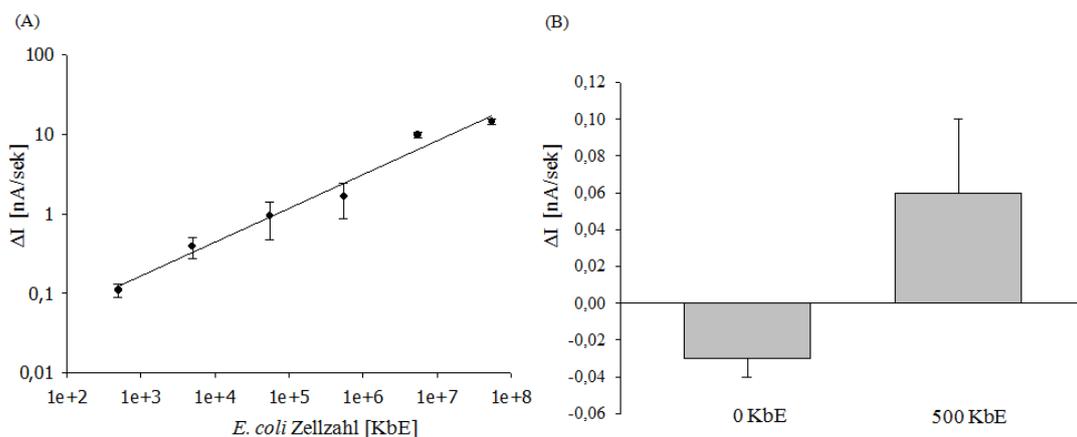


Abbildung 3-23: **Sensitivität der Biochip-Analyse von unterschiedlichen *E. coli*-Zellzahlen.** (A) Auftragung der *E. coli*-Zellzahlen gegen die Signalstärke. Die Linearität beträgt $R^2 = 0,98$. (B) Bestimmung des Detektionslimits. Der Hintergrund ist definiert als der Mittelwert der Blindwerte, ermittelt mit Hybridisierungspuffer, plus dreimal dessen Standardabweichung

Da diese beiden Mikroorganismen eng verwandt sind, sollte man davon ausgehen, dass die Zellyse ähnlich effizient vonstatten geht. Für beide wurden enzymatische Lyseeffizienzen von 100% ermittelt. Dagegen betrug die enzymatische Lyseeffizienz für *L. innocua* lediglich etwa 30%. Die ermittelte Nachweisgrenze betrug für *L. innocua* nur etwa 5×10^6 KbE und für *B. subtilis* etwa 1×10^6 KbE.

Zur Bestätigung der ermittelten Sensitivität wurde in einem weiteren Experiment Gesamt-RNA aus 10^8 KbE *E. coli* isoliert und die Konzentration spektralphotometrisch bestimmt. Verdünnungen der RNA wurden für die Biochip-Hybridisierung eingesetzt und mit der Signalstärke in Korrelation gesetzt. Insgesamt konnten bis zu 20 pg Gesamt-RNA nachgewiesen werden, was unter der Annahme, dass eine KbE 5×10^{-14} g Gesamt-RNA enthält, theoretisch etwa 400 KbE *E. coli* entspricht (Curtiss *et al.*, 1996). Da hier die Schritte der RNA-Isolation entfallen und somit Verluste vermieden wurden, erreichte man ein niedrigeres Detektionslimit als in Abbildung 3-23 (Tab. 3-8).

Bei der quantitativen Reversen Transkriptase (qRT)–PCR erstellt man die Standardkurve durch Verdünnen des durch *in vitro*-Transkription erhaltenen relevanten Nachweisbereiches der Zielnukleinsäure (Glynn 2006). Deshalb wurde auch in dieser Arbeit der Bereich der 16S rRNA, der sowohl Fänger- als auch Detektionsregion enthält, mit konservativen Primern amplifiziert und anschließend mittels T7 RNA-Polymerase *in vitro* transkribiert. Nach DNA-Verdau und Reinigung der RNA über eine Silika-Gel-Membran wurde die Konzentration mittels Fluoreszenzmessung quantifiziert. Verschiedene Verdünnungen davon setzte man nun für die Hybridisierung auf dem Biochip ein und erstellte analog zu den beiden vorherigen Abschnitten eine Standardkurve. Da hier aufgrund der Länge von etwa 300 Nukleotiden keine Fragmentierung nötig war, entfällt ein weiterer Vorbehandlungsschritt, was vor allem zu kleineren Standardabweichungen der Messwerte führte. Das Detektionslimit betrug lediglich 4 pg, was ca. 80 KbE *E. coli* entspricht (Tab. 3-8).

Tabelle 3-8: Vergleich der ermittelten Nachweisgrenzen für die Bestimmung von *E. coli* unter Verwendung unterschiedlich hergestellter RNA-Proben.

Probenvorbereitung	Detektionslimit
Verdünnung von Bakterienkultur und separate RNA-Isolation	500 KbE
RNA-Isolation aus 10^8 KbE <i>E. coli</i> und Vermessung verschiedener Verdünnungen	400 KbE
RNA-Synthese durch <i>in vitro</i> -Transkription und Vermessung verschiedener Verdünnungen	80 KbE

Bei allen schnellen und modernen Nachweismethoden bleibt das Problem der Probenvorbereitung bestehen. Unter Laborbedingungen ist die RNA-Isolation mittels Spin-Säulchen von ausgebildetem Personal problemlos durchführbar. Jedoch ist das Ziel eines *Lab-on-a-Chip*-Systems, dass auch ungelerntes Personal den Nachweis

bakterieller RNA an Ort und Stelle ausführen kann (Crevillen *et al.*, 2007). In dieser Arbeit wurde eine schnelle und einfache RNA-Isolationsmethode an Reinkulturen etabliert, welche eine für Biochip-Messungen ausreichende RNA-Integrität lieferte. Dazu wurde ein thermischer Lyseschnitt zur Zerstörung der bakteriellen Zellwand und die RNA-Fragmentierung in einem Schritt durchgeführt. Für diese Methode ergab sich eine Nachweisgrenze von 5×10^3 KbE *E. coli* (Abb. 3-24). Im Gegensatz zu aufgereinigter RNA stellte dies zwar ein zehnfach schlechteres Detektionslimit dar, jedoch ist diese Methode der Direktlyse kosten- und zeitsparender verglichen mit der konventionellen RNA-Isolation.

3.1.10 Regenerierbarkeit der Biochips

Die Möglichkeit der Regenerierung der Biochip-Oberfläche wäre eine bedeutende Option, v.a. in Hinblick auf die Kosten der Nachweismethode. Typischerweise ist die Denaturierung von Hybridisierungsreaktionen bei hohen Temperaturen und niedrigen Salzkonzentrationen oder mit Wasserstoffbrückenbindung-zerstörenden Reagenzien möglich. Die Behandlung der Chipoberfläche mit 95 °C heißem ddH₂O für zwei Minuten machte deutlich, dass man danach erneut eine Hybridisierung auf der Chipoberfläche durchführen konnte und auch bei der zweiten und dritten Hybridisierung ähnliche Signalwerte erhielt (Varianz von drei Messungen 11%). Nach Denaturierung unter den genannten Bedingungen war lediglich ein Hintergrundsignal zu detektieren ($0,05 \pm 0,02$ nA/sek).

Ebenfalls war es analog dazu möglich, die Denaturierung der Nukleinsäurehybridisierung durch Waschen mit 10 mM NaOH bei 20°C herbeizuführen (Messsignal nach Denaturierung $-0,07 \pm 0,07$ nA/sek; Varianz nach drei Messungen 11%), was die Erhitzung des Chips auf hohe Temperaturen vermeidet und deshalb schonender für den Chip ist.

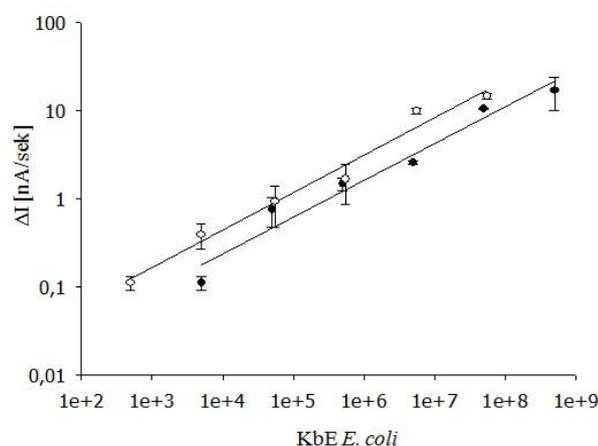


Abbildung 3-24: Vergleich der Sensitivität der Biochip-Analyse nach Direktlyse bzw. Isolation aufgereinigter RNA aus *E. coli*. Auftragung der *E. coli*-Zellzahlen gegen die Signalstärke für RNA-Isolation mittels kommerzieller Methode (○) bzw. durch Direktlyse (●). Die Linearität beträgt $R^2 = 0,97$ bzw. $0,96$.

3.1.11 Serienexperiment zur Validierung des elektrochemischen Nachweissystems

Eine Validierung des elektrochemischen Nachweissystems sollte in dieser Arbeit durch Nachweis von *E. coli* in Fleischproben erfolgen. Diese Studie wurde in Kollaboration mit dem Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie (Prof. Gareis) am Max Rubner-Institut in Kulmbach durchgeführt.

Da die Sensitivität und Stabilität der gesamten Nachweisprozedur wesentlich von einer quantitativen RNA-Isolierung abhängt, wurden unterschiedliche Methoden in Form verschiedener Kit-Systeme verglichen (*PrestoSpin R*, Molzym; *RNAqueous*, Ambion; *Nexttec Bacteria*, Nexttec; *Dianova UltraClean*, Dianova; *RNeasy Mini Kit*, Qiagen). Hierbei zeigte der *RNeasy Mini Kit* von Qiagen die besten Ergebnisse. Weitere Versuche zur Optimierung der RNA-Isolierung aus Lebensmittelproben ermöglichten die Etablierung einer Dreischritt-Lyse, bestehend aus Lysozym-, Proteinase K- und Ultraschallbehandlung. Diese führte zu einer signifikanten Steigerung der RNA-Ausbeute für *E. coli* in Lebensmittelmatices. Dieses wurde auch durch die erhöhte Sensitivität des *E. coli*-Nachweises mittels Biochip nach Anreicherung von natürlich mit *E. coli* kontaminiertem Fleischtropfsaft bestätigt (Heidenreich *et al.*, 2009).

Da der 16S rRNA-Gehalt von *E. coli* in Abhängigkeit des physiologischen Zustandes um das bis zu zehnfache variiert und *E. coli* in der Lebensmittelmatrix während der Prozessierung eher suboptimale Bedingungen vorfindet, ist die Sensitivität des 16S rRNA-Direktnachweises aufgrund des vermutlich geringeren Ribosomengehaltes gegenüber exponentiell wachsenden Bakterien reduziert (Bremer & Dennis 1987). Aus diesem Grund wurde eine Anreicherung etabliert, die *E. coli* zum einen in die exponentielle Wachstumsphase versetzt, in der sich die höchste 16S rRNA-Konzentration in den Zellen befindet (siehe Kapitel 3.1.8.8). Zum anderen wurde die Anreicherungszeit dahingehend optimiert, dass eine hohe Sensitivität des Gesamtnachweises erreicht wird. In den Untersuchungen zur Voranreicherung stellte sich eine Anreicherung für 5 h in gepuffertem Peptonwasser als die beste der untersuchten Möglichkeiten heraus (Heidenreich *et al.*, 2009).

Das Versuchsschema zur Validierung des gesamten Nachweissystems, bestehend aus Anreicherung, RNA-Isolation und Biochipmessung von *E. coli* 16S rRNA ist in Abbildung 3-25 dargestellt. Als Realproben wurden 25 Schweine- bzw. Rindfleischproben verwendet. Das Serienexperiment wurde durch klassische mikrobiologische Analysen begleitet.

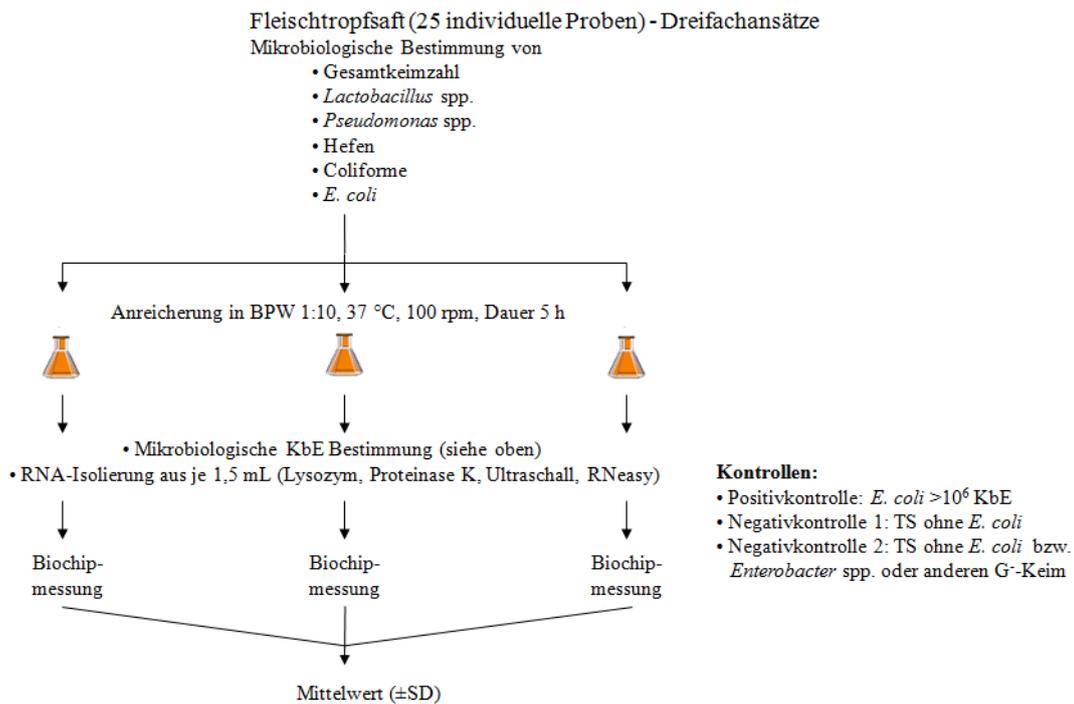


Abbildung 3-25: Versuchsaufbau der Serienexperimente zur Validierung des Gesamtnachweises von *E. coli* in Fleischproben. TS = Tropfsaft, G⁻ = Gram-negativ.

Nach fünfstündiger Anreicherung und RNA-Isolierung wurde die Gesamt-RNA in Gegenwart von immobilisierten ECOLI-Fängern, Helfer-ODN und EST2-ODN-Konjugat nachgewiesen. Als Negativ-Kontrolle wurde eine Elektrode auf dem Biochip unbehandelt gelassen.

Um einen Grenzwert für die Zuverlässigkeit der Biochip-Werte festzulegen, wurde das Biochip-Signal für eine Probe, welche keine Nukleinsäure enthält, herangezogen. Alle gemessenen elektrochemischen Signale, die den Mittelwert dieser Negativ-Probe zuzüglich deren dreifachen Standardabweichung übertrafen, wurden als signifikant betrachtet. Es zeigte sich eine relativ gute Korrelation zwischen mikrobiologisch bestimmter *E. coli*-Koloniezahl und elektrochemischen Messsignal (Abb. 3-26). Alle Messwerte für Keimzahlen größer 2.000 KbE *E. coli* nach Anreicherung konnten als signifikant angesehen werden. Im Bereich unterhalb dieses Grenzwertes ist eine sichere Aussage zur Anwesenheit von *E. coli* nicht möglich, da etwa der Signal-Mittelwert für eine Fleischprobe mit etwa 700 KbE/mL *E. coli* nach Anreicherung knapp unterhalb des ermittelten Detektionslimits liegt, wohingegen ein Tropfsaft mit etwa 500 KbE/mL *E. coli* nach Anreicherung ein sicheres Messsignal produzierte.

Für 23 Fleischproben ergaben der elektrochemische Nachweis und die traditionell mikrobiologische Plattierungsmethode identische Ergebnisse. Zwei der Tropfsaft-Anreicherungen resultierten in keinem elektrochemischen Signal (≤ 0 nA/sek). Das heißt, keine Analyse war im Falle des elektrochemischen Biochips falsch positiv, zwei Analysen von den 25 Proben waren falsch negativ (negativer Befund mit

elektrochemischer Methode, positives Ergebnis mittels Kultivierungsmethode). Auffällig war, dass diese zwei falsch negativen Proben im Bereich der niedrigen Keimzahlen nach Anreicherung lagen. Dies könnte in den unterschiedlichen Probenmengen, die für den mikrobiologischen bzw. elektrochemischen Nachweis verwendet wurden, und der Ungleichverteilung der *E. coli*-Zellen in den Anreicherungen begründet liegen.

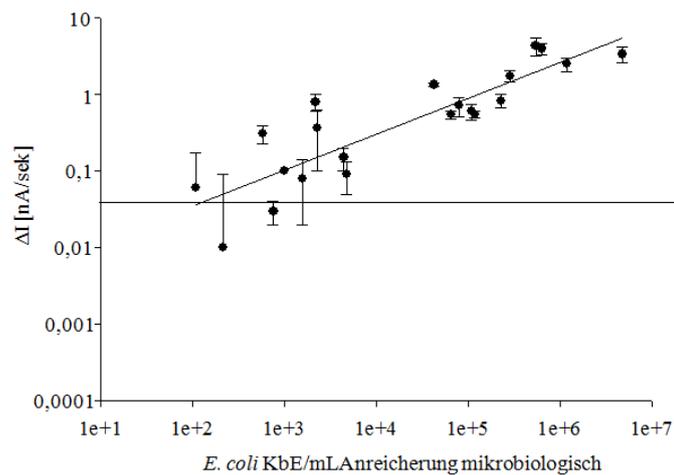


Abbildung 3-26: **Korrelation der mikrobiologisch ermittelten Keimzahlen für *E. coli* nach Anreicherung mit den gemessenen elektrochemischen Biochip-Signalen.** Die horizontale Linie zeigt die Nachweisgrenze (Blank + 3 x Standardabweichung) an. Das Bestimmtheitsmaß R^2 beträgt 0,69.

Die parallel durchgeführte Überprüfung der Selektivität des elektrochemischen Nachweissystems durch die mitgeführten Negativ-Kontrollen des Serienexperimentes zeigte, dass nahezu alle Kontrollen kein signifikantes Biochip-Signal generierten. Lediglich jene Negativ-Kontrollen, die RNA der Tropfsaftisolate *Enterobacter* spp. und *Pantoeae* spp. isoliert aus jeweils 6×10^8 Kbe enthielten, erzeugten ein signifikantes Biochip-Signal. Die Kreuzreaktivität dieser Proben mit den ECOLI-Fängern beruht auf dem hohen Überschuss an Nicht-Ziel 16S rRNA. Derartige unspezifische Effekte sind auch für andere molekularbiologische Nachweissysteme beschrieben, haben aber, wie auch in diesem Fall, keine praxisrelevante Bedeutung, da derartige Überschussverhältnisse an Nicht-Ziel RNA einer einzigen Spezies nahezu nicht anzutreffen sind (Pozhitkov *et al.*, 2007a; Rule *et al.*, 2009). Als weitere Negativ-Kontrollen wurden Anreicherungen von Tropfsäften des Serienexperimentes verwendet, die einen mikrobiologisch negativen *E. coli* Befund aufwiesen (Heidenreich *et al.*, 2009).

3.1.11.1.1 Verlässlichkeit der *E. coli*-Detektion

Es wurde bereits dargestellt, dass die verwendete *E. coli* Sonde 100% Homologie zu dem entsprechenden 16S rRNA-Bereich vieler Laborstämme aufweist. Inwieweit dies auch auf *E. coli* aus Fleischproben zutrifft, wurde untersucht. Hierzu wurden unter

anderem aus Fleischproben des Serienexperimentes *E. coli*-Stämme isoliert und die 16S rDNA sequenziert. Das Alignment der 16S rDNA-Sequenzen für unterschiedliche *E. coli*-Stämme aus Fleischproben mit dem *E. coli*-spezifischen Fänger des Biochips (Abb. 3-27) zeigte, dass der *E. coli*-Stamm 163, ein Fleischproben-Isolat des MRI, 100% Homologie zur Fängersonde aufweist. Ebenso sind die 16S rDNA weiterer Fleischtropfsaft-Isolate 100% homolog zum *E. coli*-spezifischen Fänger. Allerdings wurden insbesondere aus den Fleischproben des Serienexperimentes *E. coli*-Stämme isoliert, die im Sondenbereich Fehlbasenpaarungen aufweisen. Von den zwölf *E. coli*-Isolaten des Serienexperimentes zeigten lediglich fünf Isolate 100% Homologie zur *E. coli*-Sonde. Dagegen wurden sieben Isolate mit Fehlbasenpaarungen gefunden. Besonders interessant hierbei ist, dass vier der Isolate ein Sequenzmuster im Sondenbereich aufzeigten, das ebenso bei einigen pathogenen *E. coli*-Stämmen anzutreffen ist. Diese Isolate hatten im Sondenbereich sechs Fehlpaarungen. Dies führt aufgrund der Stringenz des Biochipnachweises dazu, dass 16S rRNA mit dieser Sequenz nicht detektiert wird. Allerdings zeigt sich im Falle einiger genomisch sequenzierter EHEC-Stämme, dass nicht alle sieben rDNA-Operons diese Sequenz tragen. So enthalten sechs Operons des EHEC-Stammes Sakai im Sondenbereich die in Abbildung 3-29 dargestellte Sequenz, ein Operon hingegen besitzt 100% Homologie zur verwendeten Sonde des Biochips. Auch in dem EHEC-Stamm EDL 933 sind beide Sequenzvariationen in den sieben rDNA-Operons enthalten.

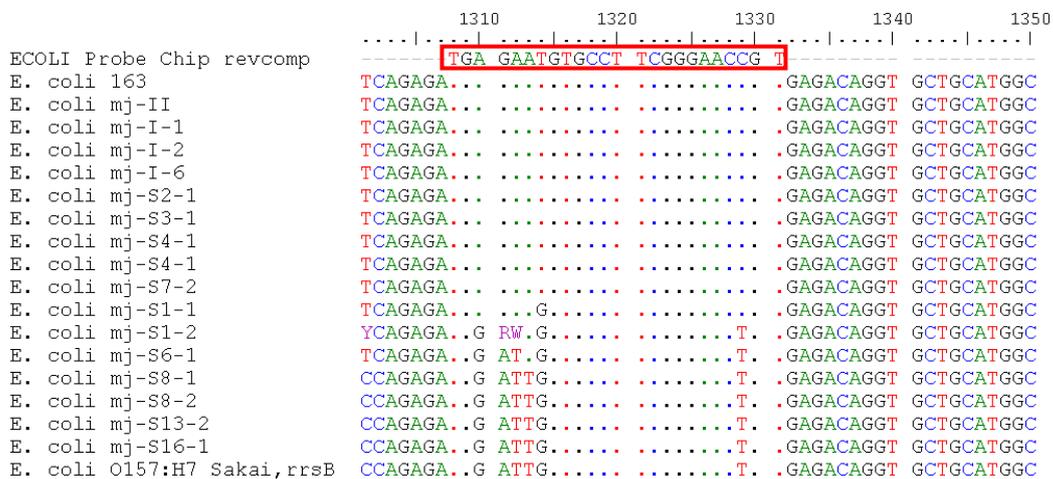


Abbildung 3-27: Alignment der 16S rDNA-Sequenzen von *E. coli*-Isolaten aus Fleisch mit der *E. coli*-spezifischen Sonde des Biochips. Die Sequenz der *E. coli*-spezifischen Sonde ist rot markiert. Die 16S rDNA-Sequenz vom Operon *rrsB* des *E. coli* O157:H7-Stammes Sakai als Beispiel für ein bei EHEC-Stämmen vorkommendes Sequenzmuster im Sondenbereich des Biochips ist ebenfalls angegeben.

3.1.12 Antibiotikanachweis durch Wachstumsselektion und 16S rRNA-Nachweis

Nosokomiale Infektionen mit Methicilin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) nehmen in den letzten Jahren stark zu (Diekema *et al.*, 2004). Deshalb gibt es enormen Bedarf an einem schnellen und zuverlässigen Nachweis bakterieller

Antibiotikaresistenzen in der klinischen Diagnostik. Neben der klassischen phänotypischen Resistenzprüfung halten vermehrt schnelle, neue Methoden, wie Echtzeit-PCR und *Microarrays* Einzug in diagnostische Labore (Barken *et al.*, 2007). Aufgrund der hohen Sensitivität des elektrochemischen Nachweissystems sollte überprüft werden, ob der direkte 16S rRNA-Nachweis zum Antibiotikaresistenznachweis genutzt werden kann. Dazu kultivierte man 65 KbE eines Ampicillin-resistenten *E. coli*-Stammes (*E. coli* HB101) für zwei bis sieben Stunden in LB-Medium mit Ampicillin, isolierte nach verschiedenen Zeitpunkten die Gesamt-RNA und bestimmte nach welcher Inkubationszeit ein Nachweis der bakteriellen 16S rRNA möglich war. Bereits nach vierstündiger Inkubation konnte mittels Vier-Komponenten-Sandwich-Hybridisierung ein signifikantes elektrochemisches Signal detektiert werden ($0,10 \pm 0,02$ nA/sek), welches jedoch sehr nahe am Detektionslimit des Nachweissystems lag (Abb. 3-28 A). Gleichzeitig zu einer über die Inkubationszeit zunehmenden Zellzahl beobachtete man eine Zunahme des elektrochemischen Signals nach RNA/DNA-Hybridisierung (Abb. 3-28 A). Zusätzlich inkubierte man einen nicht-resistenten *E. coli*-Stamm (*E. coli* 163) in LB-Medium mit Ampicillin bzw. ohne Ampicillin. Lediglich isolierte RNA aus LB-Medium ohne Ampicillin lieferte ein elektrochemisches Messsignal, da nur in diesem Medium Wachstum von *E. coli* 163 stattfand (Abb. 3-28 B). In LB-Medium mit Polymyxin B zeigten weder *E. coli* 163 noch *E. coli* HB101 Wachstum und aus diesen Kulturen isolierte RNA generierte folglich auch kein elektrochemisches Messsignal. Polymyxin B bindet an die Zellmembran Gram-negativer Bakterien und verändert deren Struktur, was zu einer erhöhten Permeabilität für Wasser durch die Membran führt (Daugelavicius *et al.*, 2000).

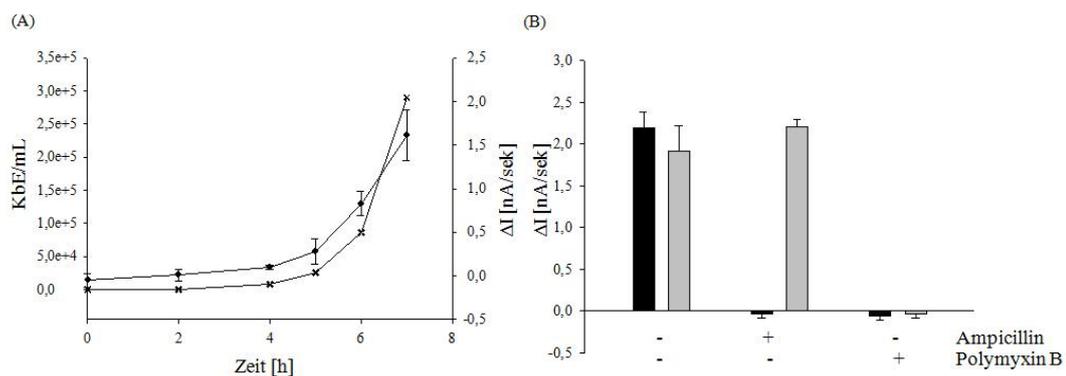


Abbildung 3-28: **Elektrochemischer Nachweis von Ampicillin-resistenten *E. coli*.** (A) Kultivierung von 65 KbE *E. coli* HB101 für 7 h bei 37°C in LB-Medium mit Ampicillin (50 µg/mL). Zu den markierten Zeitpunkten wurde die Gesamt-RNA isoliert und mittels Biochip vermessen (●). Gleichzeitig erfolgte die Bestimmung der Zellzahl durch Ausplattieren der verschiedenen Ansätze (x). (B) Elektrochemische Messsignale nach Hybridisierung von isolierter Gesamt-RNA aus *E. coli* 163 (schwarz) und *E. coli* HB101 (grau) nach siebenstündigem Wachstum in LB-Medium ohne Ampicillin, mit Ampicillin (50 µg/mL) bzw. mit Polymyxin B (20 µg/mL).

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass das etablierte Nachweissystem innerhalb von vier bis fünf Stunden einen Antibiotikaresistenznachweis für *E. coli* erbringen kann. Eine Übertragbarkeit auf andere Mikroorganismen (z.B. MRSA) ist denkbar, jedoch müssen längere Generationszeiten in Betracht gezogen werden.

3.1.13 Entwicklung alternativer 16S rRNA-Detektionsmethoden

3.1.13.1 Elektrochemische Detektion bakterieller 16S rRNA mittels *Sandwich*-Hybridisierung und EST2-Streptavidin-Konjugat Anbindung

3.1.13.1.1 Prinzip

Die Verwendung von kovalent konjugierten Reporterenzym-ODN-Konjugaten zum Nachweis von Nukleinsäuren ist ein neuartiges Konzept in der Biochip-Technologie. Bisher wurde meist die starke Biotin-Streptavidin-Interaktion zwischen einem Biotin-modifiziertem ODN und einem Reporterenzym-Streptavidin-Konjugat ausgenutzt (Nebling *et al.*, 2004; Elsholz *et al.*, 2006; Liao *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008b). Im Rahmen dieser Arbeit sollte erstmals die Sensitivität und Selektivität dieser unterschiedlichen Ansätze verglichen werden.

Nach Isolation der Gesamt-RNA aus der Probe (Abb. 3-29, (1)) erfolgt die Fragmentierung der RNA und die Zugabe von Helfer-ODN (Abb. 3-29, (2)), um eine Auflösung der Tertiärstrukturelemente der ribosomalen RNA zu erreichen. In einem dritten Schritt wird auf der Goldelektrode ein Vier-Komponenten-Komplex aus immobilisierter Fängersonde, fragmentierter 16S rRNA, Helfer-ODN und biotinyliertem Detektor-ODN gebildet (Abb. 3-29, (3)). Darauf kommt es zur Anbindung des EST2-Streptavidin-Konjugats (EST2-SA-Konjugat) an diesen Vier-Komponenten-*Sandwich*-Komplex auf der Goldelektrode. Somit wird das Reporterenzym in die Nähe der Goldelektrode gebracht (Abb. 3-29, (4)). Die katalytische Umsetzung des Substrats durch EST2 erzeugt nun ein elektroaktives Produkt, welches in einem *Redox-Recycling*-Prozess messbare Elektronen generiert (Abb. 3-29, (5)). Der zeitliche Stromverlauf der vier Messelektroden wird simultan dargestellt (Abb. 3-29, (6)).

Das EST2-Streptavidin-Konjugat wurde durch Konjugation des Oberflächen-exponierten Thiol-Restes der EST2 (Cys 118) mit Maleimid-aktiviertem Neutravidin hergestellt und mittels Gelpermeationschromatographie aufgereinigt (Abb. 3-30 A). Neutravidin ist eine deglykosylierte Variante von Avidin und weist im Gegensatz zu Avidin bzw. Streptavidin einen neutralen isoelektrischen Punkt auf (Hiller *et al.*, 1987). Zudem zeigt Neutravidin eine geringere Adsorption an Goldoberflächen im Vergleich zu Streptavidin (Priano *et al.*, 2007; Wolny *et al.*, 2009).

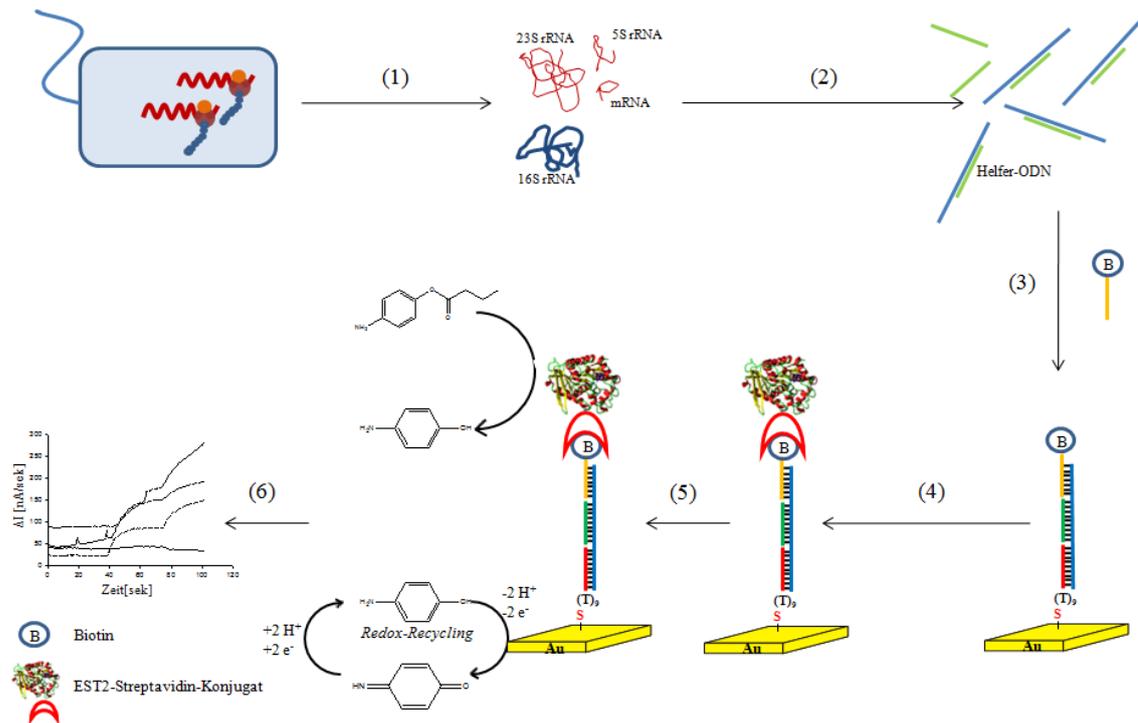


Abbildung 3-29: **Schematische Darstellung des bakteriellen 16S rRNA-Nachweises mittels Sandwich-Hybridisierung und nachfolgender Anbindung des EST2-Streptavidin-Reporterkonjugats.** Die 16S rRNA ist in blau, die Fänger-, Helfer- bzw. Detektionsoligonukleotide sind in rot, grün bzw. gelb abgebildet. Folgende Schritte sind dargestellt: (1) RNA-Isolation aus Bakterienzellen. (2) Fragmentierung der Gesamt-RNA und Hybridisierung von Helfer-ODNs an komplementäre Bereiche der 16S rRNA. (3) Ausbildung des Vier-Komponenten-Komplexes aus Fänger-, Helfer- und biotinyliertem Detektor-ODN sowie 16S rRNA. (4) EST2 wird über Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung in die Nähe der Goldelektrode gebracht. (5) Durch enzymatische Substrathydrolyse und *Redox-Recycling* werden amperometrisch detektierbare Elektronen produziert. (6) Temporale Analyse der gemessenen Ströme an den vier Elektroden.

Aus dem Elutionsprofil wird deutlich, dass an ein Streptavidintetramer mehrere EST2-Moleküle kovalent gebunden werden können. Fraktion (1) eluiert mit dem Ausschlussvolumen, besitzt somit das größte Molekulargewicht. Fraktionen (2) und (3) weisen dagegen ein geringeres Molekulargewicht und deswegen weniger mit Streptavidin kovalent verknüpfte EST2-Moleküle auf.

Neben der Messung der Absorption bei 280 nm während der Elution wurden die eluierten Fraktionen auch elektrochemisch mittels DNA-DNA-Hybridisierung auf dem Biochip vermessen (Abb. 3-30 B). Dabei zeigte sich, dass Fraktion (1) das größte amperometrische Messsignal generierte, während die Fraktionen (2) und (3) jeweils geringere Messsignale ergaben. Diese Messung bestätigte das Ergebnis der Gelpermeationschromatographie, dass bei Fraktion (1) die größte Zahl an EST2-Molekülen verbunden mit einem Streptavidintetramer vorliegt.

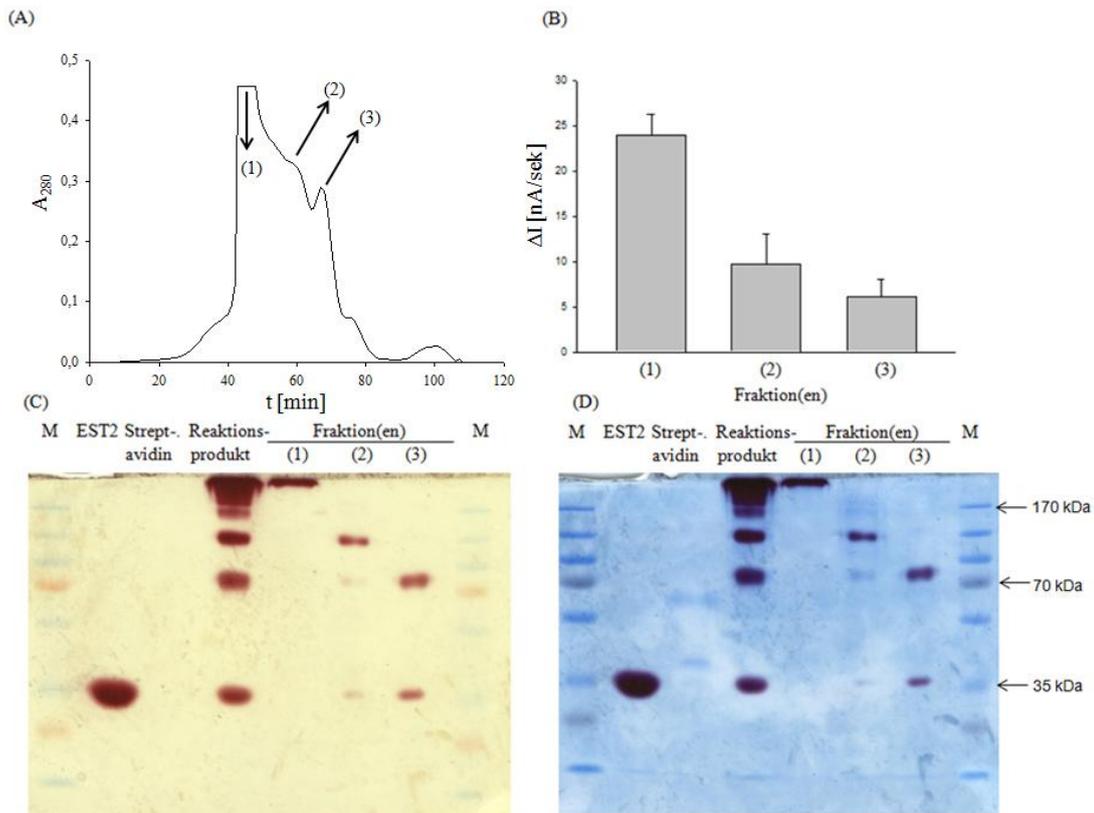


Abbildung 3-30: **Herstellung eines EST2-Streptavidin-Reporterkonjugats.** (A) Gelpermeationschromatographie zur Reinigung der Reaktion zwischen EST2 und Maleimid-aktiviertem Streptavidin (Sephacryl S-200HR). Die im Folgenden analysierten Fraktionen sind mit Pfeilen gekennzeichnet und nummeriert. (B) Amperometrische Messung der DNA-DNA-Hybridisierung und Nachweis mit EST2-SA-Konjugat. (C) 10% Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) mit Esteraseaktivitätsfärbung von EST2 bzw. EST2-SA-Konjugaten. (D) 10% PAGE mit Coomassie-Färbung von EST2 bzw. EST2-SA-Konjugaten. Entscheidende Banden des Größenstandards sind markiert.

Die Fraktionen (2) und (3) weisen dagegen abnehmende Mengen an EST2-Molekülen pro Molekül Streptavidin auf. Die Abbildungen 3-30 C und D zeigen die elektrophoretische Auftrennung der Fraktionen und die Anfärbung mittels Esteraseaktivitätsfärbung (Harris & Hopkinson 1976) und *Coomassie Blue*. Fraktion (1) liegt sauber als hochmolekulares Reaktionsprodukt vor. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde mit dem EST2-SA-Konjugat aus Fraktion (1) gearbeitet, da dieses analytisch rein vorliegt und desweiteren einen gewissen Signalamplifikationseffekt aufgrund der größeren Zahl an gebundenen EST2-Molekülen aufweist.

3.1.13.1.2 Selektivität und Sensitivität

Eine ausreichende Differenzierung zwischen verschiedenen Mikroorganismen mittels Biochip-Analyse sollte unabhängig vom Reporterenzymkonjugat sein. Zur Überprüfung der Selektivität bei Verwendung des EST2-SA-Konjugats und *Sandwich*-Hybridisierung (Abb. 3-31 A) wurde fragmentierte *E. coli* Gesamt-RNA für die Hybridisierung auf einem Biochip verwendet. Nach der Hybridisierung erfolgte ein weiterer Schritt, bei

dem die Streptavidin-Biotin-Interaktion hergestellt wird. Weder die blanke Goldelektrode (BLANK), noch die beiden Elektroden, die nicht-komplementäre Fänger trugen (LISTERIA und HALVEI) zeigten ein elektrochemisches Signal. Dagegen produzierte die Elektrode mit immobilisiertem ECOLI-Fänger ein deutlich positives Signal (Abb. 3-31 A). Die Selektivität der mikrobiellen 16S rRNA-Detektion wird folglich nicht von der Art des Reporterenzymkonjugats beeinflusst, was auch andere Veröffentlichungen demonstrieren (Elsholz *et al.*, 2006; Liao *et al.*, 2006).

Auch für dieses Detektionssystem sollten die Nachweisgrenze und der lineare Bereich der 16S rRNA-Detektion bestimmt werden. Um die Ergebnisse mit Literaturwerten vergleichen zu können, erfolgte die Bestimmung der Nachweisgrenze durch Isolierung von mikrobieller Gesamt-RNA aus 10^8 KBE *E. coli*, anschließender dezimaler Verdünnung und Vermessung auf einem Biochip, welcher immobilisierte ECOLI-Fänger trug. Das Detektionslimit lag bei 0,5 ng Gesamt-RNA, was etwa 1×10^4 KBE *E. coli* entspricht (Curtiss *et al.*, 1996). Der lineare Bereich der Detektion bewegte sich zwischen 10^6 und 10^4 KBE *E. coli* (Abb. 3-31 B).

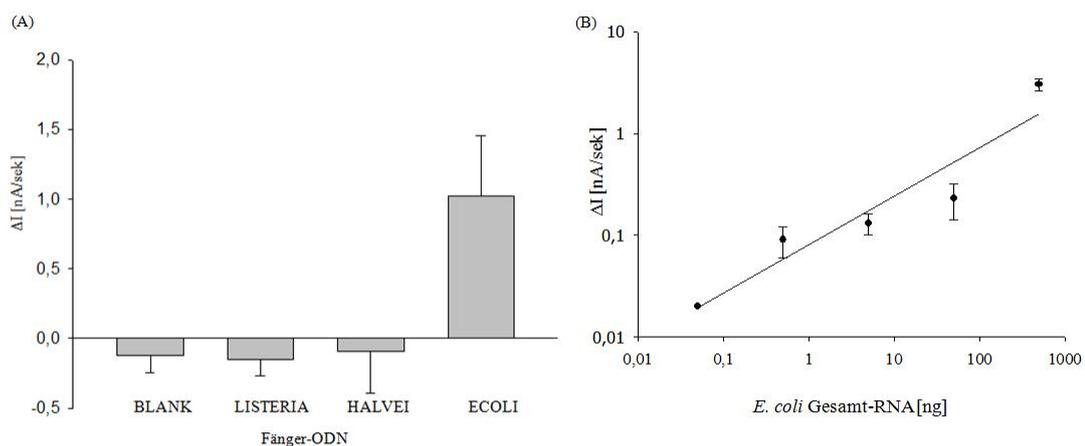


Abbildung 3-31: **Selektivität (A) und Sensitivität (B) der *E. coli*-Detektion mittels Sandwich-Hybridisierung und anschließender EST2-SA-Konjugat Anbindung.** (A) Aufgereinigte und fragmentierte RNA aus *E. coli* wurde auf einem Biochip in Gegenwart der spezifischen Fänger für *Listeria* spp., *H. alvei* und *E. coli* hybridisiert. Nach 20-minütiger Hybridisierung bei 65°C und einem Waschschritt erfolgte die Anbindung des EST2-SA-Konjugats an das Biotin-modifizierte Detektor-ODN. Eine Elektrode wurde dagegen ohne Fänger belassen, um etwaige unspezifische Bindung des EST2-SA-Konjugats an die Goldelektrode zu detektieren. (B) Gesamt-RNA wurde aus 10^8 KBE *E. coli* isoliert und verschiedene Verdünnungen nach rRNA/DNA-Hybridisierung elektrochemisch vermessen. Die Linearität R^2 beträgt 0,90.

3.1.13.2 Nachweis Biotin-markierter 16S rRNA mittels elektrochemischer Biochips

3.1.13.2.1 Prinzip

Die direkte Detektion von Biotin-markierter RNA mittels EST2-SA-Konjugat sollte hier mit den zuvor beschriebenen elektrochemischen RNA-Detektionsmethoden verglichen werden.

Dazu fragmentierte man die aus *E. coli* isolierte Gesamt-RNA und markierte diese Fragmente am 5'-Ende mit Biotin. Die biotinylierten RNA-Fragmente hybridisierten selektiv an die auf der Goldelektrode immobilisierten Bakterien-spezifischen Fängeroligonukleotide. Diese RNA/DNA-Hybride wurden über die hochaffine Bindung des EST2-SA-Reporterkonjugats an die Biotin-Markierung amperometrisch detektiert (Abb. 3-32 A). Der Reaktionsablauf der RNA-Markierung mit Biotin ist in Abbildung 3-32 B dargestellt (Kemp *et al.*, 1985; Kinoshita *et al.*, 1997).

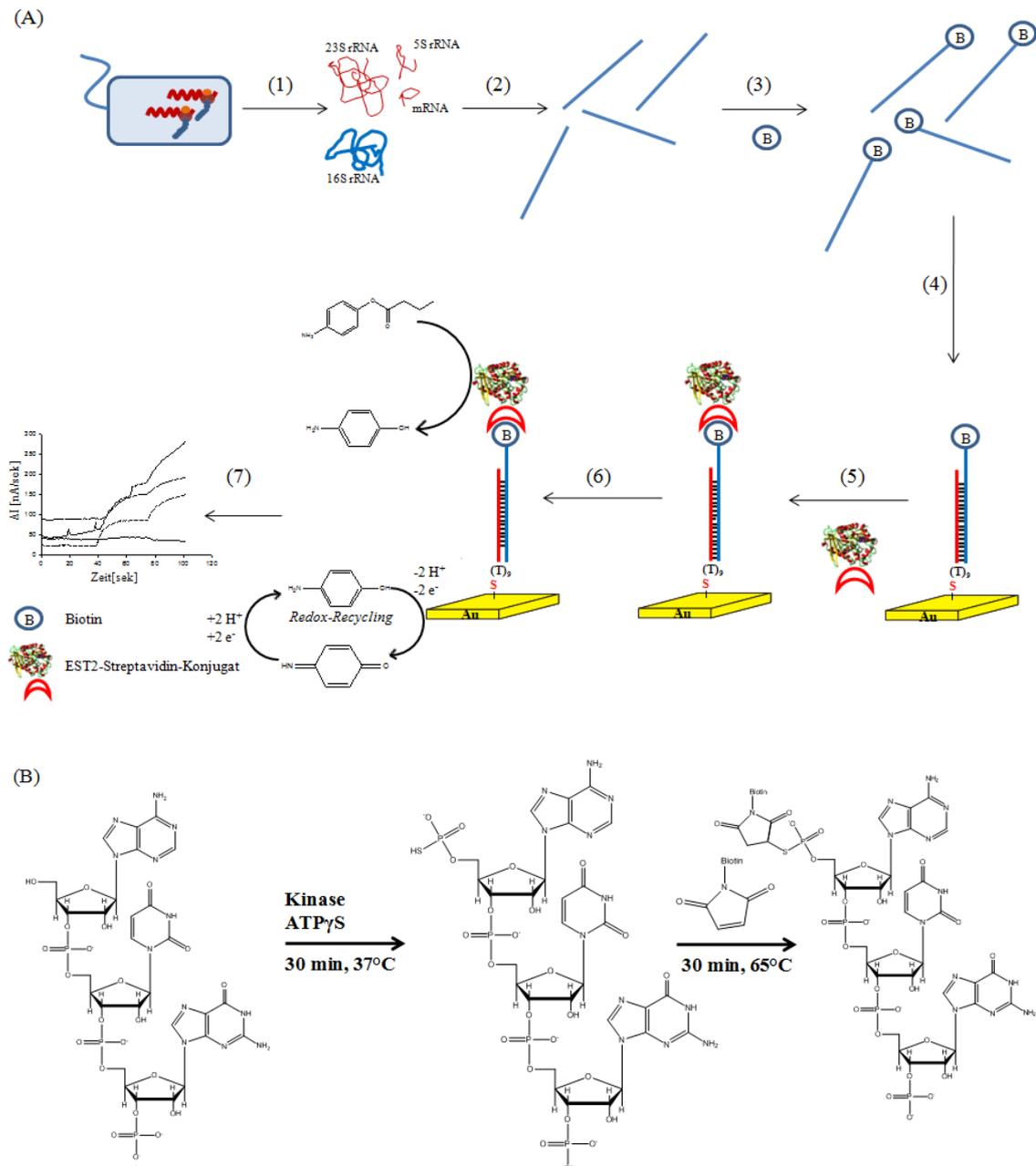


Abbildung 3-32: **Elektrochemische Detektion von am 5'-Ende Biotin-markierter 16S rRNA mittels EST2-Streptavidin-Konjugat.** (A) Nach Isolierung der Gesamt-RNA aus *E. coli* (1) wurde diese fragmentiert (2) und am 5'-Ende mit Biotin (B) markiert (3). Die Ausbildung des RNA/DNA-Hybrids auf der Goldelektrode (4) wurde durch Bindung von EST2-SA-Reporterkonjugat an die Biotinmarkierung nachgewiesen (5). Das elektroinaktive Substrat wurde durch die EST2 zu einem elektroaktiven Produkt

umgewandelt, das in einem *Redox-Recycling*-Prozess Elektronen generiert (6). Der zeitliche Verlauf des Stroms an den vier Elektroden wird ausgewertet (7). (B) Reaktionsablauf der enzymatischen Markierung des 5'-Endes der fragmentierten RNA. Im ersten Schritt wurde am dephosphorylierten 5'-Ende mittels T4 Polynukleotidkinase ein γ -Thiolphosphat eingebaut. Die Thiolgruppe wurde in einem zweiten Schritt spezifisch mit Biotin-Maleimid umgesetzt.

Der Nachweis der erfolgreichen endständigen Markierung der fragmentierten RNA erfolgte mittels Dot Blot und Detektion des enzymatischen Umsatzes der Alkalischen Phosphatase (Abb. 3-33).

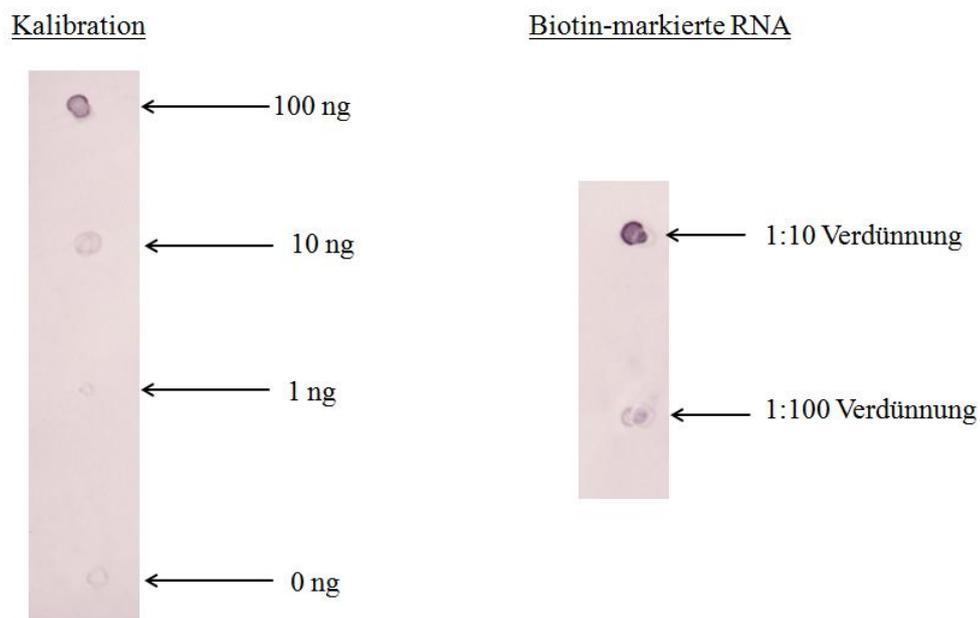


Abbildung 3-33: **Dot-Blot zum Nachweis der erfolgreichen Markierungsreaktion von RNA mit Biotin.** Zur Kalibrierung wurden definierte Mengen einer am 5'-Ende mit Biotin markierten DNA auf eine Nitrocellulose-Membran aufgetragen und durch UV-Behandlung immobilisiert. Nach Blockierung der Membran erfolgte der Nachweis der Biotin-Markierung mittels AP-SA-Konjugat und kolorimetrischer Detektion der Enzymreaktion. 1 μ g *E. coli* Gesamt-RNA wurde fragmentiert und anschließend enzymatisch am 5'-Ende mit Biotin markiert. Die angegebenen Verdünnungen der RNA wurden nach Ethanol-Fällung des Reaktionsansatzes wie oben beschrieben auf der Nitrocellulosemembran nachgewiesen.

3.1.13.2.2 Selektivität und Sensitivität

Wie bereits in den vorhergehenden Kapiteln beschrieben, sollte auch hier die Selektivität dieses Nachweissystems untersucht werden. Dazu wurde Gesamt-RNA aus 10^8 KBE *E. coli* verwendet (Abb. 3-34 A). Da die blanke Goldelektrode kein Signal generierte, konnte eine unspezifische Bindung des EST2-SA-Konjugats an die Goldoberfläche ausgeschlossen werden. Auch die Elektroden, auf denen Fänger spezifisch für *Listeria* spp. bzw. *H. alvei* immobilisiert wurden, zeigten nach Hybridisierung und Reporterenzymbindung keinerlei elektrochemische Signale. Lediglich die Elektroden, die Fänger komplementär zu dem relevanten Bereich der *E.*

coli 16S rRNA trugen, zeigten in Anwesenheit markierter und fragmentierter *E. coli* 16S rRNA ein deutlich positives elektrochemisches Signal.

Die Bestimmung der Nachweisgrenze erfolgte durch Verdünnung der fragmentierten und Biotin-markierten 16S rRNA und Analyse der jeweiligen elektrochemischen Signale (Abb. 3-34 B). Die Nachweisgrenze für markierte 16S rRNA liegt bei 1 ng Gesamt-RNA, d.h. etwa 2×10^4 KbE *E. coli* (Curtiss *et al.*, 1996). Der lineare Bereich der Detektion von Mikroorganismen liegt zwischen 10^6 und 10^4 KbE *E. coli*. Sowohl das hier ermittelte Detektionslimit als auch der lineare Bereich ist analog zu der oben beschriebenen *Sandwich*-Hybridisierung und anschließender EST2-SA-Konjugat Anbindung (s. Kapitel 3.1.13.1).

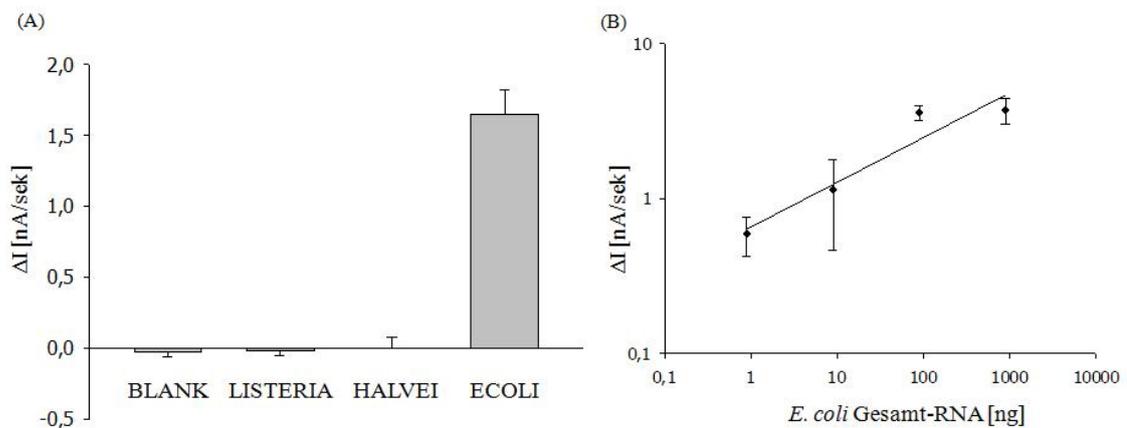


Abbildung 3-34: **Selektivität (A) und Sensitivität (B) der *E. coli*-Detektion mittels Biotin-markierter RNA.** (A) Nach Isolation von Gesamt-RNA aus 10^8 KbE *E. coli* wurde diese fragmentiert, enzymatisch am 5'-Ende mit Biotin markiert und anschließend auf einem Biochip mit immobilisierten ECOLI-, LISTERIA- und HALVEI-Fängern hybridisiert. Danach erfolgte die Anbindung des EST2-SA-Konjugats an hybridisierte und biotinylierte RNA-Fragmente. Eine Elektrode wurde ohne Fänger belassen, um etwaige unspezifische Bindung des EST2-SA-Konjugats an die Goldelektrode zu detektieren. (B) Nach Isolation von Gesamt-RNA aus 10^8 KbE *E. coli* wurde diese fragmentiert, enzymatisch am 5'-Ende mit Biotin markiert und die Konzentration spektralphotometrisch bestimmt. Anschließend wurden verschiedene Verdünnungen dieser markierten RNA auf einem Biochip mit immobilisierten ECOLI-Fängern hybridisiert. Danach erfolgte die Anbindung des EST2-SA-Konjugats an hybridisierte und markierte RNA-Fragmente. Die Linearität R^2 beträgt 0,94.

3.1.13.3 Identifikation von Mikroorganismen mittels Vier-Komponenten-*Sandwich*-Hybridisierung auf magnetischen Partikeln und spektralphotometrischer Auslesung

Als eine alternative Methode zur elektrochemischen Transduktion bietet die spektralphotometrische Bestimmung von Hybridisierungsereignissen die Möglichkeit zur Validierung bisheriger Ergebnisse.

3.1.13.3.1 Prinzip

Neben der elektrochemischen Detektion von Hybridisierungsreaktionen bietet sich auch die spektralphotometrische Detektion an, da diese sehr einfach und kostengünstig ist. Ein eleganter Ansatz ist der Nukleinsäurenachweis mit magnetischen Partikeln, so genannte *Magnetic Bead Based Assays* (Pioch *et al.*, 2008b).

Die Vorgehensweise ist analog zu der vorher beschriebenen, jedoch ist der Fänger hier anstatt auf der Goldelektrode auf magnetischen Partikeln, die mehrere Amino-Gruppen auf der Partikeloberfläche tragen, immobilisiert. Der Nachweis der Immobilisierung erfolgte über Hydrolyse des Substrats *p*-Nitrophenolbutyrat (pNPB) zum photometrisch detektierbaren *p*-Nitrophenol (pNP) (Abb. 3-35).

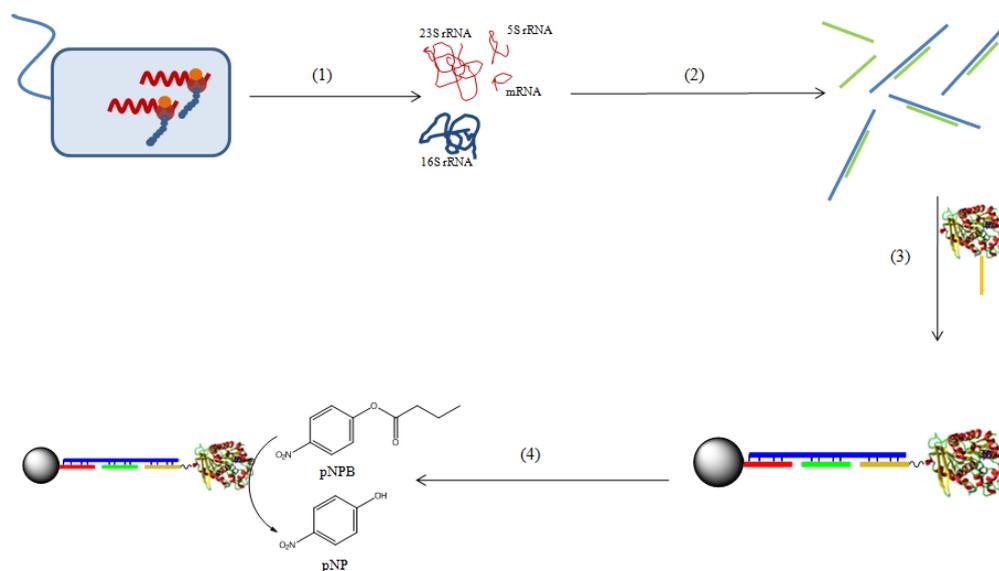


Abbildung 3-35: **Schematischer Aufbau des Nachweises bakterieller 16S rRNA mittels magnetischer Partikel und spektralphotometrischer Detektion.** Die 16S rRNA ist in blau, Fänger-, Helfer- bzw. Detektor-ODN sind in rot, grün bzw. gelb dargestellt. Folgende Schritte sind abgebildet: (1) Isolation der Gesamt-RNA aus dem Probenmaterial. (2) Fragmentierung der RNA und Hybridisierung von Helfer-ODN an komplementäre 16S rRNA-Bereiche. (3) Hybridisierung in Anwesenheit des EST2-ODN-Reporterkonjugats und Ausbildung des Vier-Komponenten-Sandwich-Komplexes auf der Oberfläche der magnetischen Partikel. (4) Hydrolyse des Substrats pNPB durch EST2 zu pNP.

Zu Beginn wurden einige Optimierungsversuche durchgeführt, um zu überprüfen, ob sich aus diesem Ansatz Schlussfolgerungen für den elektrochemischen Nachweis ableiten lassen können. Anschließend wurde für dieses Nachweissystem die Sensitivität und Selektivität der mikrobiellen Analyse bestimmt.

3.1.13.3.2 Optimierungsversuche

Bei den Optimierungsversuchen wurden die zwei Parameter der Hybridisierungszeit und der Notwendigkeit der Fragmentierung und/oder der Zugabe von Helfer-ODN analysiert. Die Hybridisierungszeit wurde näher untersucht, da bei der Hybridisierung auf den magnetischen Kügelchen ein größeres Hybridisierungsvolumen als auf dem

elektrochemischen Biochip nötig ist. Es stellte sich die Frage, ob dieses größere Volumen eine Reduzierung der Hybridisierungskinetik zur Folge hat. Dazu erfolgte die Hybridisierung fragmentierter RNA in Anwesenheit von Helfer-ODN bei 65°C für unterschiedliche Zeiten. Es stellt sich nach 20 Minuten Hybridisierung ein Sättigungseffekt ein, d.h. das Hybridisierungssignal war maximal. Eine Verlängerung der Hybridisierungszeit auf 30 Minuten zeigte keinen positiven Einfluss auf den Signalwert, jedoch war die Standardabweichung der Messwerte deutlich geringer als nach 20-minütiger Hybridisierung (Abb. 3-36 A). Grundsätzlich lässt sich aber festhalten, dass trotz des größeren Hybridisierungsvolumens (100 µL im Vergleich zu 10 µL bei Biochip-Messung) die Hybridisierung zwischen fragmentierter RNA, immobilisiertem Fänger-ODN, Helfer-ODN und EST2-ODN-Reporterkonjugat innerhalb von 20 Minuten Reaktionszeit komplett abläuft. Dies ist analog zu dem Ergebnis mit dem elektrochemischen Messsystem. Weiterhin wurde der Einfluss der Fragmentierung und der Anwesenheit von Helfer-ODN auf das Hybridisierungssignal untersucht. Es zeigte sich, dass die Fragmentierung zu einem deutlicheren Signal führte als der alleinige Einsatz von Helfer-ODN. Das Zusammenwirken aus Fragmentierung und Helfer-ODN zur Auflösung der Tertiärstruktur der ribosomalen RNA ergab jedoch nochmals einen weiteren Signalanstieg (Abb. 3-36 B). Keine Fragmentierung und kein der Reaktion zugesetztes Helfer-ODN führten nur zu einem sehr schwachen Signal, da die komplexe Struktur der 16S rRNA nur sehr ineffizient an das Fänger- bzw.-Detektor-ODN hybridisiert (Lane *et al.*, 2004).

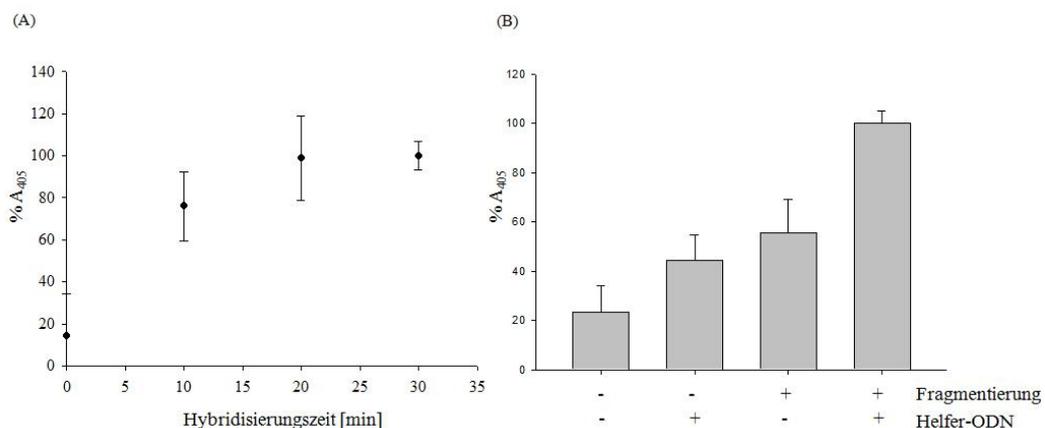


Abbildung 3-36: **Einfluss der Hybridisierungszeit (A) und der Fragmentierung der 16S rRNA bzw. der Anwesenheit von Helfer-ODN während der Hybridisierung (B) auf die spektralphotometrische Signalstärke.** (A) 3 µg *E. coli* Gesamt-RNA wurden nach Fragmentierung für unterschiedliche Zeiten in Gegenwart von magnetischen Partikeln mit immobilisierten Fänger-ODNs, Helfer-ODN und EST2-ODN-Reporterkonjugat hybridisiert. Der Absorptionswert bei einer Wellenlänge von 405 nm nach 20-minütiger Hybridisierung wurde als 100% definiert. (B) 3 µg *E. coli* Gesamt-RNA wurden unter alkalischen Bedingungen in Gegenwart von Mg²⁺ und Helfer-ODN fragmentiert. Bei anderen Ansätzen wurde die RNA nicht fragmentiert bzw. kein Helfer-ODN zugesetzt. Der Absorptionswert bei einer Wellenlänge von 405 nm bei Fragmentierung und Anwesenheit von Helfer-ODN wurde als 100% definiert.

3.1.13.3.3 Selektivität und Sensitivität

Inwieweit die Selektivität durch die größere Hybridisierungsoberfläche der magnetischen Kügelchen im Vergleich zur Elektrodenoberfläche beeinflusst ist, sollte durch Hybridisierung von *E. coli* 16S rRNA-Fragmenten in Gegenwart von Helfer-ODNs und magnetischen Kügelchen mit Fängern spezifisch für *E. coli*, *B. subtilis* und *C. freundii* getestet werden (Abb. 3-37 A). Um etwaige unspezifische Bindung von EST2-ODN-Konjugaten an die Oberfläche der magnetischen Kügelchen zu detektieren, wurden zusätzlich auch magnetische Partikel ohne Fänger für die Hybridisierungsreaktion eingesetzt. Weder ohne immobilisierte Fänger noch mit Fängern spezifisch für *C. freundii* konnte eine Absorption festgestellt werden. Lediglich mit Fänger-ODNs spezifisch für *B. subtilis* konnte ein geringes unspezifisches Signal detektiert werden, was jedoch als Hintergrundsignal zu bewerten war. Lediglich magnetische Kügelchen mit ECOLI-Fängern generierten ein deutliches spektralphotometrisches Signal.

Die Sensitivität der Detektion von Mikroorganismen mittels spektralphotometrischer Detektion wurde mittels Verdünnungen von Gesamt-RNA aus *E. coli* bestimmt (Abb. 3-37 B). Es ergab sich eine Nachweisgrenze von etwa 5×10^6 KbE *E. coli* (entspricht 0,25 μg *E. coli* Gesamt-RNA). Die um einen Faktor vier geringere Sensitivität dieses Nachweissystems verglichen mit dem elektrochemischen Detektionsaufbau begründet sich in der niedrigeren Empfindlichkeit der spektralphotometrischen Detektion verglichen mit der elektrochemischen Methode. Ein linearer Zusammenhang zwischen Signal und RNA-Konzentration ergab sich bis zu 10^8 KbE *E. coli* (Abb. 3-37 B).

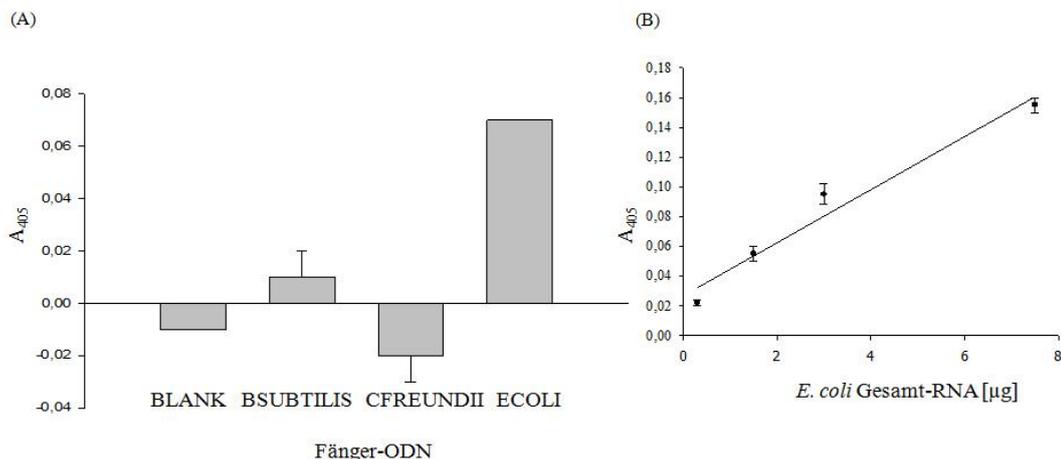


Abbildung 3-37: **Selektivität (A) und Sensitivität (B) der Analyse mikrobieller 16S rRNA mittels Hybridisierung auf magnetischen Kügelchen und spektralphotometrische Signalauslesung.** (A) 3,5 μg *E. coli* Gesamt-RNA wurden für die Hybridisierung mit auf magnetischen Partikeln immobilisierten Fängern spezifisch für *B. subtilis*, *C. freundii* und *E. coli* verwendet. Ein Ansatz von magnetischen Kügelchen wurde ausschließlich mit Oktanthiol behandelt (BLANK). (B) Gesamt-RNA wurde aus 5×10^8 KbE *E. coli* isoliert und aufgereinigt. Nach Fragmentierung der RNA und Zusatz von Helfer-ODN erfolgte die Hybridisierung zwischen verschiedenen Verdünnungen der 16S rRNA-Fragmente, dem immobilisierten ECOLI-Fängern, dem Helfer-ODN und dem EST2-ODN-Reporterkonjugat. Die Linearität R^2 beträgt 0,96.

3.1.13.4 Anwendung eines elektrochemisch-auslesbaren enzymamplifizierten *Molecular Beacon*-Systems zur Nukleinsäuredetektion

3.1.13.4.1 Prinzipieller Aufbau des Detektionssystems mittels *Molecular Beacon*

Eine neuartige Möglichkeit der Analytdetektion bieten so genannte *Molecular Beacon* (MB). Dabei handelt es sich um DNA-Moleküle mit Stamm-Schleife-Struktur, die bereits relativ breiten Einsatz als Fluoreszenzproben finden (Wang *et al.*, 2009). Jedoch gibt es bisher nur sehr wenige Publikationen zum Einsatz von oberflächenimmobilisierten *Molecular Beacon*, die nach Hybridisierung mit komplementärer Nukleinsäure ein enzymatisch amplifiziertes Signal generieren (Bockisch *et al.*, 2005). Deshalb sollte in dieser Arbeit neben den bisher vorgestellten 16S rRNA-Nachweismethoden eine neuartige Sensorapplikation entworfen werden, welche auf einer immobilisierten Haarnadelstruktur beruht. Abbildung 3-38 zeigt das Prinzip des elektrochemischen Biosensors basierend auf einem DNA-MB und enzymatischer Amplifikation.

Im Falle einer Hybridisierungsreaktion zwischen immobilisierten MB und dem komplementären DNA-Strang kommt es zu einer konformationellen Änderung. In Folge derer wird das sich am 3'-Ende des MB befindende Biotin (B) zugänglich für das EST2-SA-Konjugat. Die Immobilisierung der EST2 auf der Goldelektrode sorgt schließlich für die elektrochemische Detektion von pAP einschließlich *Redox-Recycling* (siehe Kapitel 3.1.1).

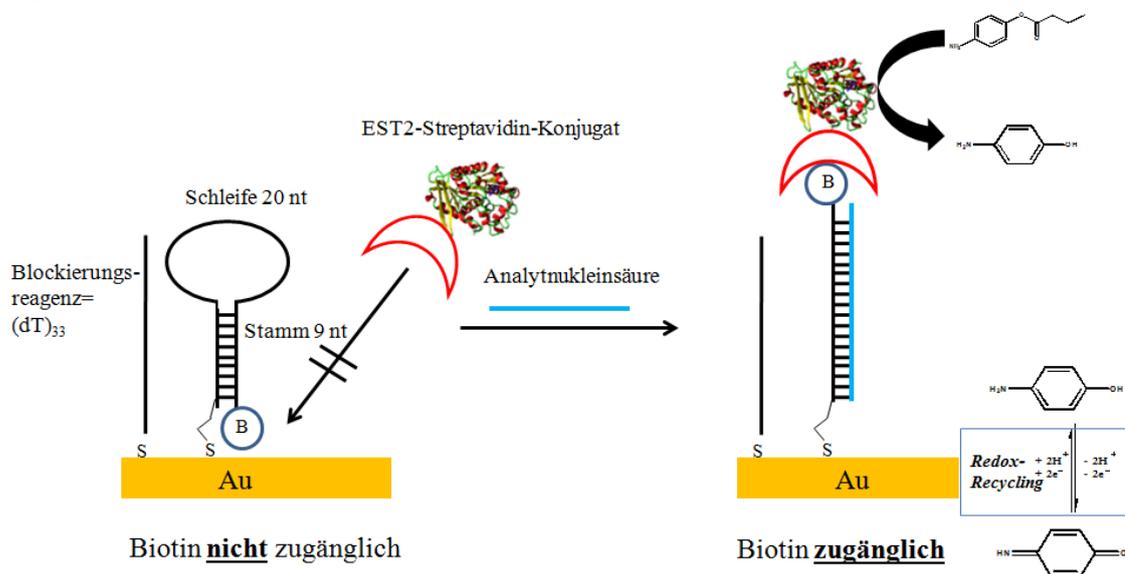


Abbildung 3-38: Schematische Darstellung des Aufbaus des elektrochemischen enzymamplifizierten *Molecular Beacon*-Nachweissystems.

Bei Abwesenheit des zum MB komplementären DNA-Stranges findet dagegen keine Hybridisierungsreaktion statt und das mit Biotin-modifizierte 3'-Ende des MB befindet sich sehr nahe an der Goldelektrode, was eine Interaktion zwischen Biotin und dem EST2-SA-Konjugat sterisch unmöglich macht („sterisches Quenchen“).

3.1.13.4.2 Optimierung der Oberflächeneigenschaften und Hybridisierungsbedingungen des MB-Nachweissystems

3.1.13.4.2.1 Co-Immobilisierung von oligo-(dT)- und MB-Molekülen

Eine effiziente Absättigung der Elektrode mit anderen Thiol-modifizierten Molekülen neben dem MB ist entscheidend für die Funktion dieses Detektionsaufbaus, da es andernfalls zu starken Hintergrundsignalen kommt. Eine sequentielle Immobilisierung von MB und anschließender Nachsättigung der Elektrodenoberfläche mit Alkan- oder Polyethylenglykolphthiolen führte zu unzureichenden Signal/Rausch-Verhältnissen. Da einige Studien zeigten, dass die Verwendung von Blockierungsagenzien während des Selbstassemblierungsprozesses unspezifische Wechselwirkungen verhindert und die eigentliche Nukleinsäuresekundärstruktur aufrechterhält (Nicewarner, Sr. *et al.*, 2002; Du *et al.*, 2005), wurden in dieser Arbeit die MB- und oligo-(dT)-Moleküle gleichzeitig in unterschiedlichen molaren Verhältnissen immobilisiert. Anschließend erfolgte wie bereits für die anderen Nachweissysteme beschrieben eine Nachsättigung der Goldoberfläche mit Oktanthiol. Die oligo-(dT)- und Oktanthiol-Moleküle erfüllen mehrere Aufgaben. Zum einen separieren sie die MB-Moleküle voneinander und geben diesen ausreichend Raum, damit diese ihre Haarnadelstruktur ausbilden und eine Hybridisierungsreaktion eingehen können (Mao *et al.*, 2008). Die Oktanthiolmoleküle zerstören unspezifische Wechselwirkungen zwischen den Stickstoff-haltigen Nukleotidbasen und der Goldelektrode und unterbinden gleichzeitig die unspezifische Adsorption von Streptavidin an die Goldelektrode. Drittens schirmen die oligo-(dT)-Moleküle die Biotingruppe an der Oberfläche gegen eine Reaktion mit dem EST2-SA-Konjugat ab. Oktanthiol alleine ist dazu nicht in der Lage. Viertens wurde kürzlich mittels Oberflächen-verstärkter Raman-Spektroskopie gezeigt, dass oligo-(dT)-Moleküle dsDNA-Moleküle auf Goldelektroden aufrichten, d.h. sie sorgen dafür, dass DNA-Moleküle eher senkrecht auf der Goldelektrode stehen. Ebenfalls sorgt eine höhere Fängerkonzentration für eine eher senkrechte Ausrichtung der DNA-Moleküle (Barhoumi *et al.*, 2008). Deshalb erfolgte die Immobilisierung der MB-Moleküle in Gegenwart von 1 M NaCl, um eine möglichst hohe Packungsdichte der MB-Moleküle auf der Oberfläche zu generieren.

Es wurden verschiedene molare Verhältnisse von oligo-(dT)- und MB-Molekülen auf der Goldelektrode immobilisiert, mit dem komplementären DNA-Molekül hybridisiert und die Reaktion elektrochemisch analysiert. Gleichzeitig wurde für jedes Verhältnis das Hintergrundsignal ohne komplementären DNA-Analyten überprüft (Abb. 3-39).

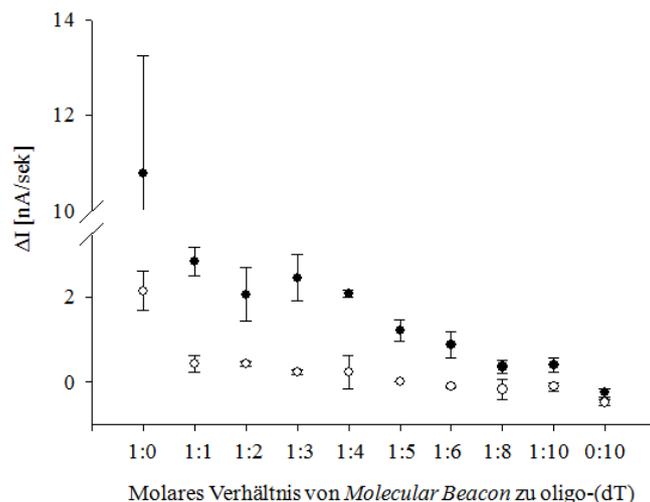


Abbildung 3-39: **Optimierung des Verhältnisses zwischen *Molecular Beacon*- und oligo-(dT)-Molekülen.** Goldelektroden wurden mit unterschiedlichen Verhältnissen an *Molecular Beacon*- und oligo-(dT)-Molekülen immobilisiert und anschließend mit (●) oder ohne (○) komplementären DNA-Strang bei 25°C für 30 Minuten hybridisiert. Nach Substratzugabe und Stoppen des Flußes wurde die Steigung des Stroms innerhalb der ersten fünf Sekunden ausgewertet.

In Gegenwart nur geringer oligo-(dT)-Konzentrationen zeigte sich ein starkes Hintergrundsignal auch ohne Analyt. Das EST2-SA-Konjugat kann zum Teil also noch das Biotin an der Goldoberfläche erreichen und eine Bindung eingehen. Andererseits führen zu hohe Konzentrationen an oligo-(dT) zu einer geringen Dichte an MB-Molekülen auf der Oberfläche und damit zu einem sehr schwachen Hybridisierungssignal in Gegenwart des Analyten. Ab einem Immobilisierungsverhältnis zwischen MB und oligo-(dT) von 1:6 ist ein starker Abfall des elektrochemischen Signals nach Hybridierung mit Analyten feststellbar. Das beste Signal/Rausch-Verhältnis ergab sich bei diesem Versuch bei einem Immobilisierungsverhältnis zwischen MB und oligo-(dT) von 1:3. Verglichen zu anderen Studien, welche Alkanthiole als Blockierungsreagenz verwendeten, ist die hier ermittelte oligo-(dT)-Konzentration relativ gering. Immobilisierungsverhältnisse von 1:5 für Mercaptopropionsäure (Mao *et al.*, 2008) bis 1:10 für 3-Mercapto-1-propanol (Du *et al.*, 2005) wurden dabei ermittelt. Jedoch sind die oligo-(dT)-Moleküle wesentlich länger und auch sterisch anspruchsvoller als die verwendeten Alkanthiole, weshalb geringere Konzentrationen für eine effiziente Blockierung der Oberfläche ausreichen.

3.1.13.4.3 Optimierung der Oberflächenbeschichtungskonzentration

Da die Konformationsänderung zwischen offenem und geschlossenem Zustand der Haarnadelschleife eine Gleichgewichtsreaktion darstellt, liegt ein gewisser Anteil an Fänger immer in der offenen, detektierbaren Konformation vor. Dies trägt zum Hintergrundsignal der Messung bei (Cederquist *et al.*, 2008). Um dieses möglichst

minimal zu halten, sollte die absolute Zahl offener Fänger so minimal wie möglich sein. Daher wurde untersucht, welche Konzentration an Fänger und an oligo-(dT) ein optimales Signal/Hintergrund-Verhältnis ergeben. Zu diesem Zweck wurde die Oberfläche mit verschiedenen Konzentrationen (0,02 μM bis 20,0 μM) des *Molecular Beacon*-Fängers belegt und eine Hybridisierung mit dem komplementären DNA-Strang (20 μM) durchgeführt. Die Resultate in Abbildung 3-40 zeigen deutlich, dass die optimale Beschichtungskonzentration für den Haarnadel-Fänger bei 2,0 μM liegt, da hier die besten Signal/Rausch-Verhältnisse erzielt wurden. Niedrigere Konzentrationen lieferten kein ausreichendes Signal bei positiven Proben, wogegen bei höheren Fänger-Konzentrationen ebenfalls nur schwache Signalwerte für positive Proben erzielt wurden. Dies liegt im ersten Fall an der geringen Fängerkonzentration, im zweiten Fall an der sehr hohen oligo-(dT)-Konzentration, die das Hintergrundsignal nahezu komplett verschwinden lässt, aber auch die absolute Zahl an Fängern auf der Elektrode stark minimiert.

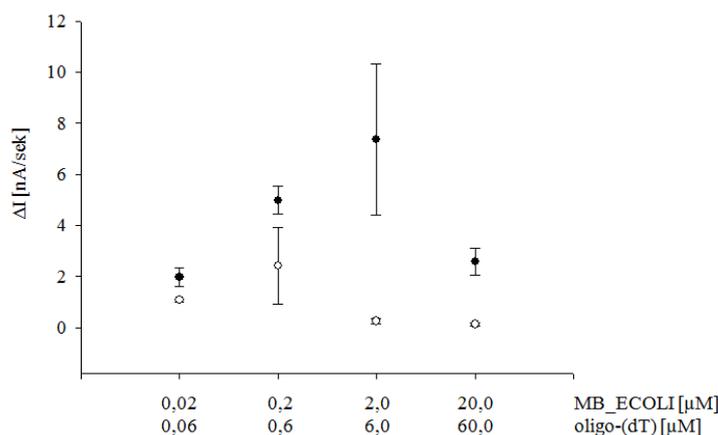


Abbildung 3-40: **Vergleich verschiedener Verhältnisse an Beschichtungskonzentrationen.** Goldelektroden wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an *Molecular Beacon*- und oligo-(dT)-Molekülen immobilisiert und anschließend mit (●) oder ohne (○) komplementären DNA-Strang bei 25°C für 30 Minuten hybridisiert. Die Konformationsänderung des *Molecular Beacon* wurde mittels EST2-SA-Konjugat elektrochemisch nachgewiesen.

3.1.13.4.4 Einfluss der Stammlänge auf das elektrochemische Hybridisierungssignal

Die Länge des Stammes ist von entscheidender Bedeutung für die Stabilität der geschlossenen Konformation von Fängern mit Haarnadelstruktur. Ein kurzer Stamm begünstigt die Hybridisierung zwischen Schleife und komplementärer DNA, führt jedoch gleichzeitig zu einer verminderten Stabilität des geschlossenen Zustandes. Dies bedingt ein höheres Hintergrundsignal, da eine größere Zahl an Fängern im offenen Zustand vorliegt. Ein längerer Stamm stabilisiert die geschlossene Konformation der Haarnadelstruktur, erschwert aber das Öffnen und somit die Hybridisierungsreaktion zwischen Schleife und Zielanalyt. Aus der Kombination beider Effekte lässt sich schlussfolgern, dass mit steigender Stammlänge sowohl das Signal als auch das

Hintergrundsignal sinken. Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, welche Stammlänge das optimale Signal/Rausch-Verhältnis erzeugt. Deshalb wurden zur Quantifizierung des Einflusses der Stammlänge auf die elektrochemische Messung vier *Molecular Beacon* mit identischen Erkennungssequenzen entworfen, die sich nur durch die Länge des Stammes unterschieden (3, 6, 9 oder 12 Nukleotide). Nach simultaner Immobilisierung der Haarnadelstrukturen mit oligo-(dT)-Molekülen auf der Goldoberfläche und Hybridisierung mit dem komplementären DNA-Strang, wurde der Einfluss der Stammlänge auf das elektrochemische Signal verglichen (Tab. 3-9).

Tabelle 3-9: **Abhängigkeit der Signalstärken mit und ohne Zielanalyt von der Stammlänge des *Molecular Beacons*.**

Stammlänge [nt]	komplementäre DNA ΔI [nA/sek]	Puffer ΔI [nA/sek]	Signal/Rausch- Verhältnis
3	19,98 \pm 2,98	16,94 \pm 2,19	1,19 \pm 0,18
6	17,52 \pm 7,08	1,40 \pm 0,99	12,51 \pm 0,22
9	8,21 \pm 0,12	0,20 \pm 0,16	65,12 \pm 13,17
12	5,18 \pm 1,56	0,19 \pm 0,04	28,57 \pm 10,77

Dabei wird deutlich, dass eine Stammlänge von drei Nukleotiden ein sehr hohes positives Signal erzeugte, jedoch war das Hintergrundsignal ebenfalls extrem hoch. Eine Haarnadelstruktur mit einem Stamm aus sechs Nukleotiden zeigte dagegen ein deutliches Signal bei Anwesenheit komplementärer DNA. Bei Hybridisierung in Anwesenheit von Puffer war das Hintergrundsignal signifikant kleiner als bei der Verwendung von Haarnadelstrukturen mit einer Stammlänge von drei Nukleotiden. Das beste Singal/Rausch-Verhältnis zeigte sich bei einer Stammlänge von neun Nukleotiden. Verlängert man den Stamm auf 12 Nukleotide ergab sich ein schlechteres Signal/Rausch-Verhältnis, da der Stamm sich in Anwesenheit des komplementären ODNs ineffizienter öffnet verglichen mit kürzeren Stammsequenzen.

3.1.13.4.5 Selektivität der DNA-Detektion

Nach Optimierung dieses elektrochemischen Haarnadelbiosensors sollte dieser im Hinblick auf Selektivität und Sensitivität charakterisiert werden. Im Gegensatz zu Lösungs-basierten MB-Systemen, zeigen immobilisierte Stamm-Schleife-Strukturen häufig eine verminderte Fehlbasenpaarungsdiskrimination, welche sich wahrscheinlich auf eine Destabilisierung des Stammes durch die Oberflächenimmobilisierung begründet (Fan *et al.*, 2003). In dieser Arbeit wurde die Selektivität mit DNA-Oligonukleotiden mit einer, zwei bzw. drei zentralen Fehlbasenpaarung(en) überprüft. Für ein ODN mit einer Fehlbasenpaarung wurde eine Signalstärke von etwa 60% verglichen mit dem Signal des perfekt komplementären ODNs erzielt (Abb. 3-41). In Anwesenheit von zwei bzw. drei Fehlbasenpaarungen beträgt das Signal lediglich etwa 20% bzw. 10% verglichen mit der Signalstärke nach Hybridisierung des

komplementären ODNs. Ein nicht-komplementäres ODN resultiert dagegen in keinem elektrochemischen Signal (Abb. 3-41). Im Gegensatz zu linearen Fängerproben zeigt sich bei diesem Detektionsprinzip eine leicht verminderte Selektivität (s. Kapitel 3.3.3.2), die vermutlich auf die geringe Stabilität der Stammstruktur zurückzuführen ist (Lai *et al.*, 2006).

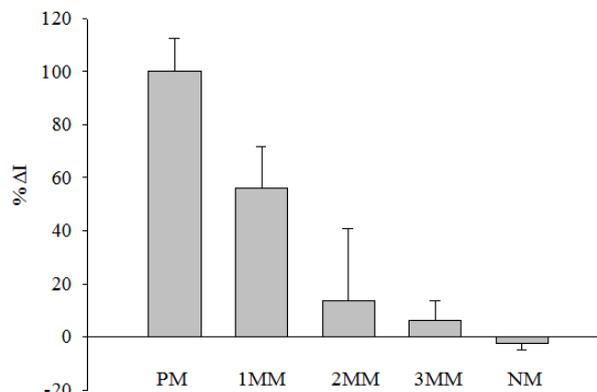


Abbildung 3-41: **Selektivität des elektrochemischen *Molecular Beacon*-Biosensors.** Die immobilisierte Stamm-Schleife-Struktur wurde in Gegenwart von 200 nM perfekt komplementären (PM) bzw. 200 nM ODNs mit einem (1MM), zwei (2MM) oder drei (3MM) Fehlbasenpaarungen für 30 min bei 37°C hybridisiert und die Konformationsänderung anschließend mittels EST2-SA-Konjugat detektiert.

3.1.13.4.6 Sensitivität der DNA-Detektion

Die Bestimmung der Sensitivität des elektrochemischen MB-Biosensors erfolgte durch Hybridisierung unterschiedlicher Konzentrationen an zur Schleife komplementären ODNs. Dabei zeigte sich eine Zunahme des Signals in Abhängigkeit von der Konzentration des komplementären ODNs. Die Nachweisgrenze betrug hier 200 pM DNA-ODN. 20 pM ODN konnten bereits nicht mehr detektiert werden (Abb. 3-42).

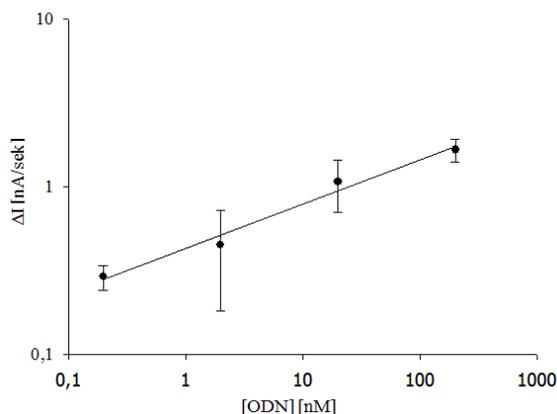


Abbildung 3-42: **Sensitivität des elektrochemischen *Molecular Beacon*-Biosensors.** Unterschiedliche Konzentrationen perfekt komplementärer DNA-Stränge wurden in Gegenwart der immobilisierten Stamm-Schleife-Struktur für 30 min bei 25°C hybridisiert und die Konformationsänderung der Haarnadelstruktur durch Anbindung des EST2-SA-Konjugats an das zugängliche Biotin gemessen. Die Linearität R^2 beträgt 0,98.

Andere in der Literatur beschriebene Stamm-Schleife-Biosensoren zeigen Nachweisgrenzen zwischen 0,4 fM und 10 nM (Liu *et al.*, 2008a). Für die Fluoreszenz-basierte Detektion der Öffnung einer immobilisierten Stammstruktur wurden Nachweisgrenzen von 10 nM und 1 nM berichtet (Du *et al.*, 2003; Du *et al.*, 2005). Dagegen weisen die auf elektrochemischer Detektion und Enzym-Amplifikation (Meerrettich-Peroxidase) basierten Biosensoren Nachweisgrenzen zwischen 100 pM (Mao *et al.*, 2008) und 0,4 fM auf (Wei *et al.*, 2008)

3.1.13.4.7 Nachweis bakterieller 16S rRNA mittels *Molecular Beacon*-Biosensor

Die Bestimmung der Sensitivität mit komplementären DNA-ODNs ist ein Modell, um das Sensorsystem einfach zu evaluieren. In der Praxis ist jedoch die Detektion von PCR-Produkten (Liu *et al.*, 2008a) oder 16S rRNA (Bockisch *et al.*, 2005) relevant.

Wie bereits erwähnt ist für die Detektion ribosomaler RNA die Auflösung der Tertiärstruktur ein essentieller Schritt (s. Kapitel 3.1.5 & 3.1.6). Da der zu detektierende Bereich im Falle des *Molecular Beacon*-Ansatzes nur 29 nt beträgt, wurde erneut die Fragmentierungszeit der Gesamt-RNA bei 95°C optimiert.

Dazu wurden 0,6 µg Gesamt-RNA für 0 bis 45 Minuten fragmentiert und mit dem immobilisierten *Molecular Beacon* detektiert. Als Negativkontrolle wurde Hybridisierungspuffer verwendet. Die Messergebnisse in Abbildung 3-43 zeigen, dass sich bereits nach 2,5 bis 5 min Fragmentierung ein deutliches Signal ergab. Eine Fragmentierungszeit von 15 min resultierte im optimalen Biochip-Signal. Eine weitere Verlängerung der Fragmentierung auf 30 oder 45 min brachte einen starken Abfall des Signals mit sich, da die RNA-Fragmente zu kurz sind, um noch effizient zu hybridisieren und somit ein Öffnen der Stamm-Schleife-Struktur erreichen zu können.

Das Nachweissystem sollte weiterhin in Hinblick auf die Nachweisgrenze für bakterielle 16S rRNA charakterisiert werden. Dazu wurde aus 10^8 KbE *E. coli* Gesamt-RNA isoliert und verschiedene Verdünnungen mit dem elektrochemischen MB-Biosensor vermessen (Abb. 3-44). Dabei zeigte sich, dass eine Nachweisgrenze von 2,5 ng Gesamt-RNA erzielt werden konnte. Dies entspricht etwa 5×10^4 KbE *E. coli* (Curtiss *et al.*, 1996).

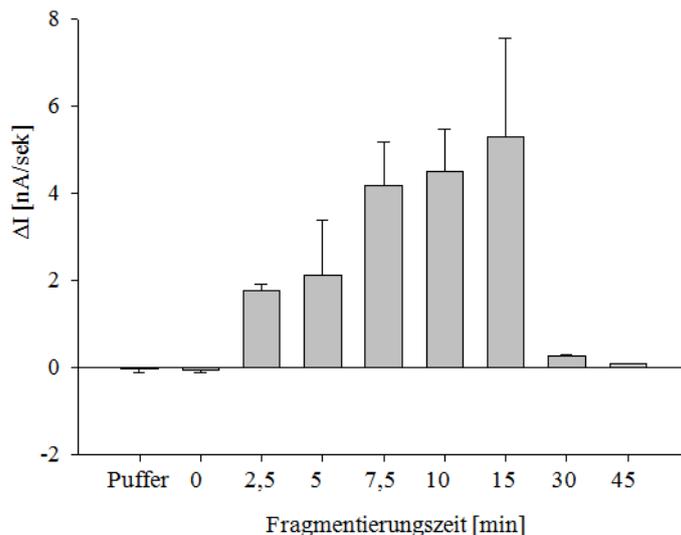


Abbildung 3-43: **Optimierung der Fragmentierungszeit.** Vergleich der Detektion fragmentierter RNA in Abhängigkeit von der Fragmentierungszeit. Nach Hybridisierung der fragmentierten RNA in Gegenwart der Oberflächen-immobilisierten Stamm-Schleife-Struktur wurde die Konformationsänderung des *Molecular Beacons* durch Anbindung des EST2-SA-Konjugats an das zugängliche Biotin detektiert.

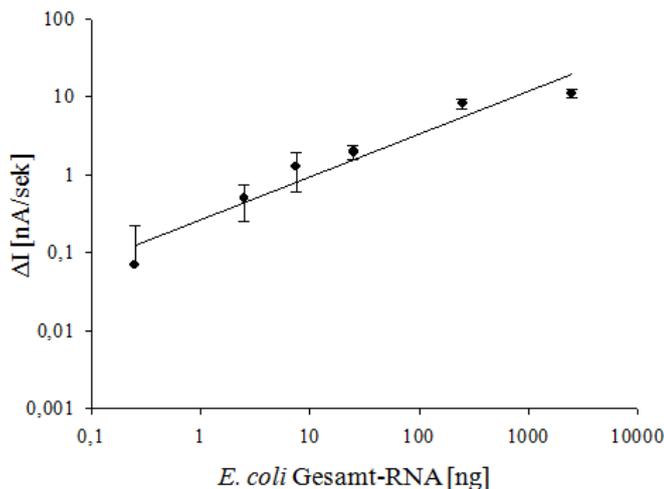


Abbildung 3-44: **Sensitivität der elektrochemischen Detektion von *E. coli* 16S rRNA mittels *Molecular Beacon*-Biosensor.** Unterschiedliche Konzentrationen an Gesamt-RNA aus *E. coli* wurden in Gegenwart von immobilisiertem *Molecular Beacon* hybridisiert und die Konformationsänderung durch Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung detektiert. Die horizontale Linie zeigt die Nachweisgrenze (Blank + 3 x Standardabweichung) an.

3.2 Detektion von microRNA bzw. mRNA mittels Lückenhybridisierung

Aktuell gibt es einen enormen Bedarf nach schnellen und sensitiven Nachweismethoden für microRNAs (miRNAs), da diese als Krebs-Biomarker dienen (Waldman & Terzic 2009). Deshalb sollte in dieser Arbeit eine elektrochemische Nachweismethode für die Detektion von miRNAs entwickelt werden.

3.2.1 Elektrochemische Detektion von miRNAs mittels Lückenhybridisierung

Das Prinzip der miRNA-Detektion ist in Abbildung 3-45 dargestellt. Grundlage dabei ist die Schaffung einer durchgehenden Basenstapelung zwischen Fänger-ODN, miRNA, EST2-ODN-Konjugat und komplementärer, synthetischer RNA-Sonde. In Anwesenheit der miRNA wird die EST2 in die Nähe einer bestimmten Goldelektrode gebracht und ihre katalytische Aktivität generiert elektrochemisch aktives Produkt (pAP). Weiterhin kommt es auch hier zu einer Signalverstärkung durch den *Redox-Recycling*-Prozess (s. Abschnitt 3.1.1). Dagegen destabilisiert in Abwesenheit der miRNA eine 22 nt große Lücke die Hybridisierung zwischen den oben genannten ODNs, weshalb kein elektrochemisches Signal detektierbar ist.

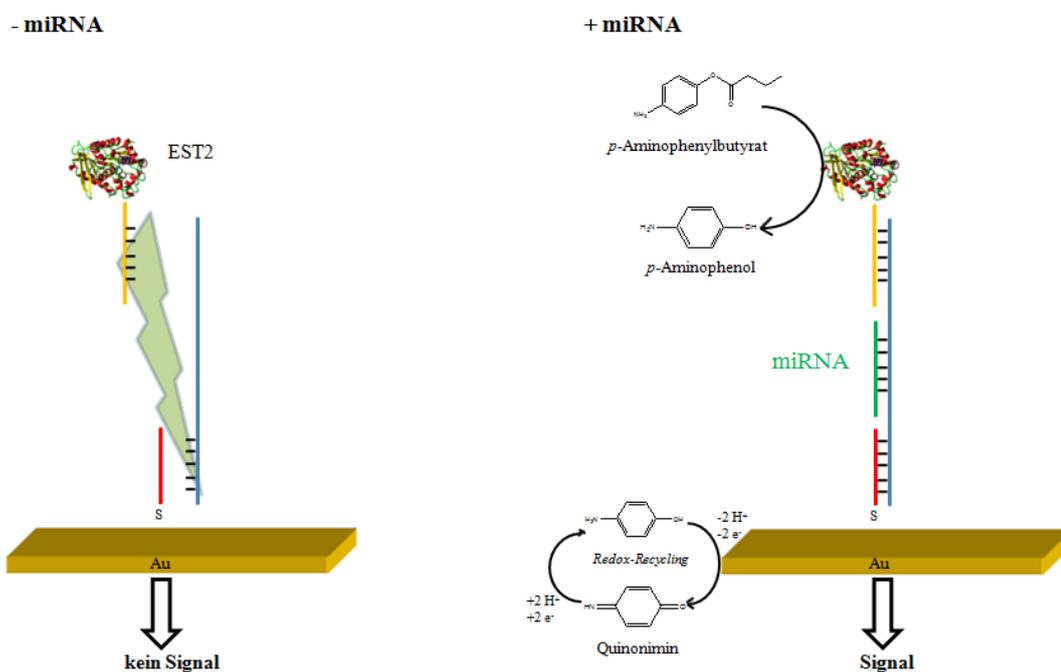


Abbildung 3-45: **Elektrochemische Detektion der Lückenhybridisierung zwischen immobilisierten Fänger-ODN (rot), miRNA (grün), EST2-ODN-Konjugat (gelb) und komplementärer RNA-Sonde (blau).** Links dargestellt ist der instabile Hybridisierungskomplex in Abwesenheit der miRNA, rechts das stabile Vier-Komponenten-Sandwich-Hybridisierungsergebnis.

Um dieses Nachweissystem zu testen, wurde mit synthetischer miRNA gearbeitet. Die Präparation der komplementären RNA-Sonde erfolgte durch *in vitro*-Transkription eines zuvor erzeugten PCR-Produkts. Fänger-ODNs spezifisch für die komplementäre Sonde zur miR-16 wurden auf drei Elektroden eines Biochips aufgebracht, während eine Elektrode ohne Fänger belassen wurde. Danach wurden alle Elektroden mit Oktanthiol behandelt, um unspezifisch gebundene Fänger-ODNs zu entfernen bzw. unspezifische Bindung von Proteinen oder Nukleinsäure auf der Goldelektrode zu unterbinden. Die Hybridisierung zwischen den Komponenten erfolgte in Ab- bzw. Anwesenheit von miR-16 (Abb. 3-46). Ohne miRNA zeigten alle Elektroden mit Fänger-ODNs und die Elektrode ohne Fänger lediglich ein Hintergrundsignal (Abb. 3-46 A). In Anwesenheit

von miR-16 produzierten alle drei mit Fänger besetzten Elektroden ein signifikantes elektrochemisches Signal nach Stoppen des Substratflusses (Abb. 3-46 B). Unspezifische Bindung des EST2-ODN-Konjugats an die Goldelektrode konnte ausgeschlossen werden, da die blanke Goldelektrode kein elektrochemisches Signal generierte. Dieses Ergebnis bestätigte die vorher angestellte Beobachtung, dass eine nicht-perfekte Basenstapelung zwischen Fänger-, Helfer-, Detektor-ODN und 16S rRNA einen dramatischen Signalverlust mit sich bringt (s. Abschnitt 3.1.6) (Liao *et al.*, 2006; Pioch *et al.*, 2008a).

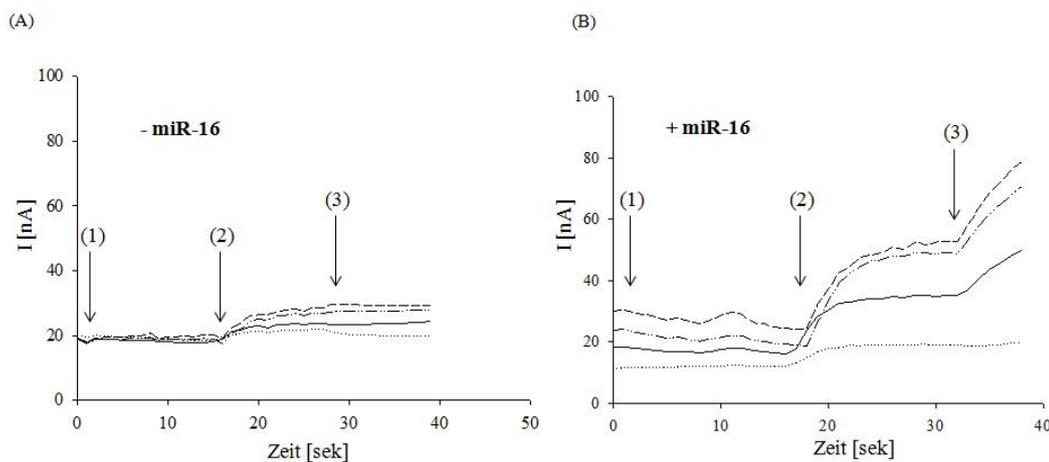


Abbildung 3-46: **Elektrochemische Detektion von 0 nM (A) und 200 nM miR-16 (B) mittels Lückenhybridisierung.** Auf drei Elektroden wurde miR-16-Fänger-ODN immobilisiert (---, —, - · -), während eine Elektrode nur mit Oktanthiol behandelt wurde (BLANK, ···). Der Verlauf des Stroms I gegen die Zeit ist dargestellt. Anfangs floß Puffer zur Stabilisierung der Strombasislinie durch die Hybridisierungskammer (1), gefolgt von der Zugabe von 2 mM Substratlösung (2). Nachdem ein Plateau des Stroms erreicht wurde, wurde der Substratfluss gestoppt und der Anstieg des Stroms in den ersten fünf Sekunden wurde gemessen (3).

Die Spezifität der Lückenhybridisierung wurde mit drei synthetischen miRNA-Sequenzen getestet (miR-15, miR-16 und miR-21). miR-15 und miR-16 sind sehr nah verwandte miRNAs, deren Deletion chronisch-lymphatische Leukämie vom B-Zelltyp zur Folge hat (Calin & Croce 2006). miR-21 ist in vielen Tumoren überexprimiert (Esquela-Kerscher & Slack 2006) und trägt zu Myokardkrankheiten bei (Thum *et al.*, 2008). Der Sequenzvergleich zwischen diesen drei miRNAs zeigte eine große Ähnlichkeit der 5'-Bereiche (*seeding region*) von miR-15 und miR-16. Da miR-15 und miR-16 dieselben mRNA-Zielstrukturen besitzen, muss ihr 5'-Bereich zwangsläufig sehr ähnlich sein. Jedoch unterscheiden sich die Sequenzen in der 3'-Region. miR-21 dagegen weist sowohl im 5'- als auch im 3'-Bereich eine deutlich andere Sequenz auf (Abb. 3-47 A). Verschiedene Mischungen von je 200 nM miR-15, miR-16 bzw. miR-21 wurden zur Hybridisierung auf einem Biochip mit immobilisierten Fänger-ODNs spezifisch für miR-16 verwendet. In Abwesenheit aller miRNAs ergab sich – wie schon bereits gezeigt – kein elektrochemisches Signal. Die Anwesenheit von miR-15, miR-21

oder einer Mischung aus diesen ergab ebenfalls kein signifikantes Messsignal. Somit gab es keine Kreuz-Hybridisierung zwischen miR-15 oder miR-21 und der miR-16 komplementären RNA-Sonde. In Gegenwart von miR-16 und einer oder beider anderen miRNAs wurde jeweils ein relativ reproduzierbares Messsignal im Vergleich zur alleinigen Anwesenheit von miR-16 generiert (Abb. 3-47 B). Folglich konnte auch in einer Mischung verschiedener miRNAs eine spezifische Detektion von miR-16 erreicht werden.

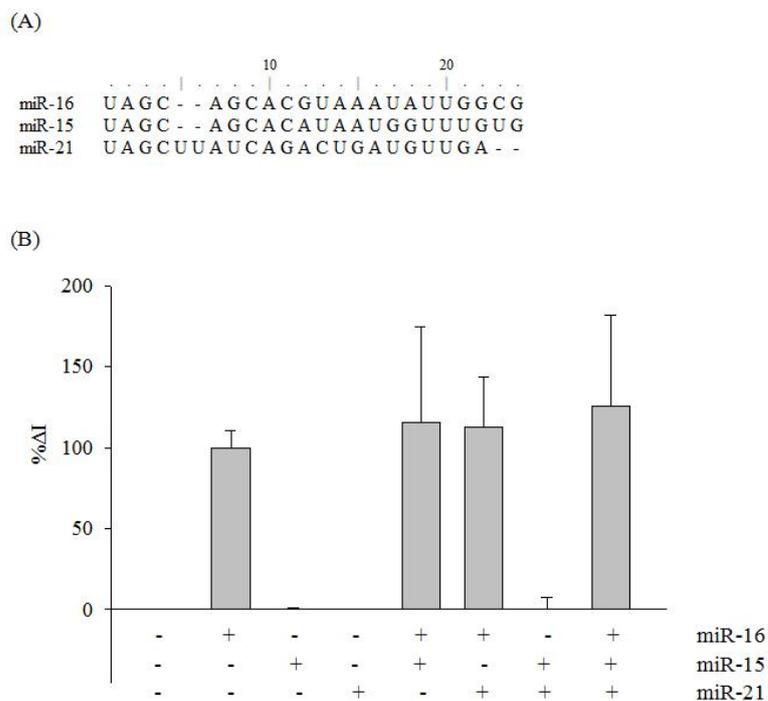


Abbildung 3-47: **Selektivität der miRNA-Detektion mittels Lückenhybridisierung.** (A) Sequenzvergleich der drei getesteten miRNAs. (B) Elektrochemische Signale der miR-16-Detektion nach Hybridisierung mit verschiedenen Mischungen von miRNAs. 200 nM je miRNA wurden für den Lückenhybridisierungsnachweis eingesetzt. Das elektrochemische Messsignal nach Hybridisierung mit 200 nM miR-16 wurde als 100% definiert.

Inwieweit der Lückenhybridisierungsnachweis zur Differenzierung von einzelnen Fehlbasenpaarungen geeignet ist, wurde mit synthetischen miRNAs mit terminalen bzw. zentralen Fehlbasenpaarungen getestet. Terminale Fehlbasenpaarungen führten zu einem Signalabfall auf etwa 20% im Vergleich zur korrekten miR-16-Sequenz (100%). Dagegen zeigte eine miRNA mit zentraler Fehlbasenpaarung ein Hybridisierungssignal von etwa 50% verglichen mit der korrekten miR-16-Sequenz (Abb. 3-48). Die terminalen Fehlbasenpaarungen sorgten für eine stärkere Störung der hydrophoben Basenstapelung als die zentrale Fehlbasenpaarung. Die Detektion von miRNAs kann durch die Anwesenheit von prä-miRNAs, die ebenfalls die miRNA-Sequenz aufweisen, beeinflusst werden. Deshalb wurde die miR-16-Sequenz entweder am 5'- oder am 3'-Ende um 5 nt verlängert und die Effizienz der Lückenhybridisierung untersucht. Verglichen mit der Hybridisierung von miR-16 ergab sich ein elektrochemisches Signal

von etwa 40% (Abb. 3-48). Die Verlängerung der miRNAs resultierte in einer thermodynamisch stabileren Sekundärstruktur, welche zu einer geringeren Hybridisierungseffizienz führte (Shchepinov *et al.*, 1997).

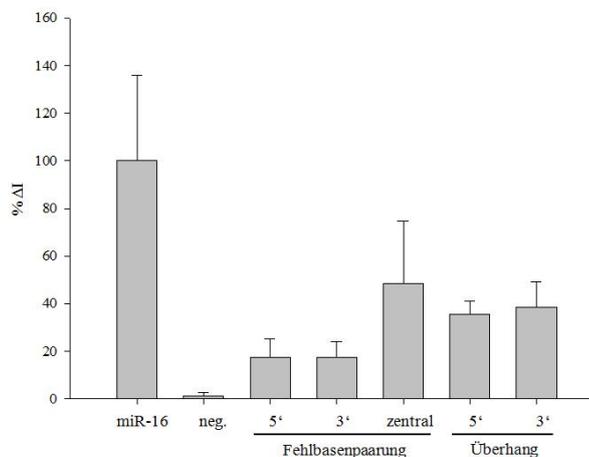


Abbildung 3-48: **Elektrochemische Detektion von miR-16, miR-16 mit einer terminalen bzw. zentralen Fehlbasenpaarung und miR-16 mit Überhängen am 5'- oder 3'-Terminus.** 200 nM jeder miRNA wurden für den Lückenhybridisierungsnachweis verwendet. Das elektrochemische Messsignal nach Hybridisierung mit 200 nM miR-16 wurde als 100% definiert.

Das perfekte Einpassen der miRNA in die Lücke zwischen Fänger- und Detektor-ODN beeinflusste die Hybridisierung der miRNA. Am 5'-Terminus phosphorylierte miRNA ergab ein etwas höheres Signal ($2,88 \pm 0,50$ nA/sek) als unphosphorylierte miRNA ($2,23 \pm 0,46$ nA/sek). Dies bestätigte, dass das 5' phosphorylierte Ende der miRNA zur Stabilisierung der DNA/RNA-Assoziation beiträgt. Ähnliche Stabilisierungseffekte wurden bereits für DNA/DNA-Wechselwirkungen beobachtet, bei denen eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der 3'-Hydroxylgruppe und der 5'-Phosphatgruppe an der Bruchstelle ausgebildet wurde (Aymami *et al.*, 1990).

Die Sensitivität des miRNA-Nachweises mittels Lückenhybridisierung wurde mit verschiedenen Verdünnungen synthetischer miRNA ermittelt (Abb. 3-49). Es ergab sich eine lineare Korrelation zwischen elektrochemischen Signal und miRNA-Konzentration im Bereich von 200 – 0,002 nM miR-16. Das Detektionslimit für miR-16 betrug 2,0 pM, was einer Stoffmenge von 2,0 attomol entspricht (Abb. 3-49). Das Detektionslimit wurde als die Konzentration festgelegt, welche einen Signalwert über dem Mittelwert-Signal mit 0 nM miR-16 ($-0,02$ nA/sek) zuzüglich dreimal der Standardabweichung dieses Wertes ($0,02$ nA/sek) aufwies.

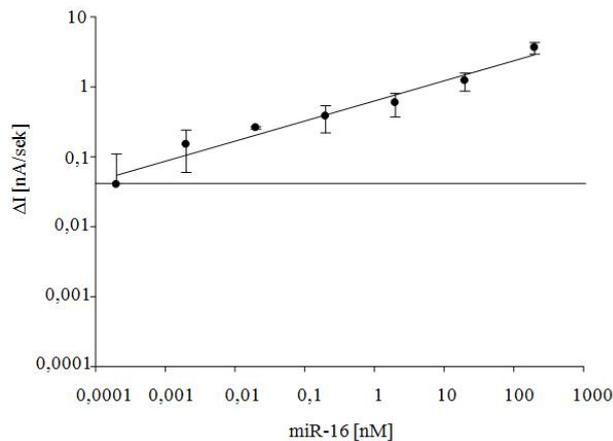


Abbildung 3-49: **Sensitivität der elektrochemischen miR-16-Detektion mittels Lückenhybridisierung.** Die Linearität R^2 beträgt 0,97. Die horizontale Linie zeigt die Nachweisgrenze (Blank + 3 x Standardabweichung) an.

Neben der hohen Sensitivität zeichnet sich diese miRNA-Detektionsmethode durch ihre Schnelligkeit aus, da Hybridisierung und Reporterenzym-Anbindung in einem Schritt geschehen. Weiterhin ist kein zusätzlicher Markierungsschritt der miRNA oder die Verwendung von LNAs als Fängersonden nötig (Castoldi *et al.*, 2006).

Um das Nachweissystem an Realproben zu testen, wurde RNA aus der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 verwendet. Dabei wurde zum einen die Gesamt-RNA isoliert, zum anderen angereicherte Fraktionen mit RNA > 200 nt bzw. < 200 nt Länge. Die Integrität und Effizienz der Trennung von nieder- und hochmolekularen RNAs wurde mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese überprüft (Abb. 3-50 A). Die unterschiedlichen RNA-Proben wurden auf einem Biochip mit immobilisiertem Fänger-ODN spezifisch für miR-16 mittels Lückenhybridisierung analysiert. Als Negativ-Kontrolle wurde eine Probe ohne RNA verwendet, die kein elektrochemisches Signal generierte (Abb. 3-50 B). Nach Hybridisierung mit der Gesamt-RNA bzw. mit der niedermolekularen RNA-Fraktion aus MCF-7-Zellen ergab sich ein signifikantes Biochip-Signal. Auffällig war, dass auch in Anwesenheit der Gesamt-RNA das Signal spezifisch für miR-16 nahezu identisch zu dem Signal für die niedermolekulare RNA-Fraktion war. Der Überschuss an anderen RNA-Molekülen übte somit keinen Einfluss auf die Hybridisierungskinetik oder -spezifität aus. Dagegen resultierte die Verwendung der hochmolekularen RNA-Fraktion in keinem elektrochemischen Messsignal.

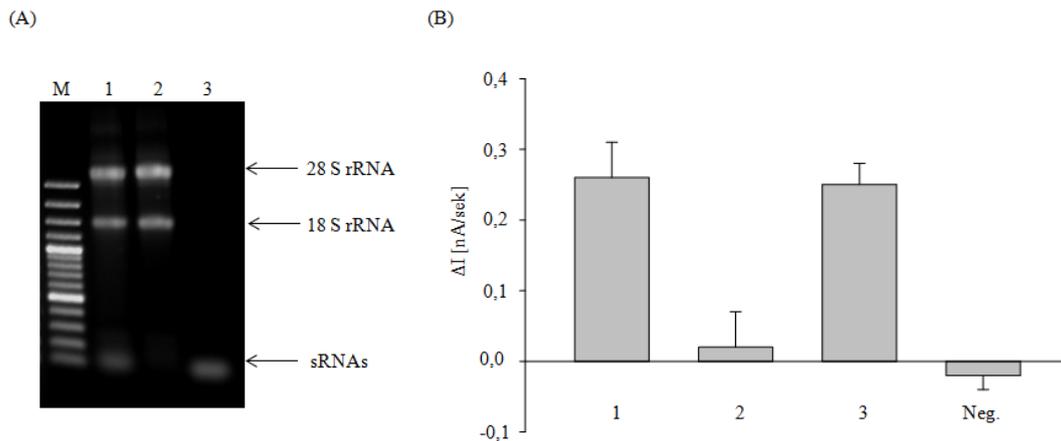


Abbildung 3-50: **Elektrochemische Detektion von miR-16 isoliert aus MCF-7-Zellen.** (A) 1,2% Agarose-Gelelektrophorese von isolierter Gesamt-RNA (Bahn 1), einer hochmolekularen RNA-Fraktion (Bahn 2) oder niedermolekularen RNA-Fraktion (Bahn 3). Zur Orientierung ist ein DNA-Größenstandard (M) angegeben. (B) Elektrochemische Signale der in (A) dargestellten Fractionen bestimmt mittels Lückenhybridisierung. Als Negativ-Kontrolle (Neg.) ist das Hybridisierungssignal lediglich mit Puffer dargestellt.

Der Aufbau des Lückenhybridisierungsnachweissystems mit synthetischen Fänger-ODNs und komplementären RNA-Sonden ermöglichte den Aufbau so genannter adressierbarer Biochips (Schröder *et al.*, 2009). Weiterhin wurde nur ein universelles EST2-ODN-Konjugat verwendet, welches die Detektion von miRNAs in einem Schritt erlaubte. Dies gestattet die Multiplex-Detektion mehrerer miRNAs aus einer Probe. Dazu wurde ein Biochip mit Fänger-Sonden spezifisch für miR-10a, miR-16 und miR-21 immobilisiert. Eine Elektrode wurde ohne Fänger belassen und alle Elektroden anschließend mit Oktanthiol behandelt. Nach Hybridisierung der Gesamt-RNA aus MCF-7-Zellen ergab die blanke Goldelektrode und die Elektrode mit Fängern spezifisch für miR-10a kein bzw. ein geringes Hintergrundsignal ($-0,01 \pm 0,03$ nA/sek bzw. $0,01 \pm 0,03$ nA/sek). Die Elektroden mit Fängern für miR-16 bzw. miR-21 jedoch generierten ein deutliches elektrochemisches Signal ($0,38 \pm 0,08$ nA/sek bzw. $0,80 \pm 0,21$ nA/sek). Aus den Messsignalen geht hervor, dass miR-21 in MCF-7-Zellen höher exprimiert vorliegt als miR-16. Dagegen wird miR-10a in MCF-7-Zellen nicht oder nur in nicht-detektierbaren Mengen exprimiert. Echtzeit-PCR-Expressionsanalyse von prä-miRNAs in MCF-7-Zellen ergaben ein ähnliches Muster, bei dem miR-21 als hochexprimierte miRNA, miR-16 dagegen als durchschnittlich exprimierte miRNA in MCF-7-Zellen eingestuft wurden. Eine Expression von miR-10a konnte in MCF-7 nicht detektiert werden (Jiang *et al.*, 2005).

3.2.2 Elektrochemische Detektion von mRNAs mittels Lückenhybridisierung

Die Detektion von medizinisch relevanten *messenger RNAs* (mRNAs) spielt in der diagnostischen Forschung eine wichtige Rolle. Auch in der Grundlagenforschung gibt es Bedarf an einer einfachen Methode zur Analyse von mRNA-Expressionsmustern in Zellen oder Geweben (Ross *et al.*, 2009). Inwieweit die Methode der Lückenhybridisierung für die mRNA-Detektion anwendbar ist, sollte am Beispiel der Expressionsanalyse der *groEL*- bzw. *tufA*-mRNA in *E. coli* nach Hitzeschock untersucht werden. Das *groEL*-Gen codiert für das GroEL-Protein, ein Hitze-Schock-Protein der Hsp60-Familie (Lindquist & Craig 1988). Das *tufA*-Gen codiert für den bakteriellen Elongationsfaktor EF-Tu (Jaskunas *et al.*, 1975; van der Meide *et al.*, 1983). Dabei wurde *E. coli* bis zu einer Zellzahl von 5×10^8 KBE kultiviert und für 10 min bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt. Parallel wurde eine Kultur als Kontrolle für 10 min bei 37°C inkubiert. Aufgrund der Länge der mRNAs und der daraus resultierenden abnehmenden Hybridisierungseffizienz erfolgte eine 15-minütige Fragmentierung der RNA in etwa 25 – 50 nt große Bruchstücke. Diese fragmentierte RNA wurde anschließend für den Lückenhybridisierungsnachweis auf einem Biochip mit Fängern spezifisch für *groEL*- bzw. *tufA*-mRNA eingesetzt. Als Negativ-Kontrollen enthielt der Biochip eine Elektrode ohne Fänger und eine Elektrode mit einem nicht-komplementären Fänger (Abb. 3-51 A). *GroEL*-mRNA war nur mit RNA aus *E. coli* nach Hitzeschockbehandlung nachweisbar. Dagegen war *tufA*-mRNA sowohl in *E. coli* ohne und mit Hitzeschockbehandlung detektierbar. Die Negativ-Kontrollen zeigten in keinem Fall ein elektrochemisches Signal (Abb. 3-51 A). Die mRNA-Expression wurde mittels Northern Blot-Analyse überprüft. Eine selektive Expression der *groEL*-mRNA in *E. coli*-Zellen nach Hitzeschock war auch hier nachweisbar und bestätigte die elektrochemischen Messungen. *tufA*-mRNA konnte sowohl in *E. coli* ohne und mit Hitzeschockbehandlung detektiert werden (Abb. 3-51 B).

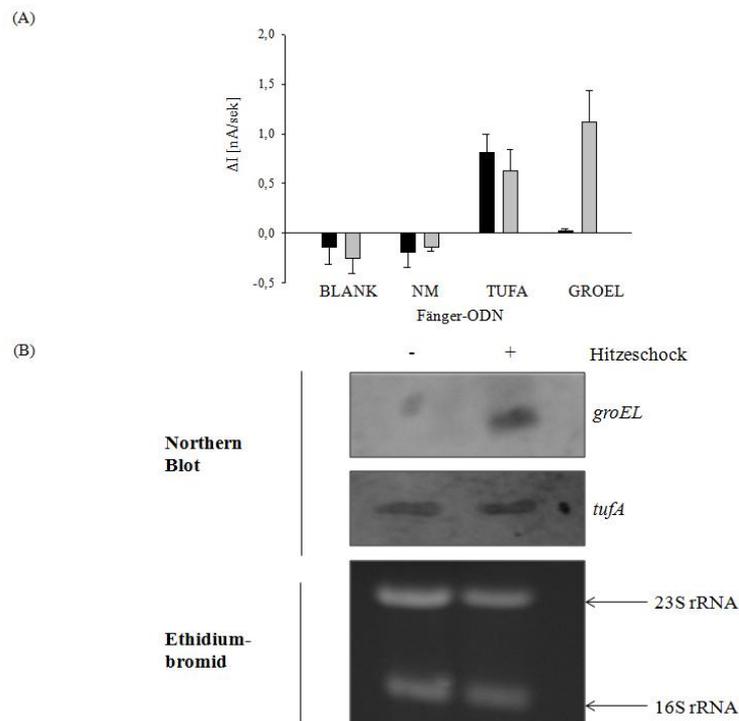


Abbildung 3-51: **Expressionsanalyse der *groEL*- und *tufA*-mRNA in *E. coli*-Zellen mit bzw. ohne Hitzeschock.** (A) 5×10^8 KfE *E. coli* wurden einem zehnmütigen Hitzeschock bei 42°C (graue Balken) unterzogen oder für 10 min bei 37°C inkubiert (schwarze Balken). Aus den Bakterienzellen wurde die RNA präpariert und mittels Lückenhybridisierung die *groEL*- und *tufA*-mRNA elektrochemisch detektiert. Als Fänger wurden ODNs spezifisch für *tufA*-mRNA (TUFA), für *groEL*-mRNA (GROEL) bzw. nicht-komplementärer Fänger (NM) immobilisiert. Eine Elektrode wurde ohne Fänger belassen. (B) 5×10^8 KfE *E. coli* wurden einem zehnmütigen Hitzeschock bei 42°C unterzogen oder für 10 min bei 37°C inkubiert. Aus den Bakterienzellen wurde die RNA präpariert und auf denaturierenden Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Es schloss sich eine Northern Blot-Analyse mit spezifischen Sonden gegen *groEL* (oben) und *tufA* (unten) an. Als Ladekontrolle diente die unter UV-Licht detektierte 23S und 16S rRNA.

Die Methode wurde weiterhin zur Untersuchung der mRNA-Expressionsmuster von Securin und Separase in den Kolonkarzinomzellen HCT116 bzw. HCT116 *hSecurin*^{-/-} angewandt. Die Chromosomensegregation während der Mitose und Meiose wird von einer Protease, der so genannten Separase, gesteuert. Unter anderem wird dieser Prozess von dem Anaphase-Inhibitor Securin reguliert (Stemmann *et al.*, 2006; Vogt *et al.*, 2008). Nach Gesamt-RNA-Isolation aus etwa 1×10^6 HCT116- bzw. HCT116 *hSecurin*^{-/-}-Zellen wurde diese auf einem Biochip mit Fänger spezifisch für *Securin*- bzw. *Separase*-mRNA hybridisiert. Als Negativ-Kontrollen enthielt der Biochip eine Elektrode ohne Fänger und eine Elektrode mit einem nicht-komplementären Fänger (Abb. 3-53). *Securin*-mRNA war nur mit RNA aus HCT116-Zellen detektierbar. Bei den HCT116 *hSecurin*^{-/-}-Zellen wurde das *Securin*-Gen deletiert, weswegen auch keine *Securin*-mRNA in diesen Zellen gebildet werden kann (Jallepalli *et al.*, 2001). Dagegen zeigte der elektrochemische Biochip keinen Unterschied in der Anwesenheit an *Separase*-mRNA in beiden Zelllinien an (Abb. 3-52). Dies deutet darauf hin, dass die

Deletion des *Securin*-Gens keinen Einfluss auf die Expression der *Separase*-mRNA ausübt.

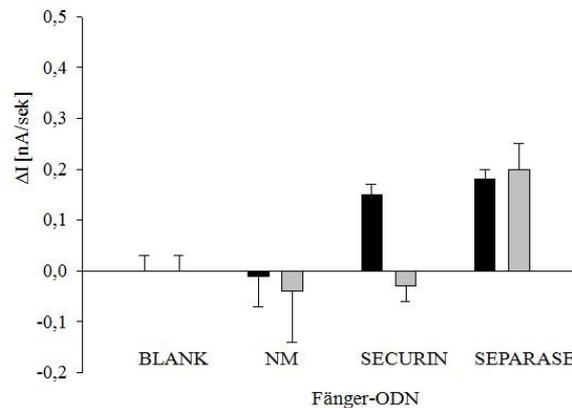


Abbildung 3-52: **Expressionsanalyse der *Securin*- und *Separase*-mRNA in HCT116- (schwarze Balken) bzw. HCT116 *hSecurin*^{-/-}-Zellen (graue Balken).** Nach RNA-Isolation aus 1×10^6 HCT116- bzw. HCT116 *hSecurin*^{-/-}-Zellen erfolgte die elektrochemische Detektion der *Securin*- und *Separase*-mRNA mittels Lückenhybridisierung. Als Fänger wurden ODNs spezifisch für *Securin*-mRNA (SECURIN), für *Separase*-mRNA (SEPARASE) bzw. nicht-komplementärer Fänger (NM) immobilisiert. Eine Elektrode wurde ohne Fänger belassen (BLANK).

3.3 Signalamplifikationsstrategien

Grundsätzlich bieten sich folgende zwei Möglichkeiten der Signalamplifikation an:

- Vermehrung des Hybridisierungsmaterials und
- Verstärkung des Signals.

3.3.1 PCR-Amplifikation

Die PCR bietet eine schnelle Möglichkeit die gewünschte Zielnukleinsäure im Probenmaterial zu vermehren. Nach PCR-Amplifikation des gewünschten genomischen Bereichs kommt es zur Hybridisierung des PCR-Amplikons mit dem immobilisierten Fänger und dem EST2-ODN-Reporterkonjugat (Abb. 3-53 A). Dies erlaubt die Detektion von genomischen Bereichen, die die Identifizierung von Mikroorganismen erlauben, z. B. von Virulenz-, Toxin- oder anderen Markergenen. Ein solches Markergen ist die β -Glucuronidase aus *E. coli*, welche durch das *uidA*-Gen kodiert wird (McDaniels *et al.*, 1996). Innerhalb des *uidA*-Gens wurde ein 116 bp großes Fragment mittels PCR amplifiziert (Abb. 3-53 B) und anschließend auf einem Biochip mit Sonden komplementär zu einem Teil des Amplikons appliziert.

Eine Denaturierung des doppelsträngigen Amplikons ist für eine effiziente Hybridisierungsreaktion zwischen Fänger-ODN, PCR-Produkt und EST2-ODN-Reporterkonjugat entscheidend (Wojciechowski *et al.*, 1999). In dieser Arbeit erfolgte die Amplifizierung eines Abschnitts des *uidA*-Gens zum einen in Gegenwart der beiden Primer, welche als Helfer-ODNs fungierten und somit die schnelle Reassoziierung der

beiden Einzelstränge verhindern sollten. Zum anderen wurde der entsprechende Genabschnitt durch asymmetrische PCR amplifiziert, d.h. ein Primer liegt im Überschuss vor und erzeugt den gewünschten Einzelstrang in einer linearen Amplifikationsreaktion (Abb. 3-53 B). Vor der Hybridisierung auf dem Biochip wurde sowohl mit dem Produkt aus der symmetrischen als auch aus der asymmetrischen PCR ein thermischer Denaturierungsschritt durchgeführt (95°C, 5 Minuten).

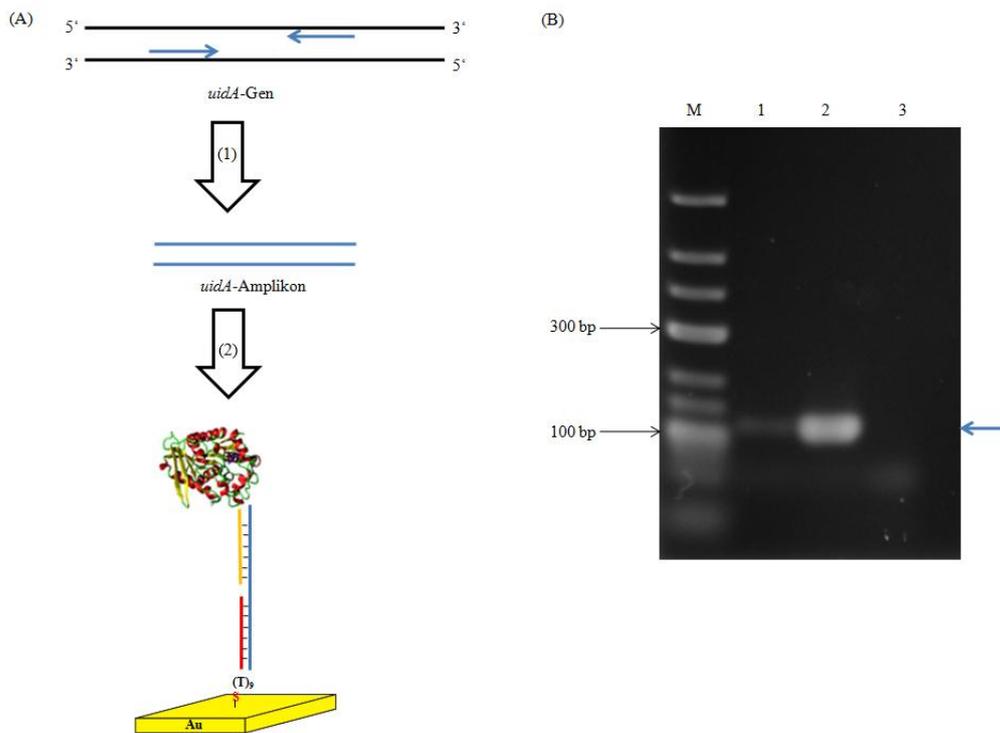


Abbildung 3-53: Detektion von PCR-Produkten zur Bakterienidentifikation mittels immobilisierter Fänger und EST2-ODN-Konjugaten auf einem elektrochemisch-auslesbaren Biochip. (A) Prinzip der elektrochemischen PCR-Produkt-Detektion. Im ersten Schritt wird der entsprechende Bereich der genomischen DNA (hier *uidA*-Gen) mittels PCR amplifiziert (1). Im zweiten Schritt erfolgte die Drei-Komponenten-Sandwich-Hybridisierung zwischen immobilisierten Fänger-ODN, EST2-ODN-Konjugat und denaturiertem PCR-Produkt (2). (B) 2%ige Agarose-Gelelektrophorese nach PCR-Amplifikation genomischer DNA aus *E. coli* mit dem Primerpaar *uidA_for* und *uidA_rev*. Bahn 1 zeigt das gebildete Amplikon nach asymmetrischer PCR (*uidA_rev* im 50-fachen Unterschuss im Vergleich zu *uidA_for*). Auf Bahn 2 ist die symmetrische PCR-Reaktion aufgetragen, während Bahn 3 eine PCR-Reaktion ohne genomisches Templat zeigt. Zur Orientierung ist ein DNA-Größenstandard (M) aufgetragen und die Banden mit 100 und 300 bp sind gekennzeichnet. Das gewünschte PCR-Produkt ist mit einem blauen Pfeil markiert.

Weiterhin wurde ein dritter Ansatz gewählt, bei dem eine symmetrische PCR in Anwesenheit eines phosphorylierten Primers durchgeführt wurde, der den nicht zu detektierenden Strang amplifiziert. Dieses PCR-Produkt wurde im Folgenden mit λ -Exonuklease verdaut, die spezifisch phosphorylierte DNA-Stränge degradiert (Mitsis & Kwagh 1999). Der so erhaltene Einzelstrang wurde anschließend auf einem elektrochemisch-auslesbaren Biochip mit immobilisierten komplementären Fängern

appliziert und vermessen (Abb. 3-54). Aus den elektrochemischen Messungen wird ersichtlich, dass sowohl die Methode der asymmetrischen PCR mit thermischer Denaturierung als auch die Methode der symmetrischen PCR und anschließendem λ -Exonuklease-Verdau vergleichbare Ergebnisse erzielten. Dagegen erweist sich die Methode der symmetrischen PCR und thermischer Denaturierung als sehr ineffektiv. Diese ergibt lediglich ein Signal von etwa 1% verglichen mit der Methode der asymmetrischen PCR (Abb. 3-54). Verzichtet man auf die thermische Denaturierung im Anschluss an die symmetrische PCR, war kein elektrochemisches Signal zu detektieren. Nach Hybridisierung einer PCR ohne Templat (*E. coli* genomische DNA) konnte ebenfalls kein Messsignal detektiert werden.

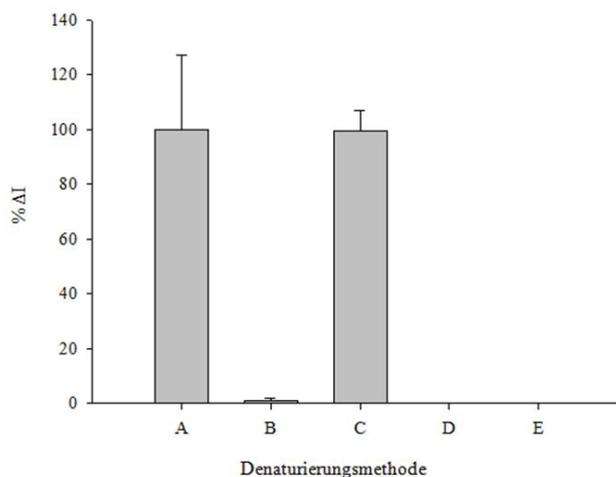


Abbildung 3-54: **Elektrochemischer Nachweis des *uidA*-Amplikons mittels Hybridisierung auf Goldelektroden und Nachweis mit EST2-ODN-Reporterkonjugat.** Verschiedene Denaturierungsmethoden wurden gewählt: (A) Asymmetrische PCR und thermische Denaturierung des PCR-Produkts bei 95°C für 5 min und anschließende Helfer-Bindung bei 50°C für 1 min. (B) Symmetrische PCR und thermische Denaturierung des PCR-Produkts bei 95°C für 5 min und anschließende Helfer-Bindung bei 50°C für 1 min. (C) Symmetrische PCR mit phosphoryliertem Primer, der den Gegenstrang amplifiziert und anschließendem λ -Exonuklease-Verdau des PCR-Produkts. (D) Symmetrische PCR und keine thermische Denaturierung. (E) PCR ohne genomische DNA aus *E. coli* (Negativ-Kontrolle). Alle Lösungen wurden anschließend auf einem Biochip mit immobilisierten Fängern, welche spezifisch das *uidA*-Amplikon erkennen, und in Gegenwart eines spezifischen EST2-ODN-Reporterkonjugats bei 45°C für 20 Minuten hybridisiert. Nach einem Waschschrift erfolgte die Detektion von hybridisiertem EST2-*uidA*-Konjugat durch Zugabe von 2 mM pAPB und Analyse des Stromverlaufs. Der elektrochemische Signalwert für die Methode (A) wurde als 100% definiert.

Da das *uidA*-Gen als Markergen für den Nachweis von *E. coli* dient, sollte diese Nachweismethode mit einigen *E. coli*-Stämmen getestet werden. Darüberhinaus wurde auch genomische DNA aus zwei EHEC-Stämmen, *H. alvei*, *L. innocua* und *B. subtilis* für die PCR eingesetzt und das Reaktionsprodukt darauf elektrochemisch charakterisiert. Alle verwendeten *E. coli*-Stämme produzierten ein Signal von 20 – 25 nA/sek, was die Anwesenheit des *uidA*-Amplikons bestätigte (Abb. 3-55 A). Dagegen

generierten keine der anderen Stämme (*L. innocua*, *H. alvei* oder *B. subtilis*) ein elektrochemisches Signal, da sie kein *uidA*-Gen in ihrem Genom besitzen. Interessant ist die Tatsache, dass bei Verwendung von genomischer DNA aus *E. coli* O157:H7 (EHEC) ein Signal von 10 – 13 nA/sek detektiert wurde. Dies deutet auf eine Fehlbasenpaarung im Fänger- bzw. Detektionsbereich hin. Diese Fehlbasenpaarung befindet sich am 5' terminalen Ende des Fänger-ODNs (vorletzte Position).

Die Sensitivität des Nachweises von *E. coli* mittels PCR-Amplifikation des *uidA*-Markergens ist in Abbildung 3-55 B dargestellt. Amplifizierte genomische DNA aus 5.000 bis etwa einer *E. coli*-Zelle konnte mit einem elektrochemischen Signal von etwa 20 – 25 nA/sek detektiert werden. Da es sich bei der PCR um eine Endpunktreaktion handelt, ergibt sich kein linearer Verlauf, sondern für alle Zellzahlen etwa das gleiche Signal.

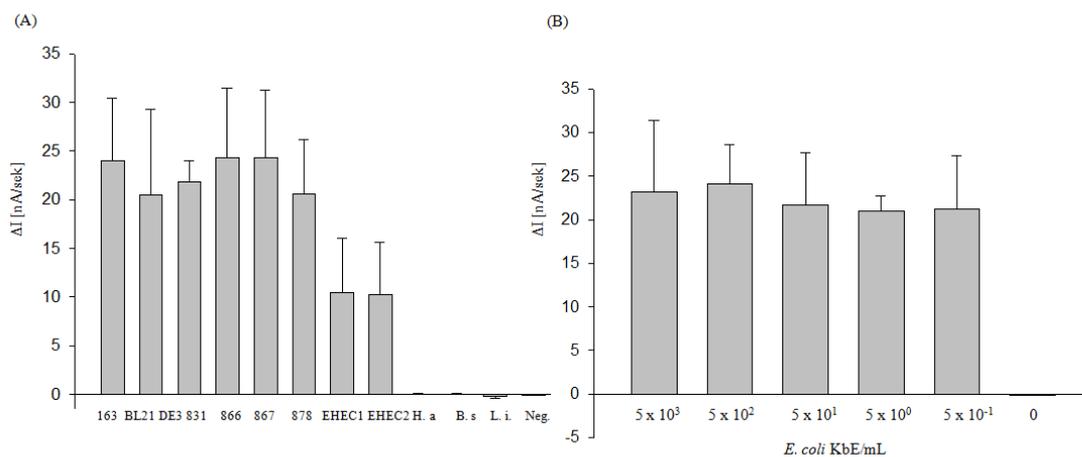


Abbildung 3-55: **Elektrochemische Detektion von mittels PCR-amplifiziertem Markergen (*uidA*) aus *E. coli*.** (A) Selektivität des Nachweises von *E. coli*. Aus verschiedenen Isolaten von *E. coli* wurde genomische DNA isoliert und für den Nachweis verwendet. Dies waren die Isolate *E. coli* 163, *E. coli* 831, *E. coli* 866 und *E. coli* 878. Dabei handelt es sich um Praxisisolate aus der Stammsammlung des Max Rubner-Instituts. Weiterhin wurde der Laborstamm *E. coli* BL21 (DE3) verwendet. Bei den Proben EHEC1 und EHEC2 handelt es sich um genomische DNA aus *E. coli* O157:H7. Als Negativ-Kontrollen wurden weiterhin genomische DNA aus *H. alvei* (H.a), *B. subtilis* (B.s) und *L. innocua* (L. i) eingesetzt. Darüber hinaus erfolgte auch die Vermessung einer PCR ohne bakterielle genomische DNA (Neg.). (B) Sensitivität der elektrochemischen Detektion von *E. coli*. Dabei wurde genomische DNA aus verschiedenen Zellzahlen *E. coli* 163 isoliert und für die PCR und den anschließenden Hybridisierungsnachweis eingesetzt. Als Reporterenzym-ODN-Konjugat wurde EST2-*uidA* verwendet.

Die direkte Analyse von 16S rRNA aus einigen Gram-positiven Bakterien erweist sich unter Umständen als schwierig, da die Lyse dieser Bakterien ohne Degradation der RNA nur sehr ineffizient durchgeführt werden kann. Deshalb sollte hier auch die Möglichkeit des Nachweises von *B. subtilis* mittels PCR-Amplifikation eines Teilbereiches der 16S rRNA-Gene und anschließender Vier-Komponenten-Sandwich-Hybridisierung getestet werden. Dazu wurde aus verschiedenen Zellzahlen von *B.*

subtilis genomische DNA isoliert und in die asymmetrische PCR eingesetzt. Die Entstehung eines PCR-Produkts mit einer Größe von 295 bp wurde mittels 2%iger Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert (Abb. 3-56). Nach thermischer Denaturierung der PCR-Produkte erfolgte die Hybridisierung auf einem elektrochemisch auslesbaren Biochip mit immobilisierten BSUBTILIS-Fängern in Gegenwart von Helfer-ODN und EST2-ODN-Reporterkonjugat (EST2-UD1082).

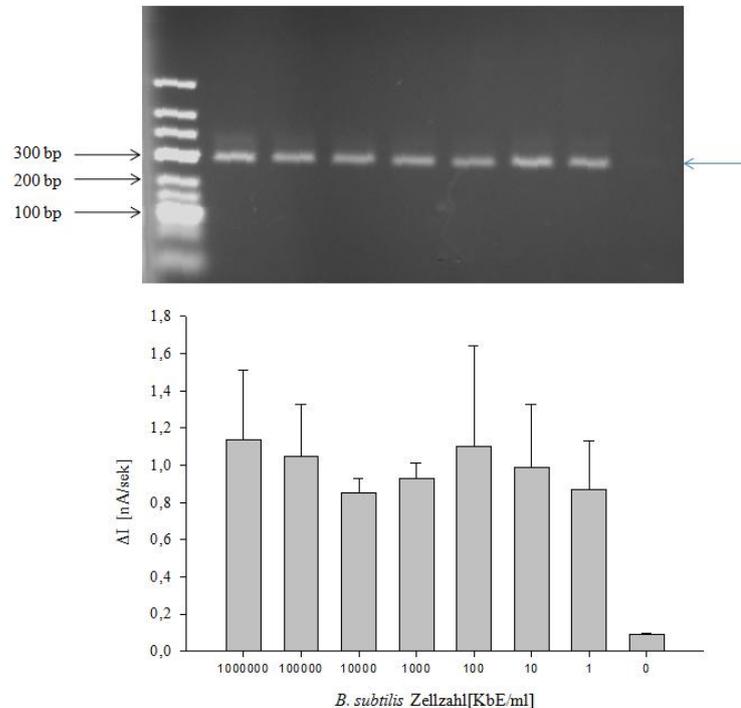


Abbildung 3-56: **Detektion von *B. subtilis* nach PCR-Amplifikation der 16S rRNA-Gene und Sandwich-Hybridisierung.** Oben dargestellt ist die 2%ige Agarose-Gelelektrophorese von isolierter Gesamt-RNA aus den unten angegebenen *B. subtilis*-Zellzahlen. Links aufgetragen ist ein DNA-Größenstandard und die Fragmente mit der Größe 300, 200 und 100 bp sind gekennzeichnet. Die Größe des PCR-Produkts ist mit einem Pfeil (blau) rechts markiert. Im unteren Teil sind die elektrochemisch gemessenen Signale gegen die *B. subtilis*-Zellzahl aufgetragen.

Unabhängig von der zur genomischen DNA-Isolation verwendeten *B. subtilis*-Zellzahl liegen nach der PCR immer nahezu identische Konzentrationen an PCR-Amplikon vor (Abb. 3-56). Auffällig ist aber, dass die Signalstärken in diesem Fall nur bei etwa 1,0 bis 1,2 nA/sek liegen im Vergleich zu den mit dem *uidA*-Amplikon erzielten Signalen von mehr als 20 nA/sek (Abb. 3-55). Der Unterschied in den beiden Ansätzen liegt zum einem an dem Aufbau aus Fänger, Detektor und PCR-Einzelstrang beim *uidA*-Nachweis. Dagegen besteht der Aufbau beim *16S rRNA*-Gen-Nachweis aus Fänger-, Helfer-, Detektor-ODN und einzelsträngigem PCR-Amplikon. Dies sollte einen geringen Einfluss auf die Signalstärke haben, da das Reporterenzym im zweiten Fall weiter von der Elektrode entfernt wird. Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Nachweismethoden sind die Längen der Amplifikate. Bei der Detektion des *uidA*-Gens umfasst das Amplikon genau die Länge aus Fänger und Detektor, wobei an beiden

Enden die Primer binden können. Beim Nachweis der *16S rRNA*-Gene aus *B. subtilis* beträgt die Länge des Amplikon 295 bp, während der Bereich aus Fänger-, Helfer- und Detektor-ODN nur etwa 100 nt abdeckt.

3.3.2 Rolling Circle Amplifikation

Eine Amplifikation von Detektionssignalen wird in der *Microarray*-Technologie unter anderem durch den Einbau von Nukleotiden, welche mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, erreicht. Neben der PCR, die aber mehrere unterschiedliche Temperaturzyklen benötigt, eignet sich hierfür besonders die isothermale *Rolling Circle Amplifikation* (RCA) (Tian *et al.*, 2006; Cheglakov *et al.*, 2007).

Der prinzipielle Aufbau der Detektion von bakterieller RNA und Signalverstärkung mit RCA ist in Abbildung 3-57 gezeigt. Die spezifische Bindung der 16S rRNA an den immobilisierten Fänger erfolgte in Gegenwart von Helfer-ODN und Detektor-ODN. Nach Hybridisierung eines Primers an den Detektor und gleichzeitiger Hybridisierung von zirkulärer DNA kommt es zur Amplifikation durch die Phi29 DNA-Polymerase. An das Amplifikat können nun mehrere EST2-ODN-Konjugate (EST2-RCA1, EST2-RCA2 und EST2-RCA3) binden.

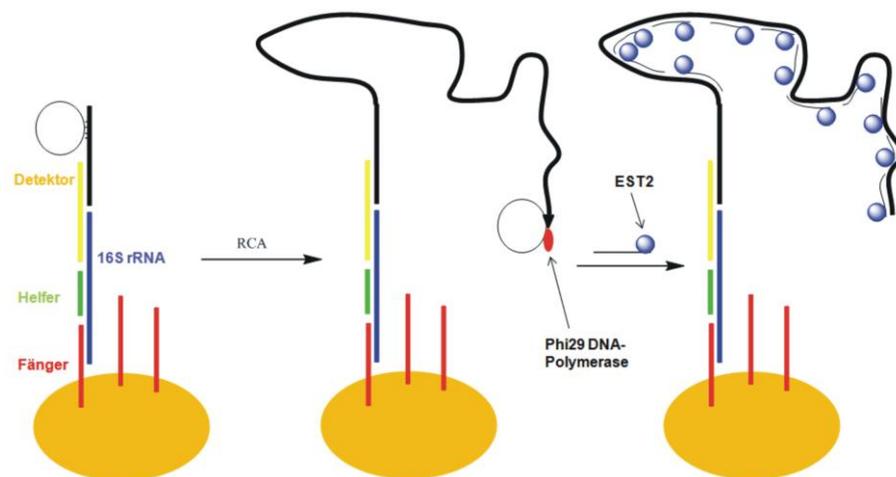


Abbildung 3-57: Schematische Darstellung der Signalverstärkung der rRNA/DNA-Hybridisierungsreaktion und anschließende *Rolling Circle Amplifikation*. Fänger-ODN, Helfer-ODN und Detektor-ODN sind rot, grün bzw. gelb dargestellt. Die Phi29 DNA-Polymerase ist als roter Kreis, die EST2 als blaue Kugel dargestellt. Der Primer für die RCA-Reaktion ist in schwarz, die zu Teilen des Primers komplementäre zirkuläre DNA als Ring dargestellt.

Die Bildung der zirkulären DNA erreichte man durch Ligation eines 5' Phosphat-modifizierten DNA-Stranges in Gegenwart eines komplementären Stranges durch eine thermostabile DNA-Ligase (Abbildung 3-58).

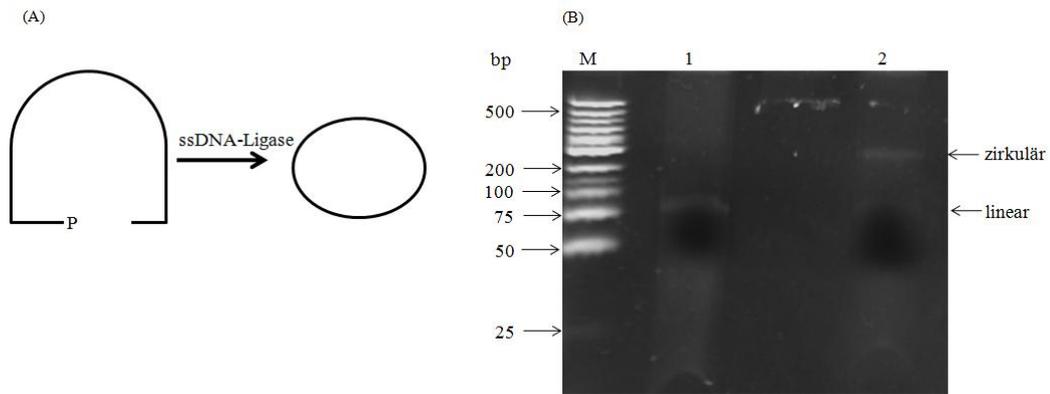


Abbildung 3-58: **Herstellung zirkulärer DNA für den Nachweis von 16S rRNA mittels Rolling Circle Amplifikation.** (A) Aus einem linearen, 5'-phosphorylierten ODN wurde mittels ssDNA-Ligase enzymatisch zirkuläre DNA hergestellt. (B) 10% Harnstoff-PAGE zur Analyse der hergestellten zirkulären DNA. Dargestellt ist ein DNA-Marker (M), 10 pmol lineares, 5' phosphoryliertes ODN (1) und 10 pmol zirkuläres ODN nach Ligation (2). Von einigen Banden des Größenstandards sind zur Orientierung die bp-Längen angegeben.

Die auf dem Biochip stattfindende isothermale Amplifikation erlaubt eine spezifische und sensitive Detektion von *E. coli* 16S rRNA. Bei der Verwendung von 16S rRNA aus 10^7 KBE *E. coli* ergibt sich ein spezifisches Signal der ECOLI-Elektrode von mehr als 55 nA/sek (Abb. 3-59 A). Diese Art der Signalverstärkung erlaubt die Detektion von etwa zehn KBE *E. coli*. Der lineare Bereich der Detektion erstreckt sich bis zu 10^8 KBE (Abb. 3-59 B). Ein Nachteil dieser Methode ist der größere Zeitaufwand von etwa zwei Stunden in Gegensatz von nur etwa 40 min (nach RNA-Isolation) für die direkte Detektion der RNA/DNA-Hybridisierung mit EST2-ODN- bzw. EST2-Dendrimer-ODN-Konjugaten (s. Abschnitt 3.3.3).

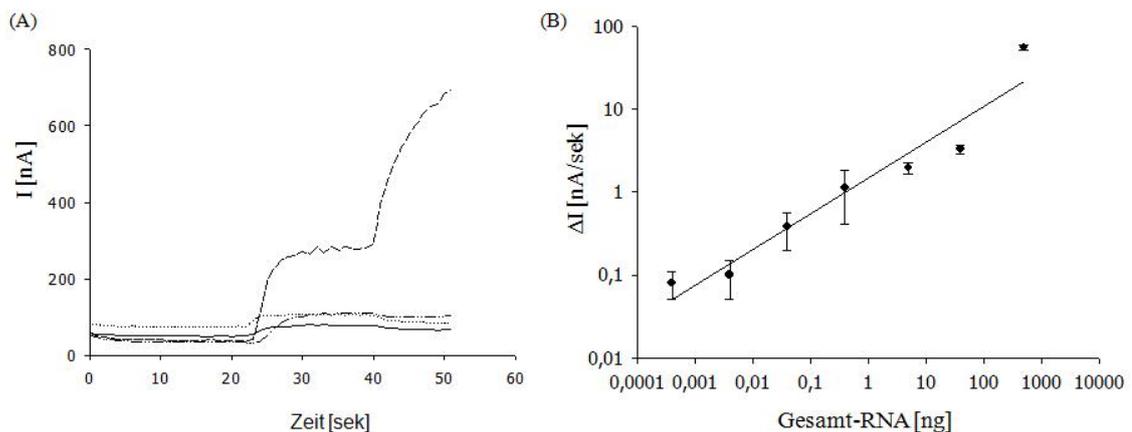


Abbildung 3-59: **Amperometrischer Nachweis von bakterieller 16S rRNA durch RNA/DNA-Hybridisierung auf einer Goldelektrode und Signalamplifizierung mittels Rolling Circle Amplifikation.** (A) Selektivität der amperometrischen Detektion von *E. coli* 16S rRNA nach Hybridisierung mit Fängern spezifisch für *E. coli* (---), *B. subtilis* (···) und *L. innocua* (—). Zur Kontrolle von unspezifischer Bindung behandelte man eine Elektrode nur mit Oktanthiollösung (—·—·). (B) Elektrochemische Signalstärke bei Verwendung unterschiedlicher Mengen an *E. coli* Gesamt-RNA zur RNA/DNA-Hybridisierung und anschließender RCA.

3.3.3 Signalamplifikation durch Dendrimertechnologie

Eine Verstärkung des Signals erreicht man durch das Anbringen mehrerer Reporterenzyme pro Hybridisierungsereignis. In dieser Arbeit sollte die Möglichkeit der Signalamplifikation durch mehrfach markierte Polyamidoamin (PAMAM)-Dendrimere getestet werden. Um das Konzept zu bestätigen, erfolgte zuerst eine Studie mit einer Zwei-Komponenten-Hybridisierung (DNA/DNA-Hybridisierung).

3.3.3.1 Synthese und Reinigung der EST2-Dendrimer-ODN-Konjugate

Die Herstellung von EST2-Dendrimer-ODN-Konjugaten erfolgte mit PAMAM-Dendrimern, welche nach Reduzierung eine freie Thiol-Gruppe aufweisen (Tomalia *et al.*, 2003). Diese wurde spezifisch durch das bifunktionelle Reagenz sulfo-SMCC mit einem Amino-funktionalisierten Oligonukleotid gekoppelt. Nach Modifizierung einiger oberflächenexponierter Aminogruppen des PAMAM-Dendrimers mit Essigsäureanhydrid wurden die restlichen verfügbaren Aminogruppen durch das bifunktionelle Reagenz SM(PEG)₂ mit EST2-Molekülen kovalent verknüpft (Abb. 3-60) (Humenik *et al.*, 2008). Die Absättigung der Aminogruppen war nötig, um unspezifische Bindung der positiv geladenen Aminogruppen an die polyanionischen ODNs zu unterbinden (Majoros *et al.*, 2003).

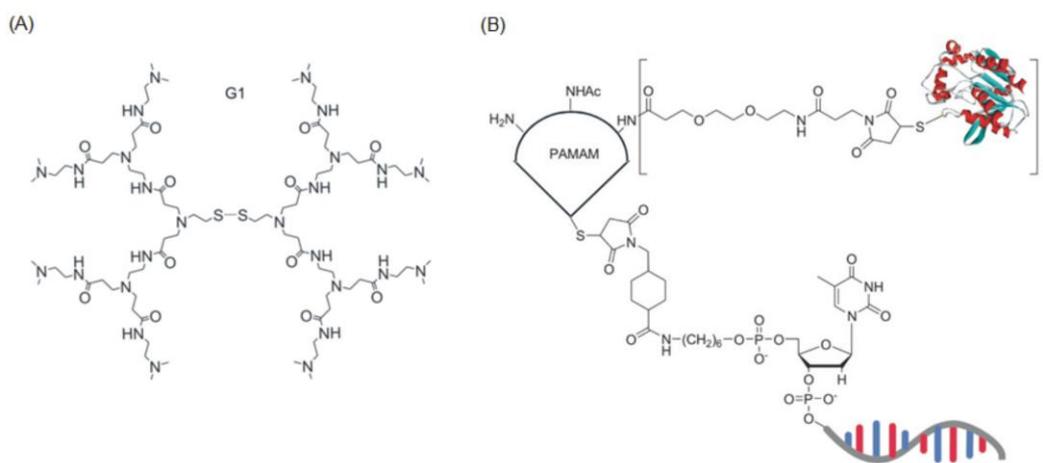


Abbildung 3-60: **Herstellung von mehrfach-markierten EST2-Dendrimer-ODN-Konjugaten.** (A) Strukturformel eines PAMAM-Dendrimers mit Disulfidbindung als Kern (Generation 1). (B) Darstellung der Kopplung von einem ODN und mehreren EST2-Molekülen mit einem PAMAM-Dendrimer.

Nach Herstellung der Konjugate erfolgte die Abtrennung der hochmolekularen EST2-Dendrimer-ODN-Konjugate von den niedermolekularen Dendrimer-ODN- und EST2-Molekülen mittels Gelpermeationschromatographie (Abb. 3-61).

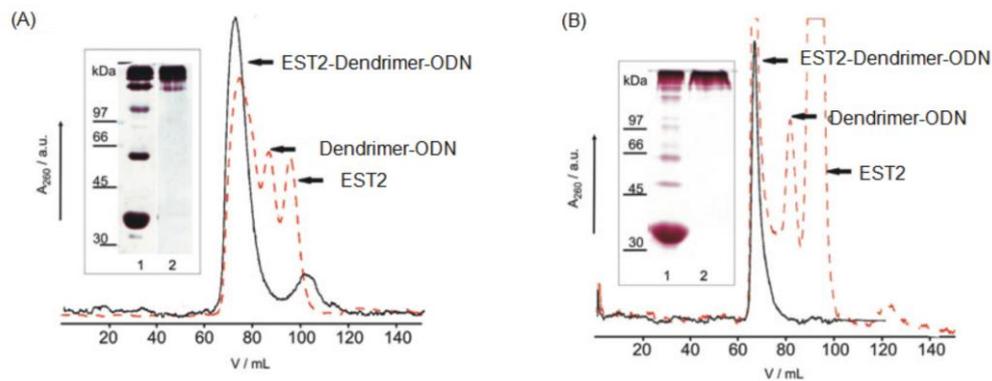


Abbildung 3-61: **Reinigung der EST2-Dendrimer-ODN-Konjugate mittels Gelpermeationschromatographie (Sephacryl S-200 HR).** Konjugate der Generation 3 (G3) PAMAM-Dendrimer (A) und Konjugate der Generation 5 (G5) PAMAM-Dendrimer (B) eluierten im Ausschlussvolumen der Säule. Die erste (---) und zweite (—) Aufreinigungsstufe sind dargestellt. Eingelegt ist jeweils die 10%ige SDS-PAGE des Rohproduktes (Bahn 1) und des aufgereinigten EST2-Dendrimer-ODN-Konjugats (Bahn 2).

Der Enzym-Anteil pro EST2-Dendrimer-ODN-Konjugat wurde mit Hilfe des A_{260}/A_{280} -Verhältnisses bestimmt:

$$\frac{A_{260}}{A_{280}} = \frac{\varepsilon_P^{260} \times c_P + \varepsilon_O^{260} \times c_O}{\varepsilon_P^{280} \times c_P + \varepsilon_O^{280} \times c_O}$$

Dabei ist A die Absorption bei 260 nm bzw. 280 nm, ε ist der Extinktionskoeffizient und c_P und c_O entsprechen der Konzentration des Proteins bzw. des ODNs. Experimentell ermittelte A_{260} - und A_{280} -Werte für verschiedene Mischungen aus EST2 und 5'-Amino-modifiziertem ODN ergaben eine hyperbolische Kurve, mit der die Zusammensetzung des G3 Dendrimer-Konjugats (7:1) und des G5 Dendrimer-Konjugats (10:1) errechnet werden konnte (Abb. 3-62). G3 Dendrimere weisen 4-fach weniger Aminogruppen an der Oberfläche auf als G5 Dendrimere (Tomalia *et al.*, 2003). Jedoch weist das G5 EST2-Dendrimer-ODN-Konjugat nur etwa doppelt so viele EST2-Moleküle wie das G3 EST2-Dendrimer-ODN-Konjugat auf. Ein Grund für diese Diskrepanz könnte die unterschiedliche Reaktivität des verglichen mit dem großen G5 Dendrimer kleineren G3 Dendrimers sein (Humenik *et al.*, 2008).

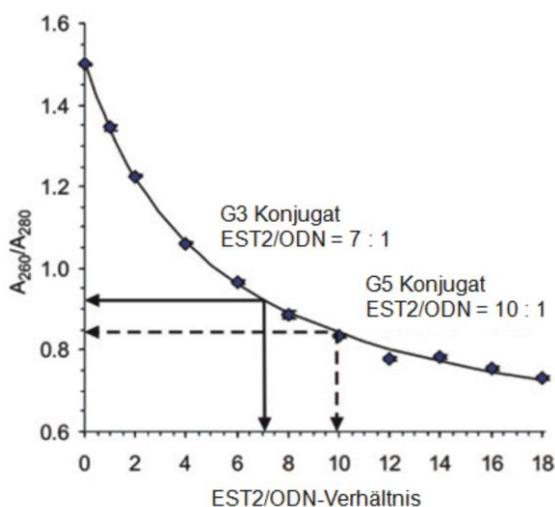


Abbildung 3-62: **Spektralphotometrische Bestimmung des EST2-Anteils pro EST2-Dendrimer-ODN-Konjugat.** Die UV-Absorption für unterschiedliche Mischungen aus EST2 und 5'-Aminomodifiziertem ODN wurde bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm bestimmt. Die UV-Absorption des G3 EST2-Dendrimer-ODN-Konjugats (durchgezogene Pfeile) bzw. des G5 EST2-Dendrimer-ODN-Konjugats (gestrichelte Pfeile) ist dargestellt.

Eine Überprüfung der bestimmten EST2-Anteile pro EST2-Dendrimer-ODN-Konjugat erfolgte durch Messung einer apparenten Michaelis-Menten-Kinetik auf dem Biochip. Dabei wurde das elektrochemische Signal bei unterschiedlichen Konzentrationen an Substrat gemessen. Aus den Messwerten wurden die apparente Michaelis-Menten-Konstante und k_{Kat} abgeleitet (Tab. 3-10).

Tabelle 3-10: **Ermittelte apparente Michaelis-Menten-Konstanten nach Immobilisierung der EST2-Reporterkonjugate via DNA/DNA-Hybridisierung auf den Goldelektroden eines Biochips.**

	EST2-ODN	G3 EST2-Dendrimer-ODN	G5 EST2-Dendrimer-ODN
K_M^{app} [mM]	$0,7 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,4$
I_{max} [nA/sek]	$6,6 \pm 1,8$	$31,7 \pm 3,6$	$57,8 \pm 12,6$
k_{Kat} [nA/sek nM]	$1,3 \pm 0,3$	$6,3 \pm 0,7$	$11,5 \pm 2,5$

3.3.3.2 Untersuchung der EST2-Dendrimer-ODN-Konjugate mittels Zwei-Komponenten-Hybridisierung

Zur Überprüfung der Signalverstärkung erfolgte eine DNA/DNA-Hybridisierung und der Nachweis mit EST2-ODN- oder EST2-Dendrimer-ODN-Konjugat. Dabei konnte eine lineare Abhängigkeit vom elektrochemischen Signal und der ODN-Konzentration festgestellt werden (Abb. 3-63).

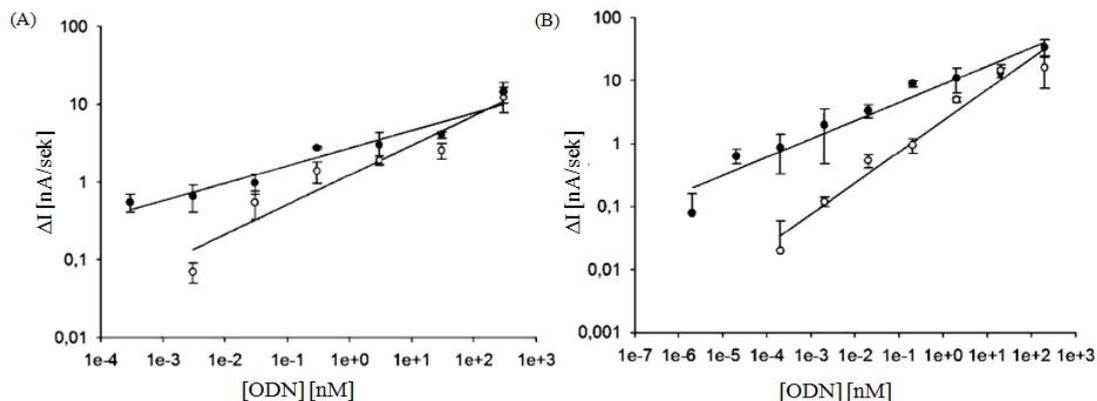


Abbildung 3-63: **Detektion der DNA/DNA-Hybridisierung mittels auf Goldelektroden immobilisierten spezifischen Fängeroligonukleotiden.** (A) Abhängigkeit des elektrochemischen Signals von der ODN-Konzentration bei Verwendung des EST2-ODN-Konjugats (○) bzw. des G3 EST2-Dendrimer-ODN-Konjugats (●). (B) Wie (A), jedoch Verwendung von G5 EST2-Dendrimer-ODN-Konjugat (●). Als Detektions-ODN wurde hier A31 verwendet (siehe Tabelle A-4).

Durch Verwendung des G3 EST2-Dendrimer-ODN-Konjugats erreichte man eine zehnfache, bei Einsatz des G5 EST2-Dendrimer-ODN-Konjugats eine 100-fache Steigerung des Detektionslimits im Vergleich zur Verwendung des EST2-ODN-Konjugats. Es fällt auf, dass die Signalverstärkung vor allem bei niedrigen ODN-Konzentrationen eintritt. Dies ist durch die Größe des EST2-Dendrimer-ODN-Konjugats bedingt. Bei niedriger Absättigung der Goldelektrode mit den sterisch anspruchsvollen EST2-Dendrimer-ODN-Konjugaten finden diese auf der Goldelektrode Platz zur Hybridisierung an das komplementäre Fänger-ODN.

Inwieweit die Verwendung dieser EST2-Dendrimer-ODN-Konjugate Einfluss auf die Selektivität der Diskriminierung von Fehlbasenpaarungen hat, sollte zusätzlich untersucht werden. Dazu wurden auf einem Biochip vollständig komplementäre Fänger, Fänger mit einer, mit zwei bzw. mit drei Fehlbasenpaarung(en) immobilisiert und mit EST2-ODN- bzw. G3 oder G5 EST2-Dendrimer-ODN-Konjugaten hybridisiert (Abb. 3-64).

Es fällt auf, dass bei Verwendung des G3 EST2-Dendrimer-ODN-Konjugats ein leichter Verlust der Diskriminierungsfähigkeit von Fehlbasenpaarungen im Vergleich zum EST2-ODN-Konjugat eintritt. Bei Verwendung des G5 EST2-Dendrimer-ODN-Konjugats ist keine Unterscheidung zwischen einer, zwei und drei Fehlbasenpaarungen möglich (Abb. 3-64).

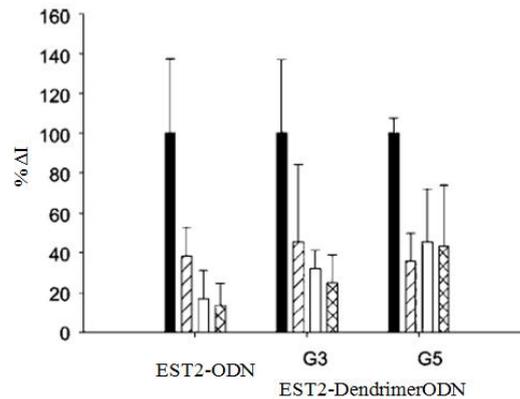


Abbildung 3-64: **Fähigkeit der Diskriminierung von Fehlbasenpaarungen durch EST2-ODN- bzw. G3 oder G5 EST2-Dendrimer-ODN-Konjugaten nach Hybridisierung mit immobilisierten Fänger-ODNs und amperometrischer Detektion.** Darstellung der Signalwerte nach Hybridisierung mit vollständig komplementären Fängern (schwarz) bzw. mit ein (gestrichelt), zwei (weiß) oder drei Fehlbasenpaarungen (gekreuzt) aufweisenden Fängern. Als Detektions-ODN wurde hier A31 verwendet (siehe Tabelle A-4). Der Signalwert für die Hybridisierung an die vollständig komplementären Fänger wurde als 100% definiert.

3.3.3.3 Detektion bakterieller 16S rRNA durch Verwendung von EST2-Dendrimer-ODN-Konjugaten als Reporter

Die Übertragbarkeit der Ergebnisse der Signalverstärkung mit EST2-Dendrimer-ODN-Konjugaten bei der Detektion der DNA/DNA-Hybridisierung auf den bakteriellen 16S rRNA-Nachweis sollte gezeigt werden. Dazu wurde Gesamt-RNA aus *E. coli* isoliert, fragmentiert und mittels Ein-Schritt Vier-Komponenten-Sandwich-Hybridisierung auf dem Biochip immobilisiert (Abb. 3-65).

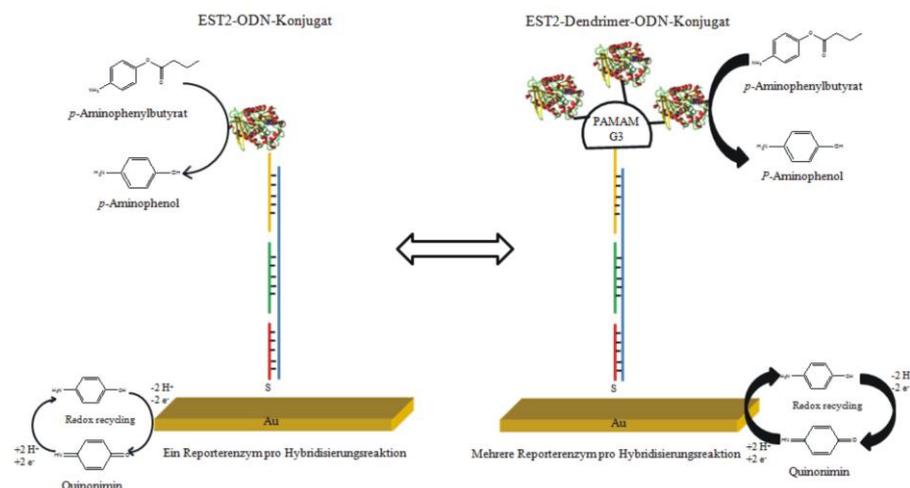


Abbildung 3-65: **Schematische Darstellung der 16S rRNA/DNA-Hybridisierung und Signalverstärkung mit EST2-Dendrimer-ODN-Konjugaten.** Beim EST2-ODN-Konjugat befindet sich nur ein Reporterenzym pro Hybridisierungsereignis auf der Elektrode. Dagegen sind bei Anwesenheit des EST2-Dendrimer-ODN-Konjugats mehrere Reporterenzyme pro Hybridisierungsereignis auf der Goldelektrode immobilisiert. Das Fänger-ODN ist rot, das Helfer-ODN grün, das EST2-ODN-Reporterkonjugat gelb und die fragmentierte 16S rRNA blau dargestellt.

Die Selektivität wurde mit Fängern spezifisch für *E. coli*, *H. alvei* und *B. subtilis* getestet. Um unspezifische Bindung von EST2-Dendrimer-ODN-Konjugaten an die Goldelektrode zu testen, wurde eine Elektrode ohne Fänger behandelt (Abb. 3-66 A). Es wird deutlich, dass nur die Elektrode, auf der Fänger spezifisch für *E. coli* immobilisiert war, ein signifikantes elektrochemisches Signal produzierte. Weder die Elektrode ohne Fänger noch die Elektrode mit immobilisiertem Fänger spezifisch für *B. subtilis* generierte ein Signal. Die Elektrode mit immobilisiertem Fänger spezifisch für *H. alvei* zeigte ein kleines Hintergrundsignal (etwa 5% Signal im Vergleich zur Elektrode mit Fänger spezifisch für *E. coli*).

Die Verwendung von G3 EST2-Dendrimer-ODN-Konjugat bringt eine Verbesserung des Detektionslimits um den Faktor zehn gegenüber dem Gebrauch von EST2-ODN-Konjugat mit sich. Jedoch kommt es aufgrund des größeren hydrodynamischen Radius‘ der EST2-Dendrimer-ODN-Konjugate zu einem engeren linearen Bereich der bakteriellen Detektion im Vergleich zum kleineren EST2-ODN-Konjugat (Abb. 3-66 B). Auch hier wurde bei der Bestimmung des Detektionslimits neben der hier gezeigten Isolation aus verschiedenen *E. coli*-Zellzahlen auch RNA aus 10^8 KbE *E. coli* isoliert und anschließend verdünnt. Desweiteren wurde der Detektionsbereich der 16S rRNA *in vitro* transkribiert, verdünnt und amperometrisch detektiert (Tab. 3-11). Mit beiden Methoden ergab sich beim Einsatz von EST2-Dendrimer-ODN-Konjugat eine Verschiebung des Detektionslimits um mindestens einen Faktor von zehn.

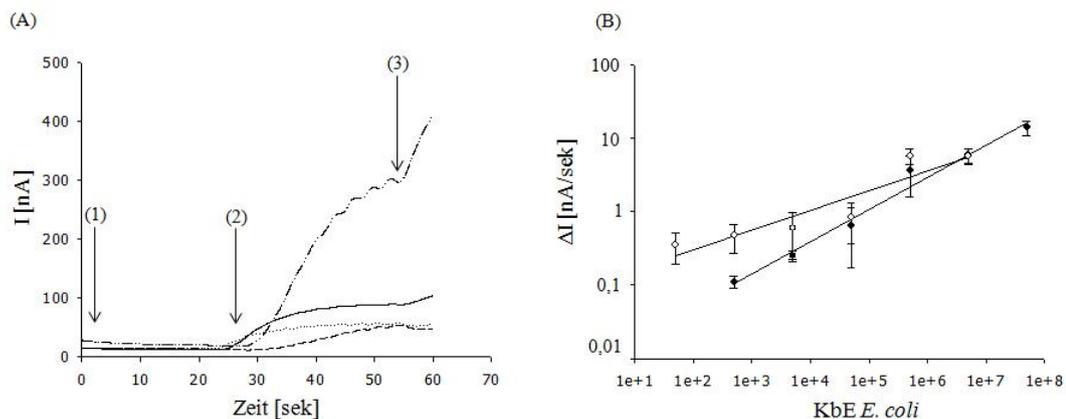


Abbildung 3-66: **Amperometrischer Nachweis bakterieller 16S rRNA unter Verwendung von EST2-Dendrimer-ODN-Konjugaten.** (A) Selektivität der Detektion von 16S rRNA aus *E. coli*. Dargestellt ist der zeitliche Stromverlauf der Elektroden, welche Fänger spezifisch für *E. coli* (---), *H. alvei* (—), *B. subtilis* (--) trugen bzw. keinen Fänger aufwiesen (···). Nach Durchfluss von 100 mM Natriumphosphat (pH 7,0) stellte sich ein konstanter Basisstrom ein (1). Die Zugabe von Substrat (2) erzeugte einen Anstieg des Stromes, welcher nach einiger Zeit in einer Plateauphase des Stromverlaufs endete (3). Ein Stoppen des Flusses produzierte einen linearen Anstieg des Stromes, welcher proportional zur immobilisierten Reporterenzymmenge ist. (B) Sensitivität der elektrochemischen Detektion von *E. coli* 16S rRNA nach Hybridisierung mit immobilisierten spezifischen Fängern und Nachweis mit EST2-ODN- (●) bzw. G3 EST2-Dendrimer-ODN-Konjugat (○).

Tabelle 3-11: Vergleich der ermittelten Nachweisgrenzen für die Bestimmung von *E. coli* unter Verwendung unterschiedlich hergestellter RNA-Proben mittels EST2-ODN- bzw. EST2-Dendrimer-ODN-Konjugat.

Probenvorbereitung	Detektionslimit	
	EST2-ODN	EST2-Dendrimer-ODN
Verdünnung von Bakterienkultur und separate RNA-Isolation	500 KbE	50 KbE
RNA-Isolation aus 10^8 KbE <i>E. coli</i> und Vermessung verschiedener Verdünnungen	400 KbE	10 KbE
RNA-Synthese durch <i>in vitro</i> -Transkription und Vermessung verschiedener Verdünnungen	80 KbE	2 KbE

4 Diskussion

Der Einsatz moderner biochemischer Methoden und neuartiger Signaltransduktionsmethoden zur Detektion von bakteriellen oder medizinisch relevanten Nukleinsäuren ist ein vielversprechender Ansatz, um eine schnelle und kostengünstige Diagnostik zu gewährleisten (Murphy 2006). Dabei sind auf elektrochemischen Prinzipien basierende Biosensoren die am stärksten wachsende Gruppe (Lazcka *et al.*, 2007), da sie eine einfache und kostengünstige, aber gleichzeitig sensitive und reproduzierbare Technologie für eine *Point-of-Care*-Diagnostik darstellen. Die Bezeichnung „elektrochemischer Biosensor“ wird für alle Applikationen verwendet, bei denen ein biologisches Erkennungselement und eine Elektrodenoberfläche verknüpft vorliegen (Wang 2006). Somit handelt es sich bei denen in dieser Arbeit vorgestellten auf Nukleinsäure-Hybridisierung beruhenden Biochips um elektrochemische Biosensoren, da in der Regel eine DNA-Fängersonde auf einer Goldelektrode immobilisiert vorlag. Amperometrische Biosensoren sind dabei besonders attraktiv, da sie gleichzeitig eine hohe Sensitivität und einen großen linearen Bereich aufweisen (Wang 1999). In dieser Arbeit wurde eine spezielle Form des amperometrischen Biosensors verwendet, der auf dem Prinzip der Voltammetrie (Kunstwort aus Volt- und Amperometrie) beruht. Dabei wird grundsätzlich die Stromstärke zwischen zwei Elektroden gemessen und zugleich die Spannung mit der Zeit verändert. Der durch Oxidation des elektroaktiven pAP erzeugte Strom wurde zwar bei konstantem Potential gemessen, jedoch wechselte das an die Elektroden angelegte Potential zeitlich gesteuert. Dies erlaubt die reversible anodische Oxidation von pAP und kathodische Reduktion von Quinonimin und somit eine Akkumulation der elektroaktiven Spezies an der Elektrode (*Redox-Recycling*) (Niwa *et al.*, 1993).

4.1 Verwendung von Esterase 2 als Reporterenzym zur Detektion von Hybridisierungsereignissen

Der Nachweis der Hybridisierungsreaktion ist aufgrund der Verwendung eines Reporterenzyms stark amplifiziert. Enzyme beschleunigen chemische Reaktionen etwa um den Faktor 10^5 bis 10^{17} (Wolfenden *et al.*, 1998), was eine höhere Konzentration an detektierbarem Produkt und somit eine Verbesserung der Nachweisgrenze zur Folge hat. Dies erlaubt eine äußerst sensitive Detektion der Hybridisierungsereignisse im sub-pM bis fM-Bereich (Hempfen & Karst 2006). Dagegen besitzen Biosensoren, die auf Hybridisierung mit Ferrocen-markierten DNA-Strängen beruhen, meist Nachweisgrenzen im nM- bis μ M-Bereich (Mir & Katakis 2008).

Desweiteren sorgt der *Redox-Recycling*-Prozess für eine Amplifikation des detektierbaren Stroms (Niwa *et al.*, 1993). Neben der hier vorgestellten

elektrochemischen Reduktion elektrochemisch oxidiertes Spezies wurden auch enzymatische (Forrow *et al.*, 2004) und chemische (Gabig-Ciminska *et al.*, 2004) Methoden des *Redox-Recyclings* beschrieben. So konnte das Detektionslimit eines Immunosensors für murines Immunglobulin G durch Verwendung von Alkalischer Phosphatase als Reporterenzym und Nikotinamidadenindinukleotid (NADH), welches Quinonimin zurück zu pAP reduziert und somit einen *Redox-Recycling*-Prozess ermöglicht, auf 1 pg/mL gesteigert werden. Ohne *Redox-Recycling* wurde dagegen nur eine Nachweisgrenze von 0,1 µg/mL Analyt erreicht (Kwon *et al.*, 2008).

Zum Nachweis von Nukleinsäure-Hybridisierungen wurden in dieser Arbeit kovalente EST2-ODN-Konjugate verwendet. Da es sich bei der EST2 um ein thermostabiles Enzym handelt, konnte das EST2-ODN-Konjugat bei der Hybridisierungsreaktion anwesend sein. Dies erlaubt eine Ein-Schritt-Hybridisierungsreaktion ohne nachfolgende Anbindung eines Reporterenzym über Biotin-Streptavidin- oder Antigen-Antikörper-Wechselwirkung (Dill *et al.*, 2006; Elsholz *et al.*, 2006; Farabullini *et al.*, 2007). Dies sorgt nicht nur für eine schnellere und einfachere Durchführbarkeit der Nukleinsäuredetektion, sondern auch für eine reproduzierbare und orientierte Immobilisierung des Reporterenzym (Kukolka & Niemeyer 2004). Burbulis *et al.* (2005) verwendeten Protein-DNA-Konjugate (so genannte *tadpoles*) um kleine Moleküle, etwa ein Antigen spezifisch für *Bacillus anthracis* oder den Enzymkofaktor Biotin zu detektieren. Die Quantifizierung des gebundenen Analyten erfolgte durch *in vitro*-Transkription des DNA-Teils und anschließende RT-PCR. Dieser Ansatz zeichnete sich durch einen sehr großen dynamischen Bereich (elf Größenordnungen) und eine hohe Sensitivität aus (6.400 Antigenmoleküle bzw. 600 Biotin-Moleküle). Weiterhin wurden Protein-DNA-Konjugate für eine DNA-vermittelte Assemblierung von künstlichen Multienzymkomplexen auf Oberflächen angewandt (Müller & Niemeyer 2008).

Die Verwendung der EST2 für die Herstellung von Protein-DNA-Konjugaten bietet eine Reihe von Vorteilen. Neben der Thermostabilität ist die geringe Größe der EST2 ein entscheidender Punkt für die Sensitivität. Der hydrodynamische Radius der EST2 beträgt lediglich 2,68 nm, was einer Fläche von etwa 22,5 nm² entspricht. Im Gegensatz dazu beträgt der hydrodynamische Radius des Alkalische Phosphatase-Streptavidin-Konjugats (AP-SA) 5,96 nm, was einer Fläche von etwa 111,6 nm² entspricht (Lucarelli *et al.*, 2006). Das heißt, das AP-SA-Konjugat benötigt im Vergleich zur EST2 fünfmal mehr Platz auf der Elektrodenoberfläche. Somit erreicht man bei Verwendung von EST2-ODN-Konjugaten erst bei höheren Analytkonzentrationen einen Sättigungseffekt und kann in einem größeren linearen Bereich Messungen vornehmen. So erlaubt die Verwendung von EST2-ODN-Konjugaten einen Nachweis von 10⁸ – 10² KbE *E. coli*, während mittels AP-SA-Konjugat oder EST2-SA-Konjugat bereits bei 10⁷ KbE *E. coli* ein Sättigungseffekt eintritt (Elsholz *et al.*, 2006). Zusätzlich bietet die EST2 den Vorteil der ortsgerichteten Einführung eines Cystein-Restes, dessen Thiolgruppe für

eine kovalente Konjugation mit Amino-funktionalisierten ODNs genutzt werden kann (Wang *et al.*, 2007). Dagegen weist jedes Monomer der intestinalen AP (*Bos taurus*) sechs Cysteinreste auf, welche darüberhinaus an der Ausbildung von Disulfidbrücken beteiligt sind (Hua *et al.*, 1986; Coleman 1992). Deshalb eignet sich die häufig verwendete AP nicht, um kovalente Protein-DNA-Konjugate herzustellen. Weiterhin stellte sich das für elektrochemische Messungen verwendete Substrat der AP, *p*-Aminophenylphosphat (pAPP), bei den gewählten Messbedingungen als relativ instabil heraus (Nebling *et al.*, 2004).

4.2 Detektion von bakterieller 16S rRNA

Der elektrochemische Nachweis prokaryontischer 16S rRNA beruht in dieser Arbeit auf einer Hybridisierungsreaktion zwischen immobilisiertem Fänger-ODN, fragmentierter 16S rRNA, Helfer-ODN und EST2-ODN-Reporterkonjugat. Diese Vier-Komponenten-*Sandwich*-Hybridisierung führt in Anwesenheit des Analyten zur Nukleinsäure-adressierten Immobilisierung der Esterase 2 auf der entsprechenden Goldelektrode. Die enzymatische Reaktion des Reporterenzym kann anschließend amperometrisch detektiert werden. Als Zielmolekül für die Bakterienanalyse wurde 16S rRNA gewählt. Die Vorteile bei Verwendung von 16S rRNA sind die große Zahl an 16S rRNA-Molekülen pro wachsender Zelle, kein möglicher lateraler Gentransfer und die Länge von etwa 1.500 nt, was die Anwesenheit von konservierten als auch variablen Bereichen gewährleistet (Amann & Ludwig 2000). Zusätzlich ist auch die freie Verfügbarkeit einer Vielzahl von 16S rRNA-Sequenzdaten zu erwähnen (Wuyts *et al.*, 2004; Ludwig *et al.*, 2004; Cole *et al.*, 2007). Die variablen Regionen V3 und V6 der 16S rRNA wurden besonders häufig für die Analyse von mikrobiellen Habitaten beschrieben. Dabei zeigt V3 eine gute Differenzierungsmöglichkeit zwischen den meisten Bakterienspezies einschließlich *Haemophilus* spp., während V6 nahezu alle pathogenen Bakterien einschließlich *Bacillus* spp. unterscheiden kann (Chakravorty *et al.*, 2007). Das herausragende Potential der V6-Region zur mikrobiellen Analyse wurde durch deren Verwendung zur Analyse der mikrobiellen Ökologie im Nordatlantik aufgezeigt (Sogin *et al.*, 2006). Die Unterscheidung nah verwandter *Enterobacteriaceae* erweist sich mit beiden variablen Regionen als schwierig. In dieser Arbeit wurde hauptsächlich auf die V6-Region zurückgegriffen, da sie generell einen Mikroorganismennachweis mit lediglich einem konservierten Detektor-ODN erlaubt. Andere Arbeiten, die auf der Detektion der V3-Region der 16S rRNA beruhen, benötigen mehrere Detektor-ODN-Konjugate (Elsholz *et al.*, 2006).

4.2.1 Optimierung der elektrochemischen 16S rRNA-Nachweismethode

Eine effiziente Hybridisierung zwischen immobilisiertem Fänger-ODN und bakterieller 16S rRNA ist für einen sensitiven und selektiven Mikroorganismennachweis

entscheidend. In dieser Arbeit wurden Thiol-modifizierte Fänger-ODNs durch Chemisorption auf der Goldelektrode als selbst-assoziiierende Monolage (SAM) aufgebracht. Somit wurde eine gerichtete Orientierung der Fänger auf der Goldelektrode erreicht, was eine sterisch unbeschränkte Interaktion mit der Analytnukleinsäure erlaubt. Die Immobilisierung von gemischten SAMs bestehend aus Thiol-modifizierten Fänger-ODNs und kürzeren Thiol-modifizierten Molekülen erweist sich als vorteilhaft, da dies definierte Abstände zwischen zwei Fänger-ODNs ermöglicht, was die Hybridisierungseffizienz steigert (Pan & Rothberg 2005). Daneben zeigte sich, dass eine Nachsättigung mit längeren Thiol-modifizierten Molekülen einen positiven Einfluss auf die Selektivität besitzt. Langkettige Reagenzien bilden sehr stabile SAMs aus, da diese durch zahlreiche van der Waals-Wechselwirkungen stabilisiert werden. Neben der Verhinderung unspezifischer Bindung von Proteinen und der Gewährleistung eines ausreichenden Abstandes zwischen den Fänger-ODNs erzeugen diese Oligoethylenglykole auch eine SAM-Schicht, in die nicht-perfekt komplementäre Analytnukleinsäuremoleküle nicht oder nur vermindert eindringen können (Boozer *et al.*, 2007). Diese Art der Immobilisierung lieferte eine Immobilisierungsdichte von etwa 8 pmol Fänger-Moleküle/cm². Mit radioaktiv markierter DNA wurde eine Oberflächendichte von etwa 12 pmol/cm² bestimmt (Boon *et al.*, 2002a). In Anwesenheit von Mg²⁺ können sehr dicht gepackte SAMs erzeugt werden (Kelley *et al.*, 1997; Gorodetsky & Barton 2006), die jedoch ineffizientere Hybridisierungseigenschaften aufweisen als die lockerer gepackten DNA-SAMs (Shchepinov *et al.*, 1997). Maximal wurden bisher Immobilisierungsraten von etwa 40 pmol/cm² erreicht, was jedoch lediglich etwa 75% der theoretisch maximalen Beschichtungsrate von 60 pmol/cm² entspricht unter der Annahme senkrecht zur Goldelektrode orientierter DNA-Doppelhelices. Dies ist ein Hinweis, dass die Fänger nicht senkrecht zur Oberfläche ausgerichtet sind, sondern in einem bestimmten Winkel (Shchepinov *et al.*, 1997; Gorodetsky *et al.*, 2008). Für eine effiziente Hybridisierung der 16S rRNA an die Fängersequenz ist ein gewisser Abstand von der Elektrodenoberfläche erforderlich. So zeigten Shchepinov *et al.* (1997), dass mit einer Spacerlänge von 40 Atomen zwischen Glasoberfläche und Fängersequenz ein 150-facher Anstieg des Hybridisierungssignals erzielt wurde. In dieser Arbeit wurde ein neun Nukleotide langer Thymidin-Linker verwendet, da die Nukleobase Thymin die geringste Wechselwirkung mit Gold zeigt (Piana *et al.*, 2006).

Southern *et al.* (1999) zeigten, dass kurze Zielmoleküle besser mit immobilisierten Fänger-ODNs interagieren können als längere Analytnukleinsäuren. Dies ist durch die wahrscheinlichere Ausbildung von Sekundär- oder Tertiärstrukturen bei längeren Nukleinsäuren begründet. Durch intramolekulare Watson-Crick-Basenpaarung bleiben bestimmte Sequenzabschnitte des Analyten von einer Wechselwirkung mit immobilisierten Fängermolekülen ausgeschlossen. Die 16S rRNA mit einer Länge von etwa 1.500 nt zeigt eine ausgesprochene Sekundär- und Tertiärstruktur mit

intramolekularen Watson-Crick-Basenpaarungen, einer Vielzahl von anderen Interaktionen (Hoogsteen- oder Zucker-vermittelte Wechselwirkung) und Schleifenstrukturen (Leontis & Westhof 2001). Dabei wird die Tertiärstruktur der ribosomalen RNA in erster Linie durch nicht-Watson-Crick-Basenpaarungen festgelegt (Wimberly *et al.*, 2000; Ban *et al.*, 2000). Für eine effiziente Hybridisierung der 16S rRNA ist also eine Denaturierung der vorhandenen Strukturelemente essentiell. So wurde mit Fluoreszenz-markierten Oligonukleotiden gezeigt, dass die hier verwendete V6-Region der 16S rRNA *in situ* nur ungenügend zugänglich ist (Behrens *et al.*, 2003). Weiterhin wurde demonstriert, dass lange überstehende Enden des Analyten sowohl das Detektionssignal als auch die Spezifität negativ beeinflussen (Stedtfeld *et al.*, 2007a). Zusätzlich kommt es bei Verwendung sehr langer Zielnukleinsäure und einer hohen Dichte an Fängermolekülen auf der Oberfläche zu einer Interaktion der Fänger-ODNs untereinander. Dies führt zur Ausbildung einer Polyelektrolytbürste, welche die Hybridisierungsrate herabsetzt (Halperin *et al.*, 2005). Deshalb wurde in dieser Arbeit eine Kombination aus Fragmentierung und Helfer-ODNs verwendet, um die Tertiärstruktur der 16S rRNA zu zerstören und somit die Hybridisierungsreaktion effizienter zu machen. Obwohl eine Vielzahl von RNA-Fragmentierungstechniken existieren, wie etwa die Verwendung von Nukleasen (Pinder & Gratzner 1970), auf Radikal-Reaktionen basierende Fragmentierung (z. B. Cu-Phenanthrolinen, Fe-EDTA) (Kelly *et al.*, 2002) oder Uracil-DNA-Glykosylase-vermittelte Fragmentierung (von Wintzingerode *et al.*, 2002) wurde in dieser Arbeit aufgrund der einfachen und schnellen Durchführung die Metallionen-katalysierte Basenhydrolyse angewandt (Browne 2002). Dabei zeigt sich bei einer Fragmentierungstemperatur von 95°C, dass nach 5 min RNA-Fragmente über einen relativ breiten Bereich verteilt vorlagen, wobei die Mehrheit der Fragmente eine Länge von etwa 150 nt aufwies. Diese Fragmentlänge ergab das maximale elektrochemische Detektionssignal, während eine Verlängerung der Fragmentierungszeit die Signale bereits reduzierte. Ähnliche Studien mit viraler RNA zeigten, dass bei einer Fragmentierungstemperatur von 95°C nach 3 min Fragmente von etwa 200 nt erhalten werden, während nach 10 min keine längeren Fragmente mehr vorhanden sind und nach 30 min Fragmentierung alle RNA-Fragmente kleiner als 38 nt sind (Mehlmann *et al.*, 2005).

Da die RNA-Fragmente auch nach Fragmentierung aufgrund ihrer Länge noch Strukturelemente ausbilden können und da sich der konservierte Detektorbereich nicht nahtlos an den variablen Fängerbereich anschließt, wurden Helfer-ODNs eingesetzt. Helfer-ODNs sind kurze DNA-Sonden, die in unmittelbarer Nähe des Fänger- bzw. Detektor-ODNs an die rRNA binden und so die Ausbildung der lokalen Sekundärstruktur unterbinden. Darüberhinaus halten Helfer-ODNs durch Hybridisierung mit einem Bereich der RNA, der in der nativen Struktur der rRNA eine intramolekulare Basenpaarung eingeht, die Bindungsstelle im einzelsträngigen Zustand (Fuchs *et al.*, 2000; Small *et al.*, 2001). Beide Mechanismen gewährleisten eine

effizientere Hybridisierung zwischen rRNA und Fänger-Sonden. Entscheidend dabei ist auch die optimale Einpassung des Helfer-ODNs in die Lücke zwischen Fänger- und Detektor-ODN. Bereits kleinste Lücken unterbrechen die koaxiale Basenstapelung und sorgen für einen dramatischen Abfall des Messsignals. So zeigten etwa Pioch *et al.* (2008a), dass weiter entfernt an RNA hybridisierende DNA-Sonden im Vergleich zu direkt benachbart bindenden Sonden lediglich ein Signal von 5 – 15% ergeben. Bei der Detektion von *E. coli* 16S rRNA ergab bereits eine Lücke von 1 nt zwischen Fänger- und Detektor-ODN einen Signalabfall um etwa 15%. Eine Lücke von 3 nt führte bereits zu einem Signalabfall auf 20% des Ursprungssignals mit direkt benachbart hybridisierenden DNA-Sonden (Liao *et al.*, 2007). DNA-Duplexes mit Lücken sind wesentlich weniger stabil als DNA-Duplexes, die aufgrund der simultanen benachbarten Hybridisierung mehrerer DNA-Sonden an komplementäre RNA oder DNA entstehen. Grund dafür ist die Ausbildung einer perfekten koaxialen Basenstapelung, die im Falle größerer Lücken zwischen den DNA-Sonden nicht auftritt (Pyshnyi *et al.*, 2001; Pyshnyi *et al.*, 2006). Thermodynamische Betrachtungen zeigten, dass im Falle der koaxialen Basenpaarung ein Energiegewinn von mindestens 1,4 kcal/mol bis zu 2,4 kcal/mol im Vergleich zu fehlender koaxialer Basenpaarung erzielt wird (Lane *et al.*, 1997). Weiterhin wurde bewiesen, dass die koaxiale Hybridisierung mehrerer kurzer DNA-Fragmente eine schnellere Assoziations-, eine langsamere Dissoziationskinetik und eine signifikant erhöhte Sensitivität mit sich bringt (Yuan *et al.*, 2008).

Die Hybridisierungszeit ist mit 20 – 30 Minuten relativ kurz verglichen mit vier bis 24 Stunden für *Microarray*- oder Northern Blot-Analysen (Streit *et al.*, 2009). Grund dafür ist das geringe Hybridisierungsvolumen von nur 10 µL. Für eine schnelle Hybridisierungsreaktion müssen die komplementären Nukleinsäuren in hohen Konzentrationen vorliegen, um die Wahrscheinlichkeit des Aufeinandertreffens und Reagierens zu erhöhen. Viele biochemische Reaktionen, u.a. auch die Nukleinsäurehybridisierung, sind diffusionskontrolliert. Das Aufeinandertreffen zweier Reaktionspartner in einer Lösung erfolgt aufgrund der Brownschen Molekularbewegung, die vom Diffusionskoeffizienten abhängig ist. Die Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens zweier komplementärer Nukleinsäuren ist in mikrofluidischen Strukturen stark erhöht, da die Zeit, die ein Molekül benötigt um die Distanz d zurückzulegen, mit $1/d^2$ abnimmt (Janasek *et al.*, 2006). Ein weiterer Vorteil von miniaturisierten chemischen Reaktionssystemen ist die Möglichkeit viele Reaktionen parallel durchzuführen. So können auf eine 1 cm² große Multititerplatte 250.000 getrennte Vertiefungen mit einer Länge von 10 µm aufgebracht werden. Das heißt die Zahl an unabhängigen Vertiefungen pro Fläche steigt mit $1/d^2$ an (Lee *et al.*, 2005).

4.2.2 Selektivität und Sensitivität der 16S rRNA-Nachweismethode

Die Selektivität der Bakterien-detektion wurde durch Verwendung unterschiedlicher Bakterienspezies überprüft. Dabei war eine Diskriminierung anhand der 16S rRNA-

Sequenzen innerhalb bestimmter Familien bis hin zu Stammdiskriminierung möglich. Bei entsprechender Wahl des 16S rRNA-Detektionsbereiches konnten bereits erfolgreich *Vibrio* spp. Subtypen mittels *Microarray*-Analyse identifiziert werden (Eom *et al.*, 2007). Die hohe Selektivität ist mit den gewählten stringenten Hybridisierungsbedingungen zu erklären. Eine Hybridisierungstemperatur von 65°C sorgt zum einen für die Auflösung von möglichen Sekundärstrukturelementen der 16S rRNA-Fragmente (Mir & Southern 1999). Zum anderen erlaubt eine Hybridisierungstemperatur nahe am T_m die bessere Diskriminierung von einzelnen oder wenigen Basenaustauschen (Letowski *et al.*, 2004). Ein stringenter Waschschrift hatte nur wenig Einfluß auf die Spezifität. Pozhitkov *et al.* (2007b) bewiesen, dass die Dissoziation eines DNA-Duplexes stark von der Temperatur und der Duplexsequenz abhängig ist und dass in einigen Fällen perfekt komplementäre DNA-Duplexes eher dissoziieren als nicht perfekt komplementäre. Jedoch verläuft die Assoziation komplementärer ODNs an Oberflächen wesentlich schneller als die nicht komplementärer ODNs (Demidov & Frank-Kamenetskii 2004; Golovlev *et al.*, 2007). Bis zu einem 100-fachen Überschuss an Fremd-RNA (*S. cerevisiae* Gesamt-RNA) wurde weder eine Beeinflussung der Spezifität noch der Hybridisierungskinetik festgestellt. Chemilumineszente Detektion der RNA/DNA-Hybridisierung in Mikrotiterplatten ergab bei einem 5- bis 1.000-fachen Überschuss an nicht-verwandten Bakterien keinen Einfluss auf das Detektionssignal (Bockisch *et al.*, 2005). Der spezifische Nachweis der Prostata-spezifischen Antigen-cDNA mittels PCR und *Microarray*-Analyse gelang selbst bei einem 10⁸-fachen Überschuss an nicht spezifischer DNA (Nurmi *et al.*, 2000). In dieser Arbeit wurde sowohl die Möglichkeit der Diskriminierung von *Listeria monocytogenes* und anderer *Listeria* spp. als auch von bestimmten pathogenen (EHEC) und apathogenen *E. coli*-Stämmen gezeigt. Für die spezifische Identifikation von *L. monocytogenes* wurde auf eine zweite Region innerhalb der 16S rRNA zurückgegriffen. Diese weist bis zu vier Basenaustausche im Vergleich zu anderen *Listeria* spp. auf (Czajka *et al.*, 1993). Simultaner Einsatz zweier EST2-ODN-Reporterkonjugate erlaubte also die Detektion von *Listeria* spp. allgemein und eine weitere Klassifizierung auf Speziesebene. Weiterhin wurden in der V6-Region der 16S rRNA sechs Basenaustausche zwischen dem pathogene *E. coli*-Stamm O157:H7 ATCC 43895 und *E. coli* K12 festgestellt. Beide Stämme konnten durch RNA/DNA-Hybridisierung und elektrochemische Detektion unterschieden werden. Jedoch sollte hier in Betracht gezogen werden, dass *E. coli* sieben rDNA-Operons besitzt, die unterschiedliche Sequenzen aufweisen. Diese intragenomische Heterogenität der 16S rRNA beeinflusst die phylogenetische Aussagekraft vor allem auf Spezies- bzw. Subspeziesebene. Deshalb wurden auch immer wieder neue molekulare Markergene für die Analyse von mikrobiellen Gemeinschaften, wie etwa das *rpoB*-Gen (RNA-Polymerase Untereinheit β), für die Speziesdiskriminierung vorgeschlagen (Case *et al.*, 2007). Weiterhin existiert eine Variation der 16S rRNA-Sequenzen innerhalb der

Speziesebene (Woo *et al.*, 2008). So weist zwar der *E. coli*-Stamm O157:H7 ATCC 43895 die Basenaustausche zu *E. coli* K12 auf, jedoch besitzen andere pathogene *E. coli*-Stämme in der V6-Region keine Sequenzunterschiede zu apathogenen *E. coli*. Dennoch konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass 16S rRNA isoliert aus *E. coli*-Laborstämmen und auch aus einigen Lebensmittelisolaten (z. B. *E. coli* 163) alle ähnliche Detektionssignale nach RNA/DNA-Hybridisierung aufweisen, was auf identische 16S rRNA-Sequenzen im Detektionsbereich schließen lässt. Im Zuge der Validierung des elektrochemischen Nachweissystems mit Fleischproben wurden aber einige *E. coli*-Stämme mit Fehlbasenpaarungen im 16S rRNA-Nachweisbereich isoliert. Mittels elektrochemischer Detektion der RNA/DNA-Hybridisierung konnten 500 KbE *E. coli* detektiert werden. Unterschiedliche Probenvorbereitungsmethoden bestätigten diese niedrige Nachweisgrenze. So konnte durch Verdünnung von *E. coli* RNA ein Detektionslimit von 400 KbE erreicht werden. Eine noch niedrigere Nachweisgrenze mit 80 KbE *E. coli* wurde mit *in vitro*-transkribierter RNA erreicht, da bei diesem Ansatz der Fragmentierungsschritt wegfällt. Da es bei der alkalischen Fragmentierung in Gegenwart von Magnesiumionen statistisch auch zur Spaltung innerhalb des Detektionsbereichs kommen kann, führt dies zu einer etwa fünffachen Verschlechterung der Nachweisgrenze. Deswegen wurde in dieser Arbeit ein neuartiger Ansatz zur spezifischen Spaltung von RNA getestet. Die Spaltung von 16S rRNA mit DNAzymen, welche selektiv den gewünschten Detektionsbereich ausschneiden, zeigte verglichen mit der Spaltung unter alkalischen Bedingungen ein geringfügig besseres elektrochemisches Signal. Jedoch sprechen die langen Inkubationszeiten und der Einsatz mehrerer ODNs gegen eine weitere Anwendung der DNAzym-Spaltung. In der Vergangenheit wurden DNAzyme bereits zur Sequenz-spezifischen Spaltung und zum Nachweis bestimmter 16S rRNA-Sequenzen und anschließender gelelektrophoretischer Detektion der Spaltprodukte eingesetzt (Suenaga *et al.*, 2005).

Grundsätzlich stellte sich das etablierte elektrochemische 16S rRNA-Nachweissystem als sehr sensitiv heraus. Elsholz *et al.* (2006) erreichten für die direkte Detektion von *E. coli* 16S rRNA mit interdigitalen Goldelektroden und Nachweis der enzymatischen Aktivität der AP ein Detektionslimit von etwa 4×10^5 KbE *E. coli*. Dabei erfolgte die enzymatische Markierung des RNA/DNA-Hybrids nicht wie in dieser Arbeit über ein kovalentes Protein-DNA-Konjugat, sondern über Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung. In einer anderen Arbeit wurde der direkte 16S rRNA-Nachweis aus uropathogenen Keimen mittels RNA/DNA-Hybridisierung und anschließender elektrochemischer Detektion vermittelt durch die katalytische Aktivität der Meerrettich-Peroxidase (HRP) erreicht. Der Nachweis der Hybridisierungsreaktion erfolgte über Antigen-Antikörper-Wechselwirkung, indem ein Fluorescein-modifiziertes Detektor-ODN verwendet wurde und als Reporterkonjugat Meerrettich-Peroxidase konjugierte Fluorescein-spezifische Antikörper eingestzt wurden. Mit diesem Ansatz wurde eine Nachweisgrenze von 3×10^3 KbE uropathogene Bakterien in Reinkultur bzw. 4×10^4 KbE/mL uropathogene

Keime in Urinproben erzielt (Liao *et al.*, 2006). Dieses erzielte Detektionslimit erlaubt eine zuverlässige Diagnose von bakteriellen Urogenitaltraktinfektionen, da als mikrobiologisches Kriterium für die Diagnose einer bakteriellen Urogenitaltraktinfektion ein Grenzwert von 10^5 KbE/mL überschritten sein muss (Wilson & Gaido 2004). Dieses Beispiel zeigt das Potential auf Nukleinsäurehybridisierung beruhender elektrochemischer Biochips für die medizinische Diagnostik, da hier verglichen mit traditionellen mikrobiologischen Methoden innerhalb kurzer Zeit eine diagnostische Aussage gemacht werden kann und die richtigen Behandlungsschritte schnell eingeleitet werden können. Um dieses Ziel zu erreichen ist jedoch die Integration der Probenvorbereitung, d.h. in erster Linie die RNA-Isolation, in die Analyseprozedur von entscheidender Bedeutung (Batt 2007). Deshalb wurde in dieser Arbeit ein Protokoll zur simultanen bakteriellen Zellyse und RNA-Fragmentierung entwickelt. Das Zellysate konnte anschließend ohne weitere Behandlung für die Hybridisierungsreaktion eingesetzt werden. Mit dieser Probenvorbereitungsmethode wurde eine Nachweisgrenze von 5.000 KbE *E. coli* innerhalb von etwa 50 min erreicht, während die Bearbeitungszeit mit RNA-Aufreinigung insgesamt 75 min betrug. Huhtamella *et al.* (2007) entwickelten für den Nachweis von *Lactobacillus* spp. in Bierproben ebenfalls ein chemisches Schnelllyseverfahren in Gegenwart des Detergenzes SDS. Je nach untersuchter Spezies konnte dieses elektrochemische Nachweissystem bis zu 10^5 KbE Laktobazillen detektieren. Die einfache und schnelle Lyse uropathogener Keime gelang durch eine Kombination aus enzymatischer (Lysozym) und alkalischer Lyse in Gegenwart von NaOH. Die Gesamtprozedur benötigte einschließlich zweier Hybridisierungsschritte und elektrochemischer Detektion etwa 50 min (Liao *et al.*, 2007).

Die Fluoreszenz-basierte direkte Detektion der 16S rRNA auf Glasoberflächen ist in der Regel wesentlich insensitive verglichen mit der elektrochemischen Detektion. Für die mikrobielle Analyse von Bodenproben benötigten Chandler *et al.* (2003) mindestens zwei μg Gesamt-RNA, was 4×10^7 KbE Bakterien entspricht. Straub *et al.* (2005) entwickelten eine automatische Plattform für die parallele Analyse mehrerer pathogener Keime und erreichten mit Fluoreszenzdetektion eine Nachweisgrenze von 10^8 KbE *E. coli* O157:H7. Die meisten bisher in der Literatur beschriebenen Ansätze der Bakteriendetektion beruhen auf PCR-Amplifikation eines bestimmten Marker-Gens und anschließendem Nachweis des Amplifikats durch DNA/DNA-Hybridisierung. Nach PCR-Amplifikation der rRNA-Gene mit einem biotinylierten Primer und anschließender Denaturierung des PCR-Amplifikats konnte dieses auf Fluoreszenz-codierte Polystyrolkugeln gebunden werden. Nach Zugabe eines Phycoerythrin-Streptavidin-Konjugats bindet dies an die Biotin-Gruppe und mittels Durchflusszytometrie wird die Anwesenheit der beiden Fluoreszenzfarbstoffe nachgewiesen. Ein Detektionslimit von 2,5 KbE/mL *E. coli* und 78 KbE/mL *Campylobacter jejuni* wurde mit diesem Ansatz erreicht (Dunbar *et al.*, 2003).

4.2.3 Validierung der elektrochemischen Nachweismethode mit realen Fleischproben

Das in dieser Arbeit etablierte Nachweissystem sollte für die direkte *E. coli*-Detektion in realen Fleischproben angewendet werden. Mit ca. 500 KbE *E. coli* in der exponentiellen Wachstumsphase stellte sich die Sensitivität des direkten 16S rRNA Nachweises in der bisher etablierten Form als zu gering dar, um die in der Verordnung EG 2073/2005 definierten unteren Grenzwerte von 10 KbE/g zu detektieren. Zudem variiert der 16S rRNA-Gehalt von *E. coli* in Abhängigkeit des physiologischen Zustandes um das bis zu zehnfache mit einem Maximum in der exponentiellen Wachstumsphase. Da *E. coli* in der Lebensmittelmatrix während der Prozessierung eher suboptimale Lebensbedingungen vorfindet, ist die Sensitivität des 16S rRNA-Direktnachweises aufgrund des vermutlich geringeren Ribosomengehaltes gegenüber exponentiell wachsenden Bakterien reduziert. Aus diesen Gründen wurde eine Anreicherung etabliert, die *E. coli* zum einen in die exponentielle Wachstumsphase versetzt, in der sich die höchste 16S rRNA-Konzentration in den Zellen befindet. Zum anderen wurde die Anreicherungszeit dahingehend optimiert, dass eine hohe Sensitivität des Gesamtnachweises bei minimal nötigem Zeitaufwand erreicht wird. In den Untersuchungen zur Voranreicherung stellte sich eine Anreicherung für 5 h in gepuffertem Peptonwasser als die beste der untersuchten Varianten heraus und durch Biochip-Messungen bestätigt (Heidenreich *et al.*, 2009).

Die Optimierung der RNA-Isolierung durch eine Erhöhung der Lyseeffizienz ermöglichte die Etablierung einer Dreischritt-Lyse, bestehend aus Lysozym-, Proteinase K- und Ultraschallbehandlung, die zu einer erheblichen Steigerung der Gesamt-RNA-Ausbeute für *E. coli* in der Lebensmittelmatrix führte. Eine erhebliche Steigerung der RNA durch die Dreischritt-Lyse wurde auch für *Listeria monocytogenes* in Reinkultur gezeigt (Heidenreich *et al.*, 2009).

Der etablierte Gesamtnachweis von *E. coli* wurde abschließend in einem Serienexperiment zur Qualitätskontrolle von 25 Fleischproben verwendet. Die Ergebnisse belegten den gesicherten Nachweis von 2.000 KbE *E. coli* pro mL Anreicherung sowie die hohe Sensitivität der entwickelten Nachweisprozedur für *E. coli* von ≤ 1 KbE/mL Tropfsaft nach einer Anreicherung von fünf Stunden. Die entwickelte Prozedur liefert Analyseergebnisse in ca. sieben Stunden, also innerhalb eines Arbeitstages.

Die meisten Berichte über die Detektion lebensmittelpathogener Keime beruhen auf der Anwendung der PCR bzw. Multiplex-PCR (Settanni & Corsetti 2007). Houf *et al.* (2000) verwendeten einen Multiplex-PCR-Ansatz zum Nachweis von *Arcobacter* spp. in Geflügelfleisch. Nach einer 24-stündigen Voranreicherung erreichte diese Nachweismethode ein Detektionslimit von 10^2 KbE/g für *Ar. skirrowii* bzw. 10^3 KbE/g für *Ar. butzleri* und *Ar. cryaerophilus*. Die parallele Detektion von *E. coli*, *S. typhimurium*, *V. cholerae* und *S. aureus* innerhalb von fünf Stunden mittels PCR-

Amplifikation genomischer Bereiche erlaubte die Detektion von minimal 10^3 KbE/mL Wasserprobe (Kong *et al.*, 1995). Eine auf PCR basierende Methode zum Nachweis von *Cm. jejuni*, *E. coli* O157:H7 und *Salmonella* spp. in einer Vielzahl von Roh- und Fertiggerichten (darunter Hackfleisch, Wassermelone, Karotten oder Milch) gestattet den Nachweis von bis zu 10^6 KbE *Salmonella* spp. und *E. coli* O157:H7 /Reaktion bzw. 5×10^4 KbE *Cm. jejuni*/Reaktion (Gilbert *et al.*, 2003). Ein sehr gutes Detektionslimit für *E. coli*, *S. typhimurium*, *V. vulnificus*, *V. cholerae* und *V. parahaemolyticus* in Austern nach PCR-Amplifikation genomischer Bereiche (*uidA*-, *cth*-, *invA*-, *ctx*- bzw. *tl*-Gene) berichteten Brasher *et al.* (1998). Nach bakterieller DNA-Aufreinigung, PCR-Amplifikation, Hybridisierungsreaktion und kolorimetrischer Detektion der Amplifikate erzielen diese Autoren ein Detektionslimit $\leq 10^1 - 10^2$ Zellen.

Ein neuartiger Ansatz ist die piezoelektronische Detektion von PCR-Produkten. So wurde das *eaeA*-Gen aus *E. coli* O157:H7 in Hackfleisch mittels PCR amplifiziert und mittels piezoelektronischem Biosensor nachgewiesen. Das Detektionslimit dieser Methode beträgt etwa 530 cfu/g (Chen *et al.*, 2008).

Es wird deutlich, dass der hier entwickelte Direktnachweis von 16S rRNA ähnliche Nachweisgrenzen erreicht wie die eben beschriebenen Methoden mit vorgeschalteter PCR-Amplifikation (und evtl. Voranreicherung). Neben der erheblichen Zeitersparnis der hier erarbeiteten Methode im Vergleich zum konventionell mikrobiologischen Nachweis von Mikroorganismen in Lebensmitteln bietet die in dieser Arbeit entwickelte Detektionsprozedur das Potential zur einfachen Integrierbarkeit in ein *Lab-on-a-Chip*-System. Dagegen können auf PCR basierende Nachweismethoden nur mit hohem Aufwand und Kosten in ein automatisierbares System integriert werden.

Jedoch werden alle modernen Nachweismethoden, einschließlich PCR, vermehrt ein Augenmerk auf die Probenvorbereitung legen und auch traditionell mikrobiologische Gesichtspunkte in ihre Analysen und Ergebnisse einbeziehen müssen (Brehm-Stecher *et al.*, 2009).

Die hohe Sensitivität des etablierten elektrochemischen 16S rRNA-Nachweissystems erlaubt ebenfalls die schnelle Detektion von Antibiotikaresistenzen. Dazu erfolgte das Wachstum von Antibiotika-resistenten Bakterien in Anreicherungsmedium mit bestimmten Antibiotika-Zusätzen. Bereits nach vier bis fünf Stunden ließ sich 16S rRNA aus Antibiotika-resistenten Keimen nachweisen. Traditionelle Methoden des Antibiotikanachweises beruhen auf der Reinkultivierung verdächtiger Kolonien aus klinischen Proben. Um ein Antibiotika-Profil zu erhalten, benötigt man mindestens 24-48 h (Fluit *et al.*, 2001), weshalb das hier entwickelte System einen deutlichen Zeitvorteil darstellt. Dennoch bieten sich für die Antibiotikaresistenzanalyse vor allem PCR-Nachweisverfahren an, da diese sensitiv sind und keine Kultivierung oder Anreicherung der Mikroorganismen benötigen. Weiterhin können damit direkt die genomisch kodierte Antibiotikaresistenzgene detektiert werden (Zhu *et al.*, 2007). Ein

weiteres Problem bei Wachstum-nachweisenden Ansätzen ist das Vorkommen von gering resistenten Stämmen (Martinez & Lin 2006). Diese würden zwar geringes Wachstum zeigen, könnten aber innerhalb der vierstündigen Anreicherungszeit nicht elektrochemisch nachgewiesen werden, da ihre Zellzahl noch unter der erforderlichen Nachweisgrenze liegen würde.

4.3 Vergleich mit alternativen 16S rRNA-Detektionsmethoden

Der enzymatische Nachweis von Nukleinsäurehybridisierungen erfolgt meist mit Reporterenzym-Streptavidin-Konjugaten. Deshalb wurde in dieser Arbeit ein EST2-Streptavidin-Konjugat (EST2-SA) hergestellt und hinsichtlich Selektivität und Sensitivität mit dem kovalenten EST2-ODN-Konjugat verglichen.

4.3.1 Anbindung des Reporterenzym über Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung

Dabei wurde zum einen die Vier-Komponenten-Hybridisierung bestehend aus immobilisiertem Fänger-ODN, Helfer-ODN, biotinyliertem Detektor-ODN und fragmentierter 16S rRNA, zum anderen der Nachweis von enzymatisch am 5'-Ende Biotin-markierten RNA-Fragmenten untersucht und der Vier-Komponenten-Hybridisierung unter Verwendung von EST2-ODN-Reporterkonjugat gegenübergestellt. Hinsichtlich Selektivität wurden in dieser Arbeit keine Unterschiede zwischen der Verwendung von EST2-SA- und EST2-ODN-Konjugaten gefunden. Auch andere wissenschaftliche Arbeiten zeigten, dass unter Verwendung eines Streptavidin-AP-Konjugats selbst die nah verwandten Stämme *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* unterschieden werden können (Elsholz *et al.*, 2006). Innerhalb der gewählten Fängerregionen weisen beide Stämme drei Basenaustausche auf. Bei Vermeidung von unspezifischer Bindung von Streptavidin-Reporterkonjugaten auf die Goldoberfläche ist kein Einfluss auf die Spezifität zu erwarten, da das Streptavidin-Reporterenzym-Konjugat erst nach Ausbildung des Nukleinsäurehybrids im letzten Schritt zugegeben wird.

Auch die enzymatische terminale Biotin-Markierung von fragmentierter Gesamt-RNA und die anschließende elektrochemische Detektion der RNA/DNA-Hybridisierung erlaubte die selektive Detektion von etwa 10^4 KBE *E. coli*. Inwieweit dieses Markierungssystem unter Praxisbedingungen eingesetzt werden kann, ist fraglich, da bei kleinen Substratmengen, d.h. geringer rRNA-Konzentration, die enzymatische Reaktion aufgrund der Michaelis-Menten-Kinetik deutlich langsamer und ineffizient abläuft.

Der Vergleich der unterschiedlichen Nachweismethoden der Vier-Komponenten-Hybridisierung hinsichtlich Sensitivität zeigt, dass bei gleichen Bedingungen das EST2-ODN-Konjugat ein 100-fach besseres Detektionslimit im Falle der elektrochemischen Detektion als das EST2-SA-Konjugat erreichte (Tab. 4-1).

Tabelle 4-1: Vergleich der unterschiedlichen Nachweisgrenzen bei Verwendung alternativer Detektionsmethoden.

Nachweismethode	Transduktionsmethode	Nachweisgrenze für <i>E. coli</i> [KbE]
rRNA/DNA-Sandwich-Hybridisierung + EST2-ODN-Konjugat	elektrochemisch	4×10^2
rRNA/DNA-Sandwich-Hybridisierung + EST2-Streptavidin-Konjugat		1×10^4
Markierung der RNA mit Biotin + EST2-Streptavidin-Konjugat		2×10^4
<i>Molecular Beacon</i> -Biosensor		5×10^4
rRNA/DNA-Sandwich-Hybridisierung + EST2-ODN-Konjugat	photometrisch	5×10^6

Die beobachtete Diskrepanz zwischen der Anbindung des Reporterenzym über ein kovalentes EST2-ODN-Konjugat bzw. über Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung zeigt den Vorteil des kovalenten EST2-ODN-Konjugats mit dessen spezifischer Modifikations- und Kopplungschemie. Es wurde bereits gezeigt, dass eine DNA-vermittelte Immobilisierung von Reporterenzymen wesentlich sensitiver als die Anbindung über Biotin-Streptavidin-Wechselwirkung ist (Niemeyer *et al.*, 1999a; Niemeyer *et al.*, 1999b). Darüber hinaus kommt zum Tragen, dass das EST2-ODN-Konjugat einen wesentlich kleineren hydrodynamischen Radius aufweist als das EST2-SA-Konjugat und somit eine Detektion von 16S rRNA über einen ausgedehnten dynamischen Bereich erlaubt (s. Abschnitt 4.1). Weiterhin wurde gezeigt, dass eine Konjugation zwischen nativem Streptavidin und Fluorophoren die Bindungsaffinität für Biotin erniedrigt, da durch die zufällige Modifikation an Aminogruppen unter anderem auch der Lysin-Rest an Position 121 modifiziert wird. Dieser liegt räumlich nahe an der Ligandenbindungstasche (Cameron *et al.*, 2001; Kwong *et al.*, 2009).

4.3.2 16S rRNA-Nachweis mittels Stamm-Schleife-Strukturen

Der Einsatz von linearen Fängermolekülen sollte desweiteren mit der Verwendung von Fängern mit Haarnadelstruktur verglichen werden. Als Basis für dieses neuartige Nachweissystem dient dasselbe Prinzip, das dem *Molecular Beacon* zugrunde liegt. Dabei kommt eine Sonde mit Stamm-Schleife-Struktur zum Einsatz, bestehend aus einer spezifischen Erkennungssequenz (Schleife), flankiert von kurzen selbstkomplementären Bereichen (Stamm). An je einem Ende des Stammes ist die Sonde mit einem Fluorophor bzw. einem *Quencher* markiert. Im ungebundenen Zustand hybridisieren die komplementären flankierenden Bereiche miteinander und die beiden Enden des Stammes liegen dicht beieinander, was zu einer Löschung der Fluoreszenz

des Fluorophors durch den *Quencher* führt. In Anwesenheit des Analyten kommt es zur Hybridisierung zwischen den komplementären Bereichen und zu einer Änderung der Konformation, wodurch die Stamm-Schleife-Struktur aufgebrochen wird. Somit befindet sich der *Quencher* weit vom Fluorophor entfernt und keine Löschung der Fluoreszenz tritt ein (Tyagi & Kramer 1996). Eine elektrochemische Variante dieses Ansatzes verwendet immobilisierte Stamm-Schleife-Strukturen, die an einem Ende eine Redox-Markierung tragen. Nur im geschlossenen Zustand ist die Redox-Markierung nahe genug an der Goldelektrode, um einen effektiven Elektronentransfer zu gewährleisten (Vallee-Belisle *et al.*, 2009). Dabei handelt es sich jedoch um ein Nachweissystem, bei dem das Messsignal nach erfolgreicher Hybridisierung verschwindet („*signal-off*“). Grundsätzlich ist das Ziel die Entwicklung eines Biosensors, bei dem nach erfolgter Wechselwirkung zwischen biologischer Erkennungsdomäne und Analyt ein Signal entsteht („*signal-on*“). Letztere sind weniger störungsanfällig, da man spezifisch die Entstehung eines Messsignals beobachten kann. Dagegen kann eine Signalauslöschung von anderen Ursachen als der gewünschten Reaktion ausgelöst werden. Deshalb sollte in dieser Arbeit ein Nachweissystem, bei welchem eine Stamm-Schleife-Struktur spezifisch für *E. coli* 16S rRNA immobilisiert auf der Goldelektrode vorliegt, entwickelt werden. Ein Ende des Stammes wurde mittels Thiol-Gold-Wechselwirkung auf der Elektrode immobilisiert, das andere Ende wurde mit Biotin modifiziert. In der geschlossenen Konformation ist das Biotin aufgrund der Nähe zur Goldelektrode nicht zugänglich („sterisches Quenchen“), während nach Hybridisierung und Öffnen der Stamm-Schleife-Struktur das EST2-SA-Konjugat an das nun zugängliche Biotin bindet und ein elektrochemisches Messsignal erzeugen kann. Das Prinzip des „sterischen Quenchens“ wurde erstmals von Bockisch *et al.* (2005) beschrieben. Dabei wurden Stamm-Schleife-Strukturen in Mikrotiterplatten immobilisiert und nach Hybridisierung mit bakterieller 16S rRNA erfolgte die Reaktion zwischen Biotin und AP-SA-Konjugat und der chemilumineszente Nachweis der Enzymreaktion. Dabei erzielten die Autoren ein Detektionslimit von 4 ng *E. coli* RNA, was etwa 8×10^4 KBE *E. coli* entspricht. Die elektrochemische Detektion von bakterieller 16S rRNA mit immobilisierten Stamm-Schleife-Strukturen ist bisher noch nicht beschrieben. Jedoch wurden diese schon für die Detektion von DNA eingesetzt. Liu *et al.* (2008a) verwendeten einen Digoxigenin-markierten *Molecular Beacon*. Nach Hybridisierung mit zur Schleife komplementärer DNA konnte ein anti-Digoxigenin-Antikörper-HRP-Konjugat an Digoxigenin binden und der enzymatische Umsatz der Wasserstoffperoxidproduktion elektrochemisch detektiert werden. Mit diesem Ansatz wurde eine Nachweisgrenze von 10 fM synthetischer DNA erreicht. Einen ähnlichen Aufbau verwendeten Wei *et al.* (2008), jedoch verwendeten sie einen Fluorescein-markierten immobilisierten *Molecular Beacon* und zum Nachweis folglich ein anti-Fluorescein-Antikörper-HRP-Konjugat. Mit diesem Ansatz wurde eine Nachweisgrenze von 0,4 fM *in vitro*-transkribierter Interleukin-8 mRNA erreicht. Zusätzlich wurde der

erfolgreiche Nachweis dieser als Krebs-Biomarker dienenden mRNA in Speichel demonstriert. Nicht auf Antikörper-Antigen-Wechselwirkung, sondern auf Streptavidin-Biotin-Wechselwirkung basiert der Ansatz von Mao *et al.* (2008). Nach Hybridisierung mit einem komplementären ODN wird der Biotin-Rest zugänglich für ein HRP-SA-Konjugat, dessen enzymatische Aktivität anschließend elektrochemisch detektiert wird. Die Nachweisgrenze betrug 0,1 nM und ein einzelner Basenaustausch innerhalb des komplementären ODNs führte zu einem signifikanten Abfall des Signals.

Zur Validierung des auf immobilisierten DNA-Molekülen mit Stamm-Schleife-Struktur beruhenden Nachweissystems wurde die Selektivität und Sensitivität mit synthetischer komplementärer DNA überprüft. Hinsichtlich Selektivität konnte zwar eine einzelne Fehlbasenpaarung detektiert werden, jedoch betrug das Signal noch etwa 60% im Vergleich zu einem perfekt komplementären ODN. Bei Verwendung von linearen Fängersonden betrug das Signal für ein ODN, welches eine Fehlbasenpaarung aufweist, nur 40% des Signals eines perfekt komplementären ODNs. Zwei bzw. drei Fehlbasenpaarungen konnten mit der *Molecular Beacon*-Nachweismethode sehr gut von dem perfekt komplementären ODN unterschieden werden. Die gewählten Basenaustausche befanden sich zentral in der Schleifenregion, da für diese Position höchste Selektivität gezeigt wurde (Tsourkas *et al.*, 2003). Eine Verbesserung der Selektivität ist durch eine Verlängerung der Stammregion erreichbar, da damit das Gleichgewicht zwischen geschlossener und offener Konformation in Richtung geschlossener Konformation verschoben wird (Goel *et al.*, 2005). Jedoch nimmt mit einer längeren bzw. GC-reicheren Stamm-Sequenz auch die Hybridisierungsrate drastisch ab (Tsourkas *et al.*, 2003). Die Nachweisgrenze betrug unter Verwendung von synthetischer komplementärer DNA 200 pM. Dies entspricht dem von Mao *et al.* (2008) beschriebenen Detektionslimit. Andere Autoren berichten für DNA von fM Nachweisgrenzen mit immobilisierten Stamm-Schleife-Strukturen (Wei *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008a). Jedoch verwendeten beide Gruppen im Unterschied zu dieser und der Arbeit von Mao *et al.* (2008) Antikörper-Antigen-Wechselwirkung zur Anbindung des Reporterenzym. Die etablierte Nachweismethode wurde anschließend auf den direkten Nachweis von 16S rRNA aus *E. coli* übertragen. Wie bereits weiter oben beschrieben, mußte auch hier die Sekundärstruktur durch Fragmentierung und Helfer-ODNs aufgelöst werden. Dabei ergab sich ein Detektionslimit von 5×10^4 KbE *E. coli*. Verglichen mit der rRNA/DNA-*Sandwich*-Hybridisierung unter Verwendung des EST2-SA-Konjugats erzielte der Nachweis bakterieller 16S rRNA mit dem *Molecular Beacon* ein vergleichbares Ergebnis. Dabei wurden stets Nachweisgrenzen von etwa $1 - 5 \times 10^4$ KbE *E. coli* erreicht (Tab. 4-1).

4.3.3 Spektralphotometrische 16S rRNA-Nachweismethode

Magnetische Mikropartikel werden verstärkt für Anwendungen in der Biosensorik und in so genannten *Bio-Bar Code Assays* verwendet (Gu *et al.*, 2006; Jaffrezic-Renault *et al.*, 2007). Magnetische Partikel besitzen einen anorganischen Kern, z. B. Eisenoxid, der von einer äußeren Schale mit bestimmten Modifikationen (langkettige organische Liganden oder Polymere) umgeben ist. In dieser Arbeit wurden Amino-modifizierte magnetische Nanopartikel verwendet, auf denen mittels des heterobifunktionellen Reagenzes sulfo-SMCC Thiol-modifizierte ODNs immobilisiert wurden. Somit konnte mit diesen magnetischen Partikeln ein einfaches spektralphotometrisches System für die Validierung der elektrochemischen 16S rRNA-Detektion entwickelt werden. Vorher für die elektrochemische Detektion gefundene Parameter wie Hybridisierungszeit oder Einfluss der 16S rRNA-Tertiärstruktur konnten mit diesem Partikel-basierten Ansatz überprüft und bestätigt werden. Ebenso war mit diesem Nachweissystem unter den vorher optimierten Hybridisierungsbedingungen ein selektiver Nachweis von *E. coli* 16S rRNA möglich. Der mikrobielle Nachweis mittels eines Partikel-basierten Ansatzes erreichte ein Detektionslimit für *E. coli* von 5×10^6 KBE. Das Fehlen des *Redox-Recycling*-Mechanismus und die weniger sensitive Detektionsmethode bedingen das verglichen mit den elektrochemischen Methoden schlechtere Detektionslimit. Für die direkte Detektion von relevanten Markergenen für die Bioprocessorik verwendeten Pioch *et al.* (2007) eine Kombination aus magnetischen Partikeln und elektrochemischer Detektion. Dabei wurden relevante mRNA-Sequenzen an auf magnetischen Partikeln immobilisierte Fängersonden gebunden und nach Hybridisierung eines Digoxigenin-markierten Detektor-ODNs erfolgte die Anbindung eines anti-Digoxigenin-Antikörper-AP-Konjugats. Nach Zugabe von Substrat wurde das Produkt *p*-Aminophenol auf einem Biochip mit interdigitalen Elektroden elektrochemisch detektiert. Dieser Ansatz konnte vergleichbar mit RT-PCR den Expressionsverlauf relevanter mRNAs charakterisieren.

4.4 Detektion von kleinen RNAs und mRNAs mittels Lückenhybridisierung

Das Prinzip der coaxialen Basenstapelung und Lückenhybridisierung macht sich auch der hier entwickelte miRNA-Nachweis zu nutze. Dabei wird wie beim bakteriellen 16S rRNA-Nachweis eine RNA-Sonde in Gegenwart eines immobilisierten Fänger-ODNs und des EST2-ODN-Konjugats hybridisiert. In Anwesenheit der gesuchten miRNA schließt diese die Lücke zwischen Fänger- und Detektor-ODN und erzeugt eine perfekte coaxiale Basenstapelung, welche diese Vier-Komponenten-Hybridisierung aus den oben genannten Gründen stabilisiert (s. Abschnitt 4.2). Zusätzlich sorgt die miRNA – wie das Helfer-ODN - auch für ein Auflösen ausgebildeter Tertiärstrukturen der komplementären RNA-Sonde und somit für einen effizienteren Hybridisierungsvorgang. Dagegen ist der Komplex ohne miRNA nicht stabil und wird

auf der Elektrode nicht ausgebildet. Dies stellt eine sehr einfache Methode des miRNA-Nachweises dar. Aufgrund der kurzen Länge und der unterschiedlichen Expressionsraten ist die miRNA-Analyse zurzeit eine der größten Herausforderungen in der analytischen Biochemie (Wark *et al.*, 2008). Dabei dominieren vor allem Methoden, welche auf der Verwendung von LNAs und der chemischen Modifizierung von miRNAs beruhen (Castoldi *et al.*, 2006; Hunt *et al.*, 2009). Die hier entwickelte Methode erzeugt durch Verwendung von mehreren kurzen ODNs einen thermodynamisch sehr stabilen RNA/DNA-Duplex von etwa 80 nt Länge. Die Vier-Komponenten-*Sandwich*-Hybridisierung erlaubt den Nachweis von miRNAs ohne die Verwendung der teuren LNA-Nukleotide. Weiterhin ist eine chemische Modifizierung der miRNA nicht notwendig, da sie die Rolle des unmarkierten Helfer-ODNs einnimmt. Dies umgeht die Gefahr der Einführung eines Verhältnisses zugunsten bestimmter miRNAs, welche bevorzugt chemische oder enzymatische Markierungsreaktionen eingehen. Da es sich hier um eine direkte Detektion von miRNAs handelt, ist kein PCR-Amplifikationsschritt nötig, der apparativ aufwendig ist und ebenfalls gewisse miRNA-Moleküle bevorzugt amplifiziert (Chen *et al.*, 2009). Die Untersuchung der Selektivität der Lückenhybridisierung zeigte eine deutliche Diskriminierung von sehr ähnlichen miRNA-Sequenzen (miR-15/ miR-16) auf. Grundsätzlich bewies die Analysemethode sogar Potential zur Unterscheidung von SNPs innerhalb von miRNAs und auch eine gewisse Unterscheidungsmöglichkeit zwischen pre-miRNAs und miRNAs. So zeigte sich etwa, dass bestimmte SNPs in miR-196a2 mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für Lungenkrebs in der chinesischen Bevölkerung einhergehen (Tian *et al.*, 2009). Eine Unterscheidung zwischen prä-miRNA und miRNA ist bisher mit den meisten Methoden nicht möglich. Paiboonskuwong & Kato (2006) zeigten, dass sie spezifisch miRNAs mit einem *Molecular Beacon*, der mit dem Farbstoff BODIPY FL (4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-propionsäure) modifiziert ist, detektieren können. Der Fluoreszenzfarbstoff wird dabei von einem benachbarten Guanin-Rest ausgelöscht. In Anwesenheit von miRNA kommt es zur Öffnung des *Molecular Beacons* und zur Detektion der Fluoreszenz, während bei Hybridisierung mit prä-miRNA erneut ein benachbarter Guanin-Rest das Fluoreszenzsignal auslöscht. Nachteil dieser Methode ist die Notwendigkeit eines Guanin-Restes an einer bestimmten Position der prä-miRNA, während der Lückenhybridisierungsnachweis auf keine bestimmten Sequenzeigenschaften der miRNA angewiesen ist. Der Lückenhybridisierungsnachweis ist in der Lage 2 pM miRNA in 1 µL Hybridisierungsvolumen direkt zu detektieren, was 2 attomol miRNA entspricht. Im Vergleich zu anderen direkten miRNA-Analysenmethoden ist der Lückenhybridisierungsnachweis sehr sensitiv (s. Tab. 4-2).

Tabelle 4-2: Beispiele aktueller miRNA-Nachweismethoden und ihrer Nachweisgrenzen.

Nachweismethode	Signalumwandlungsart	Nachweisgrenze	Referenzen
Northern Blot	radioaktiv-markierte Sonden	nM	Valoczi <i>et al.</i> , 2004; Ramkissoon <i>et al.</i> , 2006
RT-PCR	Fluoreszenzdetektion	10 fM	Raymond <i>et al.</i> , 2005
elektroaktive miRNA-Markierung	elektrochemisch	0,2 pM	Gao & Yu 2007
Quantum-Dot-markierte Fängersonden	Fluoreszenzdetektion	39 pM	Liang <i>et al.</i> , 2005
Nanopartikel-verstärkte Oberflächenplasmonresonanz	optisch	10 fM	Fang <i>et al.</i> , 2006
kompetitive Nukleinsäurehybridisierung	Biolumineszenz	20 pM	Cissell <i>et al.</i> , 2008
Lückenhybridisierung	elektrochemisch	2 pM	diese Arbeit

Die Spezifität der Lückenhybridisierung wurde zum einen mit Mischungen von miRNA-Sequenzen gezeigt. Zum anderen wurde der Einfluss einzelner Basenaustausche untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass terminale Fehlbasenpaarungen das Detektionssignal stärker herabsenken als eine zentrale Fehlbasenpaarung. Durch die terminalen Fehlbasenpaarungen wird eine Lücke zwischen Fänger- bzw. Detektor-ODN und miRNA geschaffen, welche die koaxiale Basenstapelung stört und zusätzlich die Stabilität des RNA/DNA-Duplexes aufgrund der fehlenden Basenpaarungsenergie senkt (Lane *et al.*, 1997; Pyshnyi *et al.*, 2001). Die zentrale Fehlbasenpaarung hat wenig Einfluss auf die koaxiale Basenstapelung, senkt jedoch die Stabilität des RNA/DNA-Duplexes aufgrund der fehlenden Basenpaarungsenergie (Letowski *et al.*, 2004b).

Ein entscheidender Vorteil des Lückenhybridisierungsnachweises ist auch seine einfache und vor allem schnelle Durchführung innerhalb von etwa 1 h. Aufgrund der Adressierbarkeit der Biochips konnte Gesamt-RNA aus MCF-7-Zellen auf die Expression von drei miRNAs (miR-10a, miR-16 und miR-21) analysiert werden. Die gezeigten Ergebnisse stimmen sehr gut mit RT-PCR-Expressionsanalysen dieser drei miRNAs überein (Jiang *et al.*, 2005). Dies zeigt das Potential des miRNA-Lückenhybridisierungsnachweises zur schnellen, sensitiven und selektiven Analyse von miRNAs aus eukaryontischen Zellen.

Die Lückenhybridisierung konnte erfolgreich zum Nachweis von fragmentierter mRNA adaptiert werden. Dieses System erlaubt die spezifische direkte Detektion von mRNA-Sequenzen innerhalb von etwa 1 h 30 min einschließlich RNA-Isolierung und Aufreinigung. Weiterhin ist weder eine Amplifikation der RNA durch Reverse-Transkriptase-PCR noch eine Markierung der mRNA erforderlich (Skena *et al.*, 1995; Schefe *et al.*, 2006). Ein Ansatz zur Detektion bestimmter mRNA-Sequenzen aus *E. coli*, *B. anthracis* und *Cryptosporium parvum* verwendete die isothermale Amplifikationsmethode NASBA (*nucleic acid sequence-based amplification*) und den

Nachweis auf einem Teststreifen mittels Fluoreszenzfarbstoff-enthaltenden Liposomen. Bis zu 1 nM mRNA konnte mit diesem System nachgewiesen werden (Baeumner *et al.*, 2004). Der direkte Nachweis von mRNA-Sequenzen ist bisher selten in der Literatur beschrieben. Fang & Kelley (2009) demonstrierten den direkten Nachweis einer mRNA, die als Biomarker für Prostatakrebs dient, in klinischen Proben. Dazu verwendeten die Autoren dreidimensionale Goldnanodrähte als Elektrode und immobilisierte Peptidnukleinsäure (PNA) als Fängermoleküle. Dabei wurden $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, ein DNA-bindender kationischer Elektronenakzeptor, und $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, ein anionischer Elektronenakzeptor, als Redoxreporter eingesetzt. Nach Hybridisierung komplementärer Nukleinsäure bindet sich $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ an die negativ geladenen Phosphatgruppen des RNA-Rückgrates. Nach Applikation eines negativen Potentials an die Elektrode wird Ru(III) reduziert und mittels dem Oxidationsmittel Fe(III) regeneriert. Durch das *Redox-Recycling* wird auch hier ein Amplifikationseffekt erreicht, welcher die Detektion von der spezifischen mRNA aus 100 ng Gesamt-RNA, isoliert aus klinischen Proben, erlaubt (Fang & Kelley 2009).

4.5 Signalamplifikationsstrategien

Ihre Grenzen weist die Nukleinsäuredetektion beim Nachweis gering exprimierter Markergene auf. Deshalb wurden Signalamplifikationsmethoden entwickelt, die einerseits das Ausgangsmaterial oder andererseits die Anzahl an Reportermolekülen vermehren (Katz & Willner 2004).

4.5.1 Elektrochemischer Nachweis von PCR-Produkten

Zuerst soll hier auf die Möglichkeit der Amplifikation der nachzuweisenden Nukleinsäure mittels PCR eingegangen werden. Dabei wurde exemplarisch anhand des Markergens *uidA* der spezifische Nachweis von *E. coli* demonstriert. Weiterhin wurde der sensitive Nachweis von *B. subtilis* durch Amplifikation der V6-Region der 16S rRNA gezeigt. Entscheidend für einen sensitiven Nachweis ist die Denaturierung des doppelsträngigen PCR-Amplikons. Mittels asymmetrischer PCR konnte man relativ einfach eine Denaturierung des PCR-Produkts herbeiführen. Die Verwendung eines asymmetrischen PCR-Protokolls zur Erzeugung eines Überschusses an einem bestimmten einzelsträngigen DNA-Produkt fand schon in einigen Arbeiten zur sensitiven elektrochemische Detektion von Amplikons Anwendung. So wurde etwa die asymmetrische PCR zur Amplifikation des *gyrB*-Gens aus *Salmonella typhimurium* verwendet, um das nicht aufgereinigte Amplikon anschließend mit einem *Molecular Beacon*-Sensor, der an einem Ende mit Methylenblau modifiziert war, nachzuweisen. Nach Hybridisierung des amplifizierten DNA-Bereiches mit der Schleife des *Molecular Beacon* entfernt sich Methylenblau von der Elektrodenoberfläche und das elektrochemische Signal nimmt deutlich ab. Mit dieser Methode konnten bis zu 90

Genkopien detektiert werden (Lai *et al.*, 2006). Sehr effektiv erwiesen sich auch der Einsatz eines phosphorylierten Primer-ODNs und der anschließende spezifische Abbau dieses DNA-Stranges mittels λ -Exonuklease (Higuchi & Ochman 1989). Der λ -Exonuklease-Verdau fand bisher vor allem Anwendung für die Charakterisierung von PCR-Produkten mittels Elektrospray Ionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS) (Null *et al.*, 2000). Reske *et al.* (2007) beschrieben die Anwendung des λ -Exonuklease-Verdaus für den voltametrischen Nachweis eines 136 Nukleotide langen PCR-Produkts mit einer Nachweisgrenze von 7,5 nM. Im Gegensatz zu dieser Veröffentlichung erfolgte in dieser Arbeit keine Reinigung des PCR-Produkts, sondern die direkte Verwendung für die Hybridisierungsreaktion. Dieser Ansatz war mindestens ebenso effizient wie das asymmetrische PCR-Protokoll. Der Nachweis des *uidA*-Gens war spezifisch für *E. coli*. Ebenfalls erlaubte der Nachweis des *uidA*-Gens eine Differenzierung zwischen *E. coli* und enteropathogener *E. coli*, da letztere keine funktionelle β -Glucuronidase besitzen. Innerhalb des *uidA*-Gens weisen EHEC-Stämme eine Punktmutation auf. An Position 93 des *uidA*-Gens ist ein Thymidin-Rest in allen *E. coli* O157:H7-Stämmen zu einem Guanosin-Rest ausgetauscht (Takiya *et al.*, 2004). Diese Punktmutation bewirkt einen Signalabfall nach Hybridisierung auf dem elektrochemischen Biochip um 50 – 60%. Durch die PCR-Amplifikation der nachzuweisenden DNA-Region erreichte man eine sehr hohe Sensitivität von etwa 1 KBE *E. coli*. Jedoch war eine Quantifizierung nicht mehr möglich, da es sich bei der PCR um eine Endpunktreaktion handelt. Der Nachweis schwer zu lysierender Gram-positiver Bakterien mittels PCR und elektrochemischer Detektion stellt eine Alternative zum direkten 16S rRNA-Nachweis dar. So konnte für den Nachweis von amplifizierter *B. subtilis* 16S rRNA-Gene ein Detektionslimit von 1 KBE *B. subtilis* erzielt werden. Der direkte Nachweis von *B. subtilis* 16S rRNA ergab lediglich ein Detektionslimit von etwa 1×10^6 KBE *B. subtilis*. Dies kann zum einen auf einen niedrigeren 16S rRNA-Gehalt, zum anderen auf eine geringere RNA-Ausbeute bei der Nukleinsäureisolierung zurückzuführen sein. Dagegen stehen bei der DNA-Isolierung stringenter Bedingungen zur Verfügung, da DNA wesentlich stabiler als RNA ist. Zudem werden selbst bei geringen Nukleinsäureisolierungsausbeuten kleinste Mengen an DNA mittels PCR amplifiziert. Del Giallo *et al.* (2005) zeigten, dass beim Nachweis längerer PCR-Amplikons die Hybridisierungseffizienz um das neunfache steigt, falls einer der Termini des Amplikons in die Wechselwirkung zwischen PCR-Produkt und immobilisierten Fänger-ODN involviert ist. Der Fänger für das *uidA*-Amplikon schließt sich in dieser Arbeit direkt an die Primersequenz an. Dagegen ist die Fängerregion für den *B. subtilis* 16S rRNA-Nachweis 50 Nukleotide von der Primersequenz entfernt, d.h. hier kommt es eher zu einer Hybridisierung zwischen Fänger und einer inneren Region des PCR-Amplikons, welche aufgrund der sterischen Hinderung durch die Elektrodenoberfläche nur schwer zugänglich ist (Del Giallo *et al.*, 2005). Liu *et al.* (2008b) beobachteten, dass eine direkt benachbarte Positionierung von Fänger- und Detektor-ODN, wie es in dieser Arbeit für das *uidA*-Amplikon der Fall

war, ein optimales Messsignal ergibt. Ein anderer Aspekt, der den 20-fachen Unterschied zwischen *uidA*- und *16S rDNA*-Detektion erklärt, ist die Amplikonlänge. Das *uidA*-Amplikon ist nahezu dreifach kürzer als das *16S rDNA*-Amplikon. Zusätzlich besitzt das *uidA*-Amplikon exakt die Größe der Detektionsregion zuzüglich der Primersequenzen. Dagegen weist das *16S rDNA*-Amplikon überstehende Enden auf, welche die Hybridisierungseffizienz verringern (Stedtfeld *et al.*, 2007). Kürzlich wurde die Entwicklung einer elektrochemischen quantitativen PCR-Methode beschrieben. Diese basierte auf der Detektion des *eaeA*-Gens aus *E. coli* O157:H7. Nach Amplifikation des *eaeA*-Gens mit einem biotinylierten und einem Digoxigenin-markierten Primer wurde das doppelmarkierte PCR-Produkt auf einer Avidin-modifizierten Elektrode immobilisiert. An die Digoxigenin-markierte dsDNA kann anschließend ein Anti-Digoxigenin-Antikörper-HRP-Konjugat binden, dessen enzymatische Aktivität elektrochemisch detektiert wird. Indem die PCR nach unterschiedlichen Zyklen beendet wurde und die Amplikonmenge elektrochemisch bestimmt wurde, erhielt man für eine bestimmte Konzentration an Templat einen Grenzwert an Zyklen, bei dem die elektrochemische Detektion einen signifikanten Messwert erzeugte. So konnten bereits nach zehn PCR-Zyklen 0,45 ng/μL genomisches Ausgangsmaterial detektiert werden. Dagegen konnte mit einer TaqMan Q-PCR erst nach 15 PCR-Zyklen dieselbe Menge an genomischer DNA detektiert werden. Dies bestätigt die höhere Sensitivität der elektrochemischen Detektion im Vergleich zur fluoreszenzbasierten Detektion (Lermo *et al.*, 2008).

4.5.2 Signalamplifikation durch RCA

Eine andere Möglichkeit der Signalamplifikation ist die vermehrte Bereitstellung von Sondenbindungsstellen (Andras *et al.*, 2001). Neben der Ligase-Ketten-Reaktion (Barany 1991) ist hier vor allem die *Rolling Circle Amplification* (RCA) zu nennen. In dieser Arbeit wurde die RCA zur Amplifikation einer repetitiven Sequenz verwendet, an der eine Vielzahl von EST2-ODN-Konjugaten binden können. Dieser Ansatz erlaubte eine selektive Detektion von bis zu zehn KbE *E. coli*. Bisher wurde die RCA zur Synthese von Nanostrukturen, Detektion von Einzelbasenaustauschen und in Biosensoren mit funktionellen Nukleinsäuren eingesetzt (Lizardi *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2008; Yang & Ellington 2008). Eine Anwendung der RCA ist beispielsweise die Detektion der niedermolekularen Verbindung ATP. Dabei wurde ein Aptazym eingesetzt, dessen katalytische Aktivität durch ATP moduliert wird. Das Aptazym agiert in Gegenwart von ATP wie eine DNA-Ligase und erzeugt die ringförmige Matrize für die nachfolgende RCA-Reaktion. Dieser Ansatz kann sowohl homogen in Lösung als auch heterogen auf Oberflächen ausgeführt werden (Cho *et al.*, 2005). Ebenfalls wurde die RCA kürzlich für die Detektion von miRNAs eingesetzt. Dazu verwendete man so genannte *padlock*-Sonden (Nilsson *et al.*, 1994). Die Methode benutzt eine lineare DNA-Sonde, deren beide Enden durch die spezifische Hybridisierung an eine miRNA-

Zielssequenz in unmittelbare Nähe gebracht werden. Die beiden Enden der DNA-Sonde werden durch T4 RNA-Ligase 2 verbunden, und der gebildete DNA-Ring fungiert als Matrize für eine RCA-Reaktion mit einer geeigneten DNA-Polymerase und dNTPs. Das RCA-Produkt wird direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff detektiert. Die Methode kann zwischen zwei sehr ähnlichen miRNAs unterscheiden und erreicht eine Nachweisgrenze von 0,025 pM (Cheng *et al.*, 2009). Einen ähnlichen Ansatz wie in dieser Arbeit vorgestellt, benutzten Smolina *et al.* (2005) zur Signalamplifikation des Nachweises von PCR-Amplikons auf Glasoberflächen. Dabei verwendeten sie RCA in Gegenwart von Fluorophor-modifizierten dNTPs und erreichten einen Nachweis von etwa 1.000 Analytmolekülen. In dieser Arbeit wurde die Übertragbarkeit dieses Ansatzes auf die elektrochemische Detektion von RNA erstmals gezeigt. Im Vergleich zum Vier-Komponenten-System mit EST2-ODN-Konjugat ergab sich eine 40-fach bessere Nachweisgrenze für 16S rRNA aus *E. coli*. Jedoch liegt der Zeitbedarf für den auf RCA basierten Nachweis bei etwa zwei Stunden, was fast dreimal so lange ist wie der Nachweis ohne RCA.

4.5.3 Signalamplifikation durch Dendrimertechnologie

Um einen äußerst sensitiven Nachweis von Nukleinsäuren in kurzer Zeit zu gewährleisten, wurden mehrfach markierte Dendrimere eingesetzt. Es wurden Dendrimere der Generationen 3 und 5 mit einem Cysteamin-Kern verwendet. Nach Reduktion wurde an die Thiolgruppe das Detektor-ODN konjugiert. Nach Absättigung einiger Aminogruppen mit Essigsäureanhydrid wurden EST2-Moleküle mittels bifunktionellem Kopplungsreagenz an die restlichen Aminogruppen gekoppelt. Diese neuartigen mehrfach markierten Reporterkonjugate wurden mittels DNA/DNA-Hybridisierung charakterisiert. Hinsichtlich Sensitivität erreichte man mit G3 bzw. G5 EST2-Dendrimer-ODN-Konjugaten ein Detektionslimit von 0,3 und 0,02 pM. Dies stellt eine zehnfache bzw. 100-fache Verbesserung der Nachweisgrenze im Vergleich zum konventionell verwendeten EST2-ODN-Konjugat (Detektionslimit 3 pM) dar (Humenik *et al.*, 2008). Somit konnte in dieser Arbeit eine der sensitivsten Nachweisgrenzen, die bisher mit elektrochemischer Detektion erreicht wurden, erzielt werden (Sassolas *et al.*, 2008). Das erreichte Detektionslimit ist vergleichbar mit dem bei Verwendung von in Liposomen eingeschlossenen HRP-Molekülen (Alfonta *et al.*, 2001b), mehrfach Ferrocen-markierten Goldnanopartikeln (Wang *et al.*, 2003) und zyklischen DNA-Sonden (Patolsky *et al.*, 2002). Hinsichtlich Selektivität fällt auf, dass beim G3 EST2-Dendrimer-ODN-Konjugat ein leichter aber vor allem beim G5 EST2-Dendrimer-ODN-Konjugat ein stärkerer Verlust der Diskriminierungsfähigkeit von Fehlbasenpaarungen im Vergleich zum EST2-ODN-Konjugat eintritt. Daraufhin wurden G3 EST2-Dendrimer-ODN-Konjugate zum Nachweis von bakterieller 16S rRNA angewandt. Dabei wurde eine Steigerung der Sensitivität um mindestens den Faktor zehn im Vergleich zum EST2-ODN-Konjugat bei gleichbleibender Analysezeit beobachtet. Die

Selektivität der Detektion von *E. coli* 16S rRNA war weiterhin ausgesprochen gut. Die Verwendung von G5 EST2-Dendrimer-ODN-Konjugaten brachte im Vergleich zu G3 EST2-Dendrimer-ODN-Konjugaten keine weitere Verbesserung des Detektionslimits, da bei der Isolierung von Gesamt-RNA aus weniger als 100 Zellen Limitationen durch Adsorption der Nukleinsäure an die Silika-Gel-Membran bzw. an die Gefäßwände zum Tragen kommen. Die gleichzeitige Verwendung eines Suspensions-*Microarrays* und Dendrimer-Konjugaten erlaubte die Subtypisierung von *L. monocytogenes*-Stämmen. Mehrfach Biotin-markierte DNA-Dendrimer-Konjugate wurden zur direkten Detektion von genomischer DNA aus *L. monocytogenes*, die auf Polystyrolkugeln immobilisierte Fänger gebunden wurde, eingesetzt. Nach Hybridisierung erfolgte die Anbindung von Phycoerythrin-Streptavidin-Konjugaten, welche anschließend mittels Durchflusszytometrie detektiert wurden (Borucki *et al.*, 2005). Eine andere gut etablierte Methode, die die Anbindung vieler Reportermoleküle an ein Hybridisierungsereignis erlaubt, ist der Einsatz von verzweigter DNA (*branched DNA*). Diese Methode wird kommerziell zur Diagnostik von HIV RNA in Blutplasma eingesetzt. Weniger als 10.000 Kopien RNA pro mL können mit diesem Ansatz detektiert werden. Die Ziel-RNA wird an in Vertiefungen von Mikrotiterplatten gebundenen Fängern immobilisiert. Daran können ODNs binden (*pre-amplifier*), an die je weitere acht verzweigte DNA-Moleküle hybridisieren können. An jedes verzweigte DNA-Molekül können anschließend bis zu 48 Alkalische Phosphatase-Moleküle binden, was einen erheblichen Signalamplifikationseffekt generiert (Kern *et al.*, 1996). Problematisch bei diesem Ansatz ist die Vielzahl an durchzuführenden Arbeitsschritten und Hybridisierungsschritte, welche Reproduzierbarkeit und Spezifität negativ beeinflussen können. Dagegen stellt die Verwendung von mehrfach markierten Dendrimer-ODN-Konjugaten eine neue, schnelle und sensitive Methode der Signalamplifikation dar.

5 Ausblick

Die Nachfrage nach immer schnelleren, sensitiveren und kostengünstigeren Nachweismethoden von Biomolekülen hat in den letzten Jahren eine Vielzahl von unterschiedlichen Detektionsmethoden hervorgebracht, die für eine *Point-of-Care* (POC) Anwendung geeignet sind. Wichtige Kriterien für die Entwicklung solcher POC-Methoden sind: (1) Die Analyse soll außerhalb eines Zentrallabors nahe am Patienten durchgeführt werden. (2) Es soll keine Probenvorbereitung des Untersuchungsmaterials erforderlich sein. (3) Alle Reagenzien sollten in einsatzbereiter Form zur Verfügung gestellt werden. (4) Die Methode soll auch von nicht geschultem Personal durchführbar sein. (5) Aus den rasch erzielten Ergebnissen sollten unmittelbar eine diagnostische oder therapeutische Konsequenz gezogen werden (Luppa & Schlebusch 2008).

Der elektrochemische Nachweis von Biomolekülen ist eine interessante Möglichkeit für die Etablierung eines POC-Nachweises. Der direkte Nachweis von RNA bietet eine schnellere, kostengünstigere und einfacher automatisierbare Alternative gegenüber auf Nukleinsäureamplifikation-basierenden Nachweismethoden. In Zukunft muss die Entwicklung der Automatisierung weiter vorangetrieben werden, um Fehler des Benutzers bei der Inkubation der Chips zu vermeiden. Im optimalen Fall sollte der Benutzer nur noch die zu untersuchende Probe bzw. das Zellysate in das Gerät geben und die Aufarbeitung, Inkubation und Auswertung laufen vollständig automatisiert ab. Ein weiterer Ansatz ist die Entwicklung elektrochemisch auslesbarer Teststreifen (*Lateral Flow Assay*). Somit könnte man sich die Entwicklung komplizierter Mikrofluidik-Anordnungen ersparen.

Die Entwicklung neuartiger Signalamplifikationsmethoden ist für einen direkten Nachweis von Nukleinsäuren immer von Bedeutung. Mit der Dendrimertechnologie konnte bereits eine deutliche Steigerung des Detektionslimits von bakterieller 16S rRNA erzielt werden. Der Einsatz neuartiger Nanomaterialien ist eine weitere Möglichkeit für die Entwicklung äußerst sensitiver und selektiver Biosensoren.

Der direkte Nachweis von Nukleinsäuren mittels Lückenhybridisierung zeigt enormes Potential für eine Kommerzialisierung als POC-Nachweissystem. Es eröffnen sich eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten durch die Anpassung der Analytmoleküle. Neben der medizinischen Diagnostik und der Überwachung von Kontaminationen in Lebensmitteln sind z.B. die Überwachung von Wasser und Luft denkbar. Darüberhinaus bietet sich der Einsatz in der Grundlagenforschung als schnelle Methode zur Gen- oder miRNA-Expressionsanalyse an.

6 Literaturverzeichnis

Abel AP, Weller MG, Duveneck GL, Ehrat M, Widmer HM (1996) Fiber-optic evanescent wave biosensor for the detection of oligonucleotides. *Anal Chem*, **68**, 2905-2912.

Agafonov DE, Huang Y, Grote M, & Sprinzl M (2005a) Efficient suppression of the amber codon in *E. coli* in vitro translation system. *FEBS Lett*, **579**, 2156-2160.

Agafonov DE, Rabe KS, Grote M, Huang Y, & Sprinzl M (2005b) The esterase from *Alicyclobacillus acidocaldarius* as a reporter enzyme and affinity tag for protein biosynthesis. *FEBS Lett*, **579**, 2082-2086.

Alfonta L, Bardea A, Khersonsky O, Katz E, & Willner I (2001a) Chronopotentiometry and Faradaic impedance spectroscopy as signal transduction methods for the biocatalytic precipitation of an insoluble product on electrode supports: routes for enzyme sensors, immunosensors and DNA sensors. *Biosens Bioelectron*, **16**, 675-687.

Alfonta L, Singh AK, & Willner I (2001b) Liposomes labeled with biotin and horseradish peroxidase: a probe for the enhanced amplification of antigen--antibody or oligonucleotide--DNA sensing processes by the precipitation of an insoluble product on electrodes. *Anal Chem*, **73**, 91-102.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, & Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, **215**, 403-410.

Alwine JC, Kemp DJ, & Stark GR (1977) Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5350-5354.

Amann R & Ludwig W (2000) Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiol Rev*, **24**, 555-565.

Anderson ML (1999) Nucleic acid hybridization. *BIOS Scientific Publ.*, Oxford.

Andras SC, Power JB, Cocking EC, & Davey MR (2001) Strategies for signal amplification in nucleic acid detection. *Mol Biotechnol*, **19**, 29-44.

Anthony RM, Schuitema AR, Oskam L, & Klatser PR (2005) Direct detection of *Staphylococcus aureus* mRNA using a flow through microarray. *J Microbiol Methods*, **60**, 47-54.

Arenz C (2006) MicroRNAs--future drug targets? *Angew Chem Int Ed Engl*, **45**, 5048-5050.

Aymami J, Coll M, van der Marel GA, van Boom JH, Wang AH, & Rich A (1990) Molecular structure of nicked DNA: a substrate for DNA repair enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 2526-2530.

Baeumner AJ, Jones C, Wong CY, & Price A (2004) A generic *Sandwich*-type biosensor with nanomolar detection limits. *Anal Bioanal Chem*, **378**, 1587-1593.

Bain CD, Troughton EB, Tao Y-T, Evall J, Whitesides GM, & Nuzzo RG (1989) Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold. *J Am Chem Soc*, **111**, 321-335.

Bakker E & Pretsch E (2007) Modern potentiometry. *Angew Chem Int Ed Engl*, **46**, 5660-5668.

Baldrich E, Laczka O, Del Campo FJ, & Munoz FX (2008) Self-assembled monolayers as a base for immunofunctionalisation: unequal performance for protein and bacteria detection. *Anal Bioanal Chem*, **390**, 1557-1562.

Ban N, Nissen P, Hansen J, Moore PB, & Steitz TA (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*, **289**, 905-920.

Barany F (1991) Genetic disease detection & DNA amplification using cloned thermostable ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 189-193.

Barhoumi A, Zhang D, & Halas NJ (2008) Correlation of Molecular Orientation and Packing Density in a dsDNA Self-Assembled Monolayer Observable with Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *J Am Chem Soc*, **130**, 14040-14041.

Barken KB, Haagensen JA, & Tolker-Nielsen T (2007) Advances in nucleic acid-based diagnostics of bacterial infections. *Clin Chim Acta*, **384**, 1-11.

Bartel DP (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, **136**, 215-233.

Baselt DR, Lee GU, Natesan M, Metzger SW, Sheehan PE, & Colton RJ (1998) A biosensor based on magnetoresistance technology. *Biosens Bioelectron*, **13**, 731-739.

Batchelor-McAuley C, Wildgoose GG, & Compton RG (2009) The physicochemical aspects of DNA sensing using electrochemical methods. *Biosens Bioelectron*, **24**, 3183-3190.

Batt CA (2007) Materials science. Food pathogen detection. *Science*, **316**, 1579-1580.

Baumgart J (2004) Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. *Behr's Verlag*, Hamburg.

Behrens S, Fuchs BM, Mueller F, & Amann R (2003) Is the in situ accessibility of the 16S rRNA of *Escherichia coli* for Cy3-labeled oligonucleotide probes predicted by a three-dimensional structure model of the 30S ribosomal subunit? *Appl Environ Microbiol*, **69**, 4935-4941.

Belgrader P, Benett W, Hadley D, Richards J, Stratton P, Mariella R, Jr., & Milanovich F (1999) PCR detection of bacteria in seven minutes. *Science*, **284**, 449-450.

Blow N (2008) DNA sequencing: generation next-next. *Nat Methods*, **5**, 267-272.

Bockisch B, Grunwald T, Spillner E, & Bredehorst R (2005) Immobilized stem-loop structured probes as conformational switches for enzymatic detection of microbial 16S rRNA. *Nucleic Acids Res*, **33**, e101.

Boom R (1990) Process for isolating nucleic acid. EP0389063.

Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, & van der NJ (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol*, **28**, 495-503.

Boon EM, Salas JE, & Barton JK (2002) An electrical probe of protein-DNA interactions on DNA-modified surfaces. *Nat Biotechnol*, **20**, 282-286.

Boozer C, Ladd J, Chen S, Yu Q, Homola J, & Jiang S (2007) DNA Directed Protein Immobilization on Mixed ssDNA/Oligo(ethylene glycol) Self-Assembled Monolayers for Sensitive Biosensors. *Anal Chem*, **23**, 6967-6972.

Borucki MK, Reynolds J, Call DR, Ward TJ, Page B, & Kadushin J (2005) Suspension microarray with dendrimer signal amplification allows direct and high-throughput subtyping of *Listeria monocytogenes* from genomic DNA. *J Clin Microbiol*, **43**, 3255-3259.

Bosch A, Guix S, Sano D, & Pinto RM (2008) New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. *Curr Opin Biotechnol*, **19**, 295-301.

Brasher CW, DePaola A, Jones DD, & Bej AK (1998) Detection of microbial pathogens in shellfish with multiplex PCR. *Curr Microbiol*, **37**, 101-107.

Brecht A, Gauglitz G, (1997) Reflectometric interference spectroscopy for direct affinity sensing. In Scheller FW, Schubert F und Fedrowitz J (Eds.), *Frontiers in Biosensorics*, Vol. 2: Applications. Birkhäuser, Basel.

Brehm-Stecher R, Young C, Jaykus LA, & Tortorello ML (2009) Sample preparation: the forgotten beginning. *J Food Prot*, **72**, 1774-1789.

Bremer H & Dennis PP (1987) Modulation of chemical composition and other parameters of the cell growth rate. In Neidhardt FC, Ingraham JL, Low KB, Magasanik B, Schaechter M, & Umberger HE (Eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. *American Society for Microbiology*, Washington, D.C., pp. 1527-1542.

Breslauer KJ, Frank R, Blocker H, & Marky LA (1986) Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 3746-3750.

Browne KA (2002) Metal ion-catalyzed nucleic acid alkylation and fragmentation. *J Am Chem Soc*, **124**, 7950-7962.

Burbulis I, Yamaguchi K, Gordon A, Carlson R, & Brent R (2005) Using protein-DNA chimeras to detect and count small numbers of molecules. *Nat Methods*, **2**, 31-37.

Calin GA & Croce CM (2006) MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*, **6**, 857-866.

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, & Croce CM (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 15524-15529.

Call DR (2005) Challenges and opportunities for pathogen detection using DNA microarrays. *Crit Rev Microbiol*, **31**, 91-99.

Cameron TO, Cochran JR, Yassine-Diab B, Sekaly RP, & Stern LJ (2001) Cutting edge: detection of antigen-specific CD4+ T cells by HLA-DR1 oligomers is dependent on the T cell activation state. *J Immunol*, **166**, 741-745.

Cannone JJ, Subramanian S, Schnare MN, Collett JR, D'Souza LM, Du Y, Feng B, Lin N, Madabusi LV, Muller KM, Pande N, Shang Z, Yu N, & Gutell RR (2002) The comparative RNA web (CRW) site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs. *BMC Bioinformatics*, **3**, 2.

Cantor, CR & Schimmel, PR (1980) Biophysical Chemistry. Part III: The behavior of biological macromolecules. *W.H. Freeman and Company*, New York.

Carletti E, Guerra E, & Alberti S (2006) The forgotten variables of DNA array hybridization. *Trends Biotechnol*, **24**, 443-448.

Case RJ, Boucher Y, Dahllorf I, Holmstrom C, Doolittle WF, & Kjelleberg S (2007) Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl Environ Microbiol*, **73**, 278-288.

Castoldi M, Schmidt S, Benes V, Noerholm M, Kulozik AE, Hentze MW, & Muckenthaler MU (2006) A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA). *RNA*, **12**, 913-920.

Cavaluzzi MJ & Borer PN (2004) Revised UV extinction coefficients for nucleoside-5'-monophosphates and unpaired DNA and RNA. *Nucleic Acids Res*, **32**, e13.

Cederquist KB, Stoermer GR, & Keating CD (2008) Molecular beacon-metal nanowire interface: effect of probe sequence and surface coverage on sensor performance. *Langmuir*, **24**, 9162-9171.

Ceres DM & Barton JK (2003) In situ scanning tunneling microscopy of DNA-modified gold surfaces: bias and mismatch dependence. *J Am Chem Soc*, **125**, 14964-14965.

Ceres DM, Udit AK, Hill HD, Hill MG, & Barton JK (2007) Differential ionic permeation of DNA-modified electrodes. *J Phys Chem B*, **111**, 663-668.

Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, & Alland D (2007) A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods*, **69**, 330-339.

Chandler DP, Newton GJ, Small JA, & Daly DS (2003) Sequence versus structure for the direct detection of 16S rRNA on planar oligonucleotide microarrays. *Appl Environ Microbiol*, **69**, 2950-2958.

Cheglakov Z, Weizmann Y, Basnar B, & Willner I (2007) Diagnosing viruses by the rolling circle amplified synthesis of DNazymes. *Org Biomol Chem*, **5**, 223-225.

Chen SH, Wu VC, Chuang YC, & Lin CS (2008) Using oligonucleotide-functionalized Au nanoparticles to rapidly detect foodborne pathogens on a piezoelectric biosensor. *J Microbiol Methods*, **73**, 7-17.

Chen Y, Gelfond JA, McManus LM, & Shireman PK (2009) Reproducibility of Quantitative RT-PCR Array in miRNA Expression Profiling and Comparison with Microarray Analysis. *BMC Genomics*, **10**, 407.

Cheng Y, Zhang X, Li Z, Jiao X, Wang Y, & Zhang Y (2009) Highly sensitive determination of microRNA using target-primed and branched rolling-circle amplification. *Angew Chem Int Ed Engl*, **48**, 3268-3272.

Chi KR (2008) The year of sequencing. *Nat Methods*, **5**, 11-14.

Cho EJ, Yang L, Levy M, & Ellington AD (2005) Using a deoxyribozyme ligase and rolling circle amplification to detect a non-nucleic acid analyte, ATP. *J Am Chem Soc*, **127**, 2022-2023.

Chomczynski P & Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**, 156-159.

Churrua E, Girbau C, Martinez I, Mateo E, Alonso R, & Fernandez-Astorga A (2007) Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in chicken meat samples by real-time nucleic acid sequence-based amplification with molecular beacons. *Int J Food Microbiol*, **117**, 85-90.

Ciesiolka J, Lorenz S, and Erdmann VA (1992) Structural analysis of three prokaryotic 5S rRNA species and selected 5S rRNA--ribosomal-protein complexes by means of Pb(II)-induced hydrolysis. *Eur J Biochem*, **204**, 575-581.

Cissell KA & Deo SK (2009) Trends in microRNA detection. *Anal Bioanal Chem*, **394**, 1109-1116.

Cissell KA, Rahimi Y, Shrestha S, Hunt EA, & Deo SK (2008) Bioluminescence-based detection of microRNA, miR21 in breast cancer cells. *Anal Chem*, **80**, 2319-2325.

Clark JM (1988) Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res*, **16**, 9677-9686.

Clark LC, Jr. & Lyons C (1962) Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann N Y Acad Sci*, **102**, 29-45.

Cole JR, Chai B, Farris RJ, Wang Q, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, Bandela AM, Cardenas E, Garrity GM, & Tiedje JM (2007) The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Res*, **35**, D169-D172.

Coleman JE (1992) Structure and mechanism of alkaline phosphatase. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **21**, 441-483.

Colter JS, Brown RA, & Ellem KA (1962) Observations on the use of phenol for the isolation of deoxyribonucleic acid. *Biochim Biophys Acta*, **55**, 31-39.

Cook N (2003) The use of NASBA for the detection of microbial pathogens in food and environmental samples. *J Microbiol Methods*, **53**, 165-174.

- Cooper A (1999) Thermodynamic analysis of biomolecular interactions. *Curr Opin Chem Biol*, **3**, 557-563.
- Cosnier S & Mailley P (2008) Recent advances in DNA sensors. *Analyst*, **133**, 984-991.
- Crevillen AG, Hervas M, Lopez MA, Gonzalez MC, & Escarpa A (2007) Real sample analysis on microfluidic devices. *Talanta*, **74**, 342-357.
- Curtiss R, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Rezuikoff WS, Riely M, Schaechter M & Umberger HEE (1996) Chemical composition of *Escherichia coli*. In: Neidhardt, F.C. (Ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp. 3-6.
- Czajka J, Bsat N, Piani M, Russ W, Sultana K, Wiedmann M, Whitaker R, & Batt CA (1993) Differentiation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by 16S rRNA genes and intraspecies discrimination of *Listeria monocytogenes* strains by random amplified polymorphic DNA polymorphisms. *Appl Environ Microbiol*, **59**, 304-308.
- D'Orazio P (2003) Biosensors in clinical chemistry. *Clin Chim Acta*, **334**, 41-69.
- Daugelavicius R, Bakiene E, & Bamford DH (2000) Stages of polymyxin B interaction with the *Escherichia coli* cell envelope. *Antimicrob Agents Chemother*, **44**, 2969-2978.
- de Boer BE & Beumer RR (1999) Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *Int J Food Microbiol*, **50**, 119-130.
- de Simone SG, Galdiero S, Manco G, Lang D, Rossi M, & Pedone C (2000) A snapshot of a transition state analogue of a novel thermophilic esterase belonging to the subfamily of mammalian hormone-sensitive lipase. *J Mol Biol*, **303**, 761-771.
- Del Giallo ML, Lucarelli F, Cosulich E, Pistarino E, Santamaria B, Marrazza G, & Mascini M (2005) Steric factors controlling the surface hybridization of PCR amplified sequences. *Anal Chem*, **77**, 6324-6330.
- de-Los-Santos-Alvarez P, Lobo-Castanon MJ, Miranda-Ordieres AJ, & Tunon-Blanco P (2004) Current strategies for electrochemical detection of DNA with solid electrodes. *Anal Bioanal Chem*, **378**, 104-118.
- Demidov VV & Frank-Kamenetskii MD (2004) Two sides of the coin: affinity and specificity of nucleic acid interactions. *Trends Biochem Sci*, **29**, 62-71.
- Dennis PP, Ehrenberg M, & Bremer H (2004) Control of rRNA synthesis in *Escherichia coli*: a systems biology approach. *Microbiol Mol Biol Rev*, **68**, 639-668.
- Diekema DJ, BootsMiller BJ, Vaughn TE, Woolson RF, Yankey JW, Ernst EJ, Flach SD, Ward MM, Franciscus CL, Pfaller MA, & Doebbeling BN (2004) Antimicrobial resistance trends and outbreak frequency in United States hospitals. *Clin Infect Dis*, **38**, 78-85.
- Dill K, Ghindilis A, & Schwarzkopf K (2006) Multiplexed analyte and oligonucleotide detection on microarrays using several redox enzymes in conjunction with electrochemical detection. *Lab Chip*, **6**, 1052-1055.

- Dineva MA, Candotti D, Fletcher-Brown F, Allain JP, & Lee H (2005) Simultaneous visual detection of multiple viral amplicons by dipstick assay. *J Clin Microbiol*, **43**, 4015-4021.
- Drummond TG, Hill GH, & Barton JK (2003) Electrochemical DNA sensors. *Nat Biotechnol*, **21**, 1192-1199.
- Du H, Disney MD, Miller BL, & Krauss TD (2003) Hybridization-based unquenching of DNA hairpins on au surfaces: prototypical "molecular beacon" biosensors. *J Am Chem Soc*, **125**, 4012-4013.
- Du H, Strohsahl CM, Camera J, Miller BL, & Krauss TD (2005) Sensitivity and specificity of metal surface-immobilized "molecular beacon" biosensors. *J Am Chem Soc*, **127**, 7932-7940.
- Dunbar SA, Vander Zee CA, Oliver KG, Karem KL, & Jacobson JW (2003) Quantitative, multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein applications of the Luminex LabMAP system. *J Microbiol Methods*, **53**, 245-252.
- Ekins RP (1998) Ligand assays: from electrophoresis to miniaturized microarrays. *Clin Chem*, **44**, 2015-2030.
- Elsholz B, Worl R, Blohm L, Albers J, Feucht H, Grunwald T, Jurgen B, Schweder T, & Hintsche R (2006) Automated detection and quantitation of bacterial RNA by using electrical microarrays. *Anal Chem*, **78**, 4794-4802.
- Eom HS, Hwang BH, Kim DH, Lee IB, Kim YH, & Cha HJ (2007) Multiple detection of food-borne pathogenic bacteria using a novel 16S rDNA-based oligonucleotide signature chip. *Biosens Bioelectron*, **22**, 845-853.
- Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JD, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill FR, III, & Smith TF (2006) Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev*, **19**, 165-256.
- Esquela-Kerscher A & Slack FJ (2006) Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*, **6**, 259-269.
- Fan C, Plaxco KW, & Heeger AJ (2003) Electrochemical interrogation of conformational changes as a reagentless method for the sequence-specific detection of DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 9134-9137.
- Fan R, Vermesh O, Srivastava A, Yen BK, Qin L, Ahmad H, Kwong GA, Liu CC, Gould J, Hood L, & Heath JR (2008) Integrated barcode chips for rapid, multiplexed analysis of proteins in microliter quantities of blood. *Nat Biotechnol*, **26**, 1373-1378.
- Fang S, Lee HJ, Wark AW, & Corn RM (2006) Attomole microarray detection of microRNAs by nanoparticle-amplified SPR imaging measurements of surface polyadenylation reactions. *J Am Chem Soc*, **128**, 14044-14046.
- Fang Z & Kelley SO (2009) Direct electrocatalytic mRNA detection using PNA-nanowire sensors. *Anal Chem*, **81**, 612-617.

Farabullini F, Lucarelli F, Palchetti I, Marrazza G, & Mascini M (2007) Disposable electrochemical genosensor for the simultaneous analysis of different bacterial food contaminants. *Biosens Bioelectron*, **22**, 1544-1549.

Farkas DH (2001) Bioelectronic DNA chips for the clinical laboratory. *Clin Chem*, **47**, 1871-1872.

Feazel LM, Baumgartner LK, Peterson KL, Frank DN, Harris JK, & Pace NR (2009) Opportunistic pathogens enriched in showerhead biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 16393-16399.

Febbraio F, D'Andrea SE, Mandrich L, Merone L, Rossi M, Nucci R, & Manco G (2008) Irreversible inhibition of the thermophilic esterase EST2 from *Alicyclobacillus acidocaldarius*. *Extremophiles*, **12**, 719-728.

Fling SP & Gregerson DS (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem*, **155**, 83-88.

Fluit AC, Visser MR, & Schmitz FJ (2001) Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev*, **14**, 836-71.

Forrow NJ, Foulds NC, Frew JE, & Law JT (2004) Synthesis, characterization, and evaluation of ferrocene-theophylline conjugates for use in electrochemical enzyme immunoassay. *Bioconjug Chem*, **15**, 137-144.

Fuchs BM, Glockner FO, Wulf J, & Amann R (2000) Unlabeled helper oligonucleotides increase the in situ accessibility to 16S rRNA of fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol*, **66**, 3603-3607.

Gabig-Ciminska M, Holmgren A, Andresen H, Bundvig BK, Wumpelmann M, Albers J, Hintsche R, Breitenstein A, Neubauer P, Los M, Czyz A, Wegrzyn G, Silfversparre G, Jurgen B, Schweder T, & Enfors SO (2004) Electric chips for rapid detection and quantification of nucleic acids. *Biosens Bioelectron*, **19**, 537-546.

Gasnov U, Hughes D, & Hansbro PM (2005) Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiol Rev*, **29**, 851-875.

Gau V, Ma SC, Wang H, Tsukuda J, Kibler J, & Haake DA (2005) Electrochemical molecular analysis without nucleic acid amplification. *Methods*, **37**, 73-83.

Gauglitz G (2005) Direct optical sensors: principles and selected applications. *Anal Bioanal Chem*, **381**, 141-155.

Gauthier F & Archibald F (2001) The ecology of "fecal indicator" bacteria commonly found in pulp and paper mill water systems. *Water Res*, **35**, 2207-2218.

Gehring AG, Albin DM, Reed SA, Tu SI, & Brewster JD (2008) An antibody microarray, in multiwell plate format, for multiplex screening of foodborne pathogenic bacteria and biomolecules. *Anal Bioanal Chem*, **391**, 497-506.

Gilbert C, Winters D, O'Leary A, & Slavik M (2003) Development of a triplex PCR assay for the specific detection of *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., and *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Cell Probes*, **17**, 135-138.

Glisin V, Crkvenjakov R, & Byus C (1974) Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. *Biochemistry*, **13**, 2633-2637.

Glynn B (2006) Application of two-step quantitative reverse-transcription PCR to bacterial diagnostics. *Methods Mol Biol*, **345**, 97-109.

Goel G, Kumar A, Puniya AK, Chen W, & Singh K (2005) Molecular beacon: a multitask probe. *J Appl Microbiol*, **99**, 435-442.

Golovlev V, Sun Y, Fan WH, & McCann MP (2007) Hybridization kinetics on microarray surfaces. *Biotechnol J*, **2**, 988-991.

Gooding J (2002) Electrochemical DNA hybridization biosensors. *Electroanalysis*, **14**, 1149-1156.

Gornicki P, Baudin F, Romby P, Wiewiorowski M, Kryzosiak W, Ebel JP, Ehresmann C, and Ehresmann B (1989) Use of lead(II) to probe the structure of large RNA's. Conformation of the 3' terminal domain of *E. coli* 16S rRNA and its involvement in building the tRNA binding sites. *J Biomol Struct Dyn*, **6**, 971-984.

Gorodetsky AA & Barton JK (2006) Electrochemistry using self-assembled DNA monolayers on highly oriented pyrolytic graphite. *Langmuir*, **22**, 7917-7922.

Gorodetsky AA, Buzzeo MC, & Barton JK (2008) DNA-mediated electrochemistry. *Bioconjug Chem*, **19**, 2285-2296.

Graham CR, Leslie D, Squirrell DJ (1992), Gene probe assays on a fibre-optic evanescent wave biosensor, *Biosens. Bioelectron.*, **7**, 487-493.

Granot J (1983) Effect of finite ionic size on the solution of the Poisson-Boltzmann equation: application to the binding of divalent metal ions to DNA. *Biopolymers*, **22**, 1831-1841.

Graveley BR (2008) Molecular biology: power sequencing. *Nature*, **453**, 1197-1198.

Grow AE, Wood LL, Claycomb JL, & Thompson PA (2003) New biochip technology for label-free detection of pathogens and their toxins. *J Microbiol Methods*, **53**, 221-233.

Gu H, Xu K, Xu C, & Xu B (2006) Biofunctional magnetic nanoparticles for protein separation and pathogen detection. *Chem Commun (Camb)*, **7**, 941-949.

Gutell RR, Weiser B, Woese CR, & Noller HF (1985) Comparative anatomy of 16-S-like ribosomal RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **32**, 155-216.

Hagan MF & Chakraborty AK (2004) Hybridization dynamics of surface immobilized DNA. *J Chem Phys*, **120**, 4958-4968.

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*, **41**, 95-98.

Halperin A, Buhot A, & Zhulina EB (2005) Brush effects on DNA chips: thermodynamics, kinetics, and design guidelines. *Biophys J*, **89**, 796-811.

Harris H & Hopkinson DA (1976) Handbook of Enzyme Elektrophoresis in Human Genetics. *American Elsevier Publishing Company, Inc.*, New York.

Hashimoto K, Ito K, & Ishimori Y (1994) Sequence-specific gene detection with a gold electrode modified with DNA probes and an electrochemically active dye. *Anal Chem*, **66**, 3830-3833.

Heidenreich B, Pöhlmann C, Sprinzl M, & Gareis M (2009) Rapid detection of bacteria during food production by biochips. *Mitteilungsblatt der Fleischforschung Kulmbach*, **48**, 77-84.

Hemila H, Koivula TT, & Palva I (1994) Hormone-sensitive lipase is closely related to several bacterial proteins, and distantly related to acetylcholinesterase and lipoprotein lipase: identification of a superfamily of esterases and lipases. *Biochim Biophys Acta*, **1210**, 249-253.

Hempfen C & Karst U (2006) Labeling strategies for bioassays. *Anal Bioanal Chem*, **384**, 572-583.

Herne TM & Tarlov MJ (1997) Characterization of DNA Probes Immobilized on Gold Surfaces. *J Am Chem Soc*, **119**, 8916-8920.

Higuchi RG & Ochman H (1989) Production of single-stranded DNA templates by exonuclease digestion following the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res*, **17**, 5865.

Hill CS (2001) Molecular diagnostic testing for infectious diseases using TMA technology. *Expert Rev Mol Diagn*, **1**, 445-455.

Hill HD, Vega RA, & Mirkin CA (2007) Nonenzymatic detection of bacterial genomic DNA using the bio bar code assay. *Anal Chem*, **79**, 9218-9223.

Hiller Y, Gershoni JM, Bayer EA, & Wilchek M (1987) Biotin binding to avidin. Oligosaccharide side chain not required for ligand association. *Biochem J*, **248**, 167-171.

Hintsche R, Paeschke M, Uhlig A, & Seitz R (1997) Microbiosensors using electrodes made in Si-technology. *EXS*, **80**, 267-283.

Hintsche R, Albers J, Bernt H, & Eder A (2000) Multiplexing of microelectrode arrays in voltammetric measurements. *Electroanalysis*, **12**, 660-665.

Holm C, Kirchgessner TG, Svenson KL, Lusic AJ, Belfrage P, & Schotz MC (1988) Nucleotide sequence of rat adipose hormone sensitive lipase cDNA. *Nucleic Acids Res*, **16**, 9879.

Holst-Jensen A, Ronning SB, Lovseth A, & Berdal KG (2003) PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Anal Bioanal Chem*, **375**, 985-993.

Houf K, Tutenel A, De ZL, Van HJ, & Vandamme P (2000) Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection and identification of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter skirrowii*. *FEMS Microbiol Lett*, **193**, 89-94.

Hu G (1993) DNA polymerase-catalyzed addition of nontemplated extra nucleotides to the 3' end of a DNA fragment. *DNA Cell Biol*, **12**, 763-770.

Hua JC, Berger J, Pan YC, Hulmes JD, & Udenfriend S (1986) Partial sequencing of human adult, human fetal, and bovine intestinal alkaline phosphatases: comparison with the human placental and liver isozymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 2368-2372.

Huang Y, Humenik M, & Sprinzl M (2007) Esterase 2 from *Alicyclobacillus acidocaldarius* as a reporter and affinity tag for expression and single step purification of polypeptides. *Protein Expr Purif*, **54**, 94-100.

Hughenoltz P, Goebel BM, & Pace NR (1998) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol*, **180**, 4765-4774.

Huhtamella S, Leinonen M, Nieminen T, Fahnert B, Myllykoski L, Breitenstein A, & Neubauer P (2007) RNA-based *Sandwich* hybridisation method for detection of lactic acid bacteria in brewery samples. *J Microbiol Methods*, **68**, 543-553.

Humenik M, Pohlmann C, Wang Y, & Sprinzl M (2008) Enhancement of Electrochemical Signal on Gold Electrodes by Polyvalent Esterase-Dendrimer Clusters. *Bioconjug Chem*, **19**, 2456-2461.

Hunt EA, Goulding AM, & Deo SK (2009) Direct detection and quantification of microRNAs. *Anal Biochem*, **387**, 1-12.

Hurst SJ, Lytton-Jean AK, & Mirkin CA (2006) Maximizing DNA loading on a range of gold nanoparticle sizes. *Anal Chem*, **78**, 8313-8318.

Inoue H, Nojima H, & Okayama H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, **96**, 23-28.

Jadzinsky PD, Calero G, Ackerson CJ, Bushnell DA, & Kornberg RD (2007) Structure of a thiol monolayer-protected gold nanoparticle at 1.1 Å resolution. *Science*, **318**, 430-433.

Jaffrezic-Renault N, Martelet C, Chevolot Y, & Cloarec J-P (2007) Biosensors and Bio-Bar Code Assays Based on Biofunctionalized Magnetic Microbeads. *Sensors*, **7**, 589-614.

Jaing C, Gardner S, McLoughlin K, Mulakken N, egria-Hartman M, Banda P, Williams P, Gu P, Wagner M, Manohar C, & Slezak T (2008) A functional gene array for detection of bacterial virulence elements. *PLoS One*, **3**, e2163.

- Jallepalli PV, Waizenegger IC, Bunz F, Langer S, Speicher MR, Peters JM, Kinzler KW, Vogelstein B, & Lengauer C (2001) Securin is required for chromosomal stability in human cells. *Cell*, **105**, 445-457.
- Janasek D, Franzke J, & Manz A (2006) Scaling and the design of miniaturized chemical-analysis systems. *Nature*, **442**, 374-380.
- Jans K, Bonroy K, De PR, Reekmans G, Jans H, Laureyn W, Smet M, Borghs G, & Maes G (2008) Stability of mixed PEO-thiol SAMs for biosensing applications. *Langmuir*, **24**, 3949-3954.
- Jardi R, Rodriguez-Frias F, Tabernero D, Homs M, Schaper M, Esteban R, & Buti M (2009) Use of the novel INNO-LiPA line probe assay for detection of hepatitis B virus variants that confer resistance to entecavir therapy. *J Clin Microbiol*, **47**, 485-488.
- Jaskunas SR, Lindahl L, & Nomura M (1975) Identification of two copies of the gene for the elongation factor EF-Tu in *E. coli*. *Nature*, **257**, 458-462.
- Jayaraman A, Hall CK, & Genzer J (2007) Computer simulation study of probe-target hybridization in model DNA microarrays: effect of probe surface density and target concentration. *J Chem Phys*, **127**, 144912.
- Jiang DE, Tiago ML, Luo W, & Dai S (2008) The "staple" motif: a key to stability of thiolate-protected gold nanoclusters. *J Am Chem Soc*, **130**, 2777-2779.
- Jiang J, Lee EJ, Gusev Y, & Schmittgen TD (2005) Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines. *Nucleic Acids Res*, **33**, 5394-5403.
- Jonkheijm P, Weinrich D, Schröder H, Niemeyer CM, & Waldmann H (2008) Chemical Strategies for Generating Protein Biochips. *Angew Chem Int Ed Engl*, **47**, 9618-9647.
- Kagiyama N, Fujita S, Momiyama M, Saito H, Shirohama H, & Hori SH (1992) A fluorescent detection method for DNA hybridization using 2-hydroxy-3-naphthoic acid-2'-phenylanilide phosphate as a substrate for alkaline phosphatase. *Acta Histochem Cytochem*, **25**, 467-471.
- Katz E & Willner I (2004) Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: synthesis, properties, and applications. *Angew Chem Int Ed Engl*, **43**, 6042-6108.
- Keer JT & Birch L (2003) Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *J Microbiol Methods*, **53**, 175-183.
- Kelley SO, Barton JK, Jackson NM, & Hill MG (1997) Electrochemistry of methylene blue bound to a DNA-modified electrode. *Bioconjug Chem*, **8**, 31-37.
- Kelly JJ, Chernov BK, Tovstanovsky I, Mirzabekov AD, & Bavykin SG (2002) Radical-generating coordination complexes as tools for rapid and effective fragmentation and fluorescent labeling of nucleic acids for microchip hybridization. *Anal Biochem*, **311**, 103-118.
- Kempe T, Sundquist WI, Chow F, & Hu SL (1985) Chemical and enzymatic biotin-labeling of oligodeoxyribonucleotides. *Nucleic Acids Res*, **13**, 45-57.

Kerman K, Morita Y, Takamura Y, Ozsoz M, & Tamiya E (2004) Modification of Escherichia coli single-stranded DNA binding protein with gold nanoparticles for electrochemical detection of DNA hybridization. *Anal Chim Acta*, **510**, 169-174.

Kern D, Collins M, Fultz T, Detmer J, Hamren S, Peterkin JJ, Sheridan P, Urdea M, White R, Yeghiazarian T, & Todd J (1996) An enhanced-sensitivity branched-DNA assay for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol*, **34**, 3196-3202.

Kinoshita Y, Nishigaki K, & Husimi Y (1997) Fluorescence-, isotope- or biotin-labeling of the 5'-end of single-stranded DNA/RNA using T4 RNA ligase. *Nucleic Acids Res*, **25**, 3747-3748.

Koch M, Huang Y, & Sprinzl M (2008) Peptide-bond synthesis on the ribosome: no free vicinal hydroxy group required on the terminal ribose residue of peptidyl-tRNA. *Angew Chem Int Ed Engl*, **47**, 7242-7245.

Kong RYC, Dung WF, Vrijmoed LLP, & Wu RSS (1995) Co-detection of three species of water-borne bacteria by multiplex PCR. *Mar Pollut Bull*, **31**, 317-324.

Kretzschmann E, Raether H (1968) Radiative decay of non-radiative surface plasmons by light, *Z. Naturforsch.*, 23a, 2135.

Ku WC, Lau WK, Tseng YT, Tzeng CM, & Chiu SK (2004) Dextran sulfate provides a quantitative and quick microarray hybridization reaction. *Biochem Biophys Res Commun*, **315**, 30-37.

Kuhn H, Demidov VV, & Frank-Kamenetskii MD (2002) Rolling-circle amplification under topological constraints. *Nucleic Acids Res*, **30**, 574-580.

Kukolka F & Niemeyer CM (2004) Synthesis of fluorescent oligonucleotide-EYFP conjugate: towards supramolecular construction of semisynthetic biomolecular antennae. *Org Biomol Chem*, **2**, 2203-2206.

Kwok PY (2001) Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, **2**, 235-258.

Kwon SJ, Yang H, Jo K, & Kwak J (2008) An electrochemical immunosensor using p-aminophenol redox cycling by NADH on a self-assembled monolayer and ferrocene-modified Au electrodes. *Analyst*, **133**, 1599-1604.

Kwong GA, Radu CG, Hwang K, Shu CJ, Ma C, Koya RC, Comin-Anduix B, Hadrup SR, Bailey RC, Witte ON, Schumacher TN, Ribas A, & Heath JR (2009) Modular nucleic acid assembled p/MHC microarrays for multiplexed sorting of antigen-specific T cells. *J Am Chem Soc*, **131**, 9695-9703.

Kynclova E, Hartig A, & Schalkhammer T (1995) Oligonucleotide labelled lipase as a new sensitive hybridization probe and its use in bio-assays and biosensors. *J Mol Recognit*, **8**, 139-145.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

- LaGier MJ, Scholin CA, Fell JW, Wang J, & Goodwin KD (2005) An electrochemical RNA hybridization assay for detection of the fecal indicator bacterium *Escherichia coli*. *Mar Pollut Bull*, **50**, 1251-1261.
- Lai RY, Lagally ET, Lee SH, Soh HT, Plaxco KW, & Heeger AJ (2006) Rapid, sequence-specific detection of unpurified PCR amplicons via a reusable, electrochemical sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 4017-4021.
- Lane MJ, Paner T, Kashin I, Faldasz BD, Li B, Gallo FJ, & Benight AS (1997) The thermodynamic advantage of DNA oligonucleotide 'stacking hybridization' reactions: energetics of a DNA nick. *Nucleic Acids Res*, **25**, 611-617.
- Lane S, Evermann J, Loge F, & Call DR (2004) Amplicon secondary structure prevents target hybridization to oligonucleotide microarrays. *Biosens Bioelectron*, **20**, 728-735.
- Lao AI, Su X, & Aung KM (2009) SPR study of DNA hybridization with DNA and PNA probes under stringent conditions. *Biosens Bioelectron*, **24**, 1717-1722.
- Lazcka O, Del Campo FJ, & Munoz FX (2007) Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors. *Biosens Bioelectron*, **22**, 1205-1217.
- Lee CC, Sui G, Elizarov A, Shu CJ, Shin YS, Dooley AN, Huang J, Daridon A, Wyatt P, Stout D, Kolb HC, Witte ON, Satyamurthy N, Heath JR, Phelps ME, Quake SR, & Tseng HR (2005) Multistep synthesis of a radiolabeled imaging probe using integrated microfluidics. *Science*, **310**, 1793-1796.
- Lee YS & Dutta A (2009) MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol*, **4**, 199-227.
- Lemeshko SV, Powdrill T, Belosludtsev YY, & Hogan M (2001) Oligonucleotides form a duplex with non-helical properties on a positively charged surface. *Nucleic Acids Res*, **29**, 3051-3058.
- Lenigk R, Liu RH, Athavale M, Chen Z, Ganser D, Yang J, Rauch C, Liu Y, Chan B, Yu H, Ray M, Marrero R, & Grodzinski P (2002) Plastic biochannel hybridization devices: a new concept for microfluidic DNA arrays. *Anal Biochem*, **311**, 40-49.
- Leontis NB & Westhof E (2001) Geometric nomenclature and classification of RNA base pairs. *RNA*, **7**, 499-512.
- Leontis NB & Westhof E (1998) A common motif organizes the structure of multi-helix loops in 16 S and 23 S ribosomal RNAs. *J Mol Biol*, **283**, 571-583.
- Lermo A, Zacco E, Barak J, Delwiche M, Campoy S, Barbe J, Alegret S, & Pividori MI (2008) Towards Q-PCR of pathogenic bacteria with improved electrochemical double-tagged genosensing detection. *Biosens Bioelectron*, **23**, 1805-1811.
- Letowski J, Brousseau R, & Masson L (2004) Designing better probes: effect of probe size, mismatch position and number on hybridization in DNA oligonucleotide microarrays. *J Microbiol Methods*, **57**, 269-278.
- Li Y, Cu YT, & Luo D (2005) Multiplexed detection of pathogen DNA with DNA-based fluorescence nanobarcodes. *Nat Biotechnol*, **23**, 885-889.

- Liang RQ, Li W, Li Y, Tan CY, Li JX, Jin YX, & Ruan KC (2005) An oligonucleotide microarray for microRNA expression analysis based on labeling RNA with quantum dot and nanogold probe. *Nucleic Acids Res*, **33**, e17.
- Liao JC, Mastali M, Gau V, Suchard MA, Moller AK, Bruckner DA, Babbitt JT, Li Y, Gornbein J, Landaw EM, McCabe ER, Churchill BM, & Haake DA (2006) Use of electrochemical DNA biosensors for rapid molecular identification of uropathogens in clinical urine specimens. *J Clin Microbiol*, **44**, 561-570.
- Liao JC, Mastali M, Li Y, Gau V, Suchard MA, Babbitt J, Gornbein J, Landaw EM, McCabe ER, Churchill BM, & Haake DA (2007) Development of an advanced electrochemical DNA biosensor for bacterial pathogen detection. *J Mol Diagn*, **9**, 158-168.
- Lindquist S & Craig EA (1988) The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet*, **22**, 631-677.
- Liu D, Chen K, Ge K, Nie L, & Yao S (1996) A new urea sensor based on combining the surface acoustic wave device with urease extracted from green soya bean and its application--determination of urea in human urine. *Biosens Bioelectron*, **11**, 435-442.
- Liu G, Wan Y, Gau V, Zhang J, Wang L, Song S, & Fan C (2008a) An enzyme-based E-DNA sensor for sequence-specific detection of femtomolar DNA targets. *J Am Chem Soc*, **130**, 6820-6825.
- Liu Y, Elsholz B, Enfors SO, & Gabig-Ciminska M (2007) Confirmative electric DNA array-based test for food poisoning *Bacillus cereus*. *J Microbiol Methods*, **70**, 55-64.
- Liu Y, Elsholz B, Enfors SO, & Gabig-Ciminska M (2008b) Critical factors for the performance of chip array-based electrical detection of DNA for analysis of pathogenic bacteria. *Anal Biochem*, **382**, 77-86.
- Lizardi PM, Huang X, Zhu Z, Bray-Ward P, Thomas DC, & Ward DC (1998) Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nat Genet*, **19**, 225-232.
- Lo WY & Baeumner AJ (2007) RNA internal standard synthesis by nucleic acid sequence-based amplification for competitive quantitative amplification reactions. *Anal Chem*, **79**, 1548-1554.
- Love JC, Estroff LA, Kriebel JK, Nuzzo RG, & Whitesides GM (2005) Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chem Rev*, **105**, 1103-1169.
- Lowe CR & Goldfinch MJ (1983) Novel electrochemical sensors for clinical analysis. *Biochem Soc Trans*, **11**, 448-451.
- Loy A & Bodrossy L (2006) Highly parallel microbial diagnostics using oligonucleotide microarrays. *Clin Chim Acta*, **363**, 106-119.
- Lucarelli F, Marrazza G, & Mascini M (2006) Dendritic-like streptavidin/alkaline phosphatase nanoarchitectures for amplified electrochemical sensing of DNA sequences. *Langmuir*, **22**, 4305-4309.

Lucarelli F, Marrazza G, Turner AP, & Mascini M (2004) Carbon and gold electrodes as electrochemical transducers for DNA hybridisation sensors. *Biosens Bioelectron*, **19**, 515-530.

Lucarelli F, Tombelli S, Minunni M, Marrazza G, & Mascini M (2008) Electrochemical and piezoelectric DNA biosensors for hybridisation detection. *Anal Chim Acta*, **609**, 139-159.

Ludwig W, Strunk O, Westram R, Richter L, Meier H, Yadhukumar, Buchner A, Lai T, Steppi S, Jobb G, Forster W, Brettske I, Gerber S, Ginhart AW, Gross O, Grumann S, Hermann S, Jost R, Konig A, Liss T, Lussmann R, May M, Nonhoff B, Reichel B, Strehlow R, Stamatakis A, Stuckmann N, Vilbig A, Lenke M, Ludwig T, Bode A, & Schleifer KH (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res*, **32**, 1363-1371.

Luppa PB & Schlebusch H (2008) POCT - Patientennahe Labordiagnostik. *Springer*, Heidelberg.

Majoros IJ, Keszler B, Woehler S, Bull T, & Baker JR (2003) Acetylation of poly(amidoamine) dendrimers. *Macromolecules*, **36**, 5526-5529.

Manco G, Adinolfi E, Pisani FM, Ottolina G, Carrea G, & Rossi M (1998) Overexpression and properties of a new thermophilic and thermostable esterase from *Bacillus acidocaldarius* with sequence similarity to hormone-sensitive lipase subfamily. *Biochem. J*, **332**, 203-212.

Manco G, Mandrich L, & Rossi M (2001). Residues at the Active Site of the Esterase 2 from *Alicyclobacillus acidocaldarius* Involved in Substrate Specificity and Catalytic Activity at High Temperature. *J Biol Chem*, **276**, 37482-37490.

Manco G, Nucci R, & Febbraio F (2009) Use of Esterase Activities for the Detection of Chemical Neurotoxic Agents. *Protein Pept Lett*, Epub, PMID: 19508179.

Mao X, Jiang J, Xu X, Chu X, Luo Y, Shen G, & Yu R (2008) Enzymatic amplification detection of DNA based on "molecular beacon" biosensors. *Biosens Bioelectron*, **23**, 1555-1561.

Marshall A & Hodgson J (1998) DNA chips: an array of possibilities. *Nat Biotechnol*, **16**, 27-31.

Martinez A & Lin J (2006) Effect of an efflux pump inhibitor on the function of the multidrug efflux pump CmeABC and antimicrobial resistance in *Campylobacter*. *Foodborne Pathog Dis*, **3**, 393-402.

McDaniels AE, Rice EW, Reyes AL, Johnson CH, Haugland RA, & Stelma GN, Jr. (1996) Confirmational identification of *Escherichia coli*, a comparison of genotypic and phenotypic assays for glutamate decarboxylase and beta-D-glucuronidase. *Appl Environ Microbiol*, **62**, 3350-3354.

Mehlmann M, Townsend MB, Stears RL, Kuchta RD, & Rowlen KL (2005) Optimization of fragmentation conditions for microarray analysis of viral RNA. *Anal Biochem*, **347**, 316-323.

Meinkoth J & Wahl G (1984) Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal Biochem*, **138**, 267-284.

Merkel JS, Michaud GA, Salcius M, Schweitzer B, & Predki PF (2005) Functional protein microarrays: just how functional are they? *Curr Opin Biotechnol*, **16**, 447-452.

Merkoçi A (2007) Electrochemical biosensing with nanoparticles. *FEBS J*, **274**, 310-316.

Mir KU & Southern EM (1999) Determining the influence of structure on hybridization using oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol*, **17**, 788-792.

Mir M & Katakis I (2008) Target label-free, reagentless electrochemical DNA biosensor based on sub-optimum displacement. *Talanta*, **75**, 432-441.

Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, & Tewari M (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 10513-10518.

Mitsis PG & Kwagh JG (1999) Characterization of the interaction of lambda exonuclease with the ends of DNA. *Nucleic Acids Res*, **27**, 3057-3063.

Möller R, Schuler T, Gunther S, Carlsohn MR, Munder T, & Fritzsche W (2008) Electrical DNA-chip-based identification of different species of the genus *Kitasatospora*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **77**, 1181-1188.

Müller J & Niemeyer CM (2008) DNA-directed assembly of artificial multienzyme complexes. *Biochem Biophys Res Commun*, **377**, 62-67.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, & Erlich H (1992) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology*, **24**, 17-27.

Murphy L (2006) Biosensors and bioelectrochemistry. *Curr Opin Chem Biol*, **10**, 177-184.

Nebling E, Grunwald T, Albers J, Schafer P, & Hintsche R (2004) Electrical detection of viral DNA using ultramicroelectrode arrays. *Analytical Chemistry*, **76**, 689-696.

Nicewarner P, Sr., Raina S, Goodrich GP, Fedoroff NV, & Keating CD (2002) Hybridization and enzymatic extension of au nanoparticle-bound oligonucleotides. *J Am Chem Soc*, **124**, 7314-7323.

Nicholls PJ & Malcolm AD (1989) Nucleic acid analysis by *Sandwich* hybridization. *J Clin Lab Anal*, **3**, 122-135.

Niemeyer CM (2002) The developments of semisynthetic DNA-protein conjugates. *Trends Biotechnol*, **20**, 395-401.

Niemeyer CM, Boldt L, Ceyhan B, & Blohm D (1999a) DNA-Directed immobilization: efficient, reversible, and site-selective surface binding of proteins by means of covalent DNA-streptavidin conjugates. *Anal Biochem*, **268**, 54-63.

Niemeyer CM, Boldt L, Ceyhan B, & Blohm D (1999b) Evaluation of single-stranded nucleic acids as carriers in the DNA-directed assembly of macromolecules. *J Biomol Struct Dyn*, **17**, 527-538.

Niemeyer CM, Sano T, Smith CL, & Cantor CR (1994) Oligonucleotide-directed self-assembly of proteins: semisynthetic DNA--streptavidin hybrid molecules as connectors for the generation of macroscopic arrays and the construction of supramolecular bioconjugates. *Nucleic Acids Res*, **22**, 5530-5539.

Nikkari S, Lopez FA, Lepp PW, Cieslak PR, Ladd-Wilson S, Passaro D, Danila R, & Relman DA (2002) Broad-range bacterial detection and the analysis of unexplained death and critical illness. *Emerg Infect Dis*, **8**, 188-194.

Nilsson M, Malmgren H, Samiotaki M, Kwiatkowski M, Chowdhary BP, & Landegren U (1994) Padlock probes: circularizing oligonucleotides for localized DNA detection. *Science*, **265**, 2085-2088.

Niwa O, Xu Y, Halsall HB, & Heinemann WR (1993) Small-volume voltammetric detection of 4-aminophenol with interdigitated array electrodes and its application to electrochemical enzyme immunoassay. *Anal Chem*, **65**, 1559-1563.

Null AP, Hannis JC, & Muddiman DC (2000) Preparation of single-stranded PCR products for electrospray ionization mass spectrometry using the DNA repair enzyme lambda exonuclease. *Analyst*, **125**, 619-626.

Nurmi J, Ylikoski A, Soukka T, Karp M, & Lovgren T (2000) A new label technology for the detection of specific polymerase chain reaction products in a closed tube. *Nucleic Acids Res*, **28**, E28.

Nygaard AP & Hall BD (1964) Formation and properties of RNA-DNA complexes. *J Mol Biol*, **9**, 125-142.

Paiboonskuwong K & Kato Y (2006) Detection of the mature, but not precursor, RNA using a fluorescent DNA probe. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, **50**, 327-328.

Palchetti I & Mascini M (2008) Nucleic acid biosensors for environmental pollution monitoring. *Analyst*, **133**, 846-854.

Palecek E (1960) Oscillographic polarography of highly polymerized deoxyribonucleic acid. *Nature*, **188**, 656-657.

Palecek E (1961) Oscillographic polarography of deoxyribonucleic acid degradation products. *Biochim Biophys Acta*, **51**, 1-8.

Palecek E (2002) Past, present and future of nucleic acids electrochemistry. *Talanta*, **56**, 809-819.

- Pan S & Rothberg L (2005) Chemical control of electrode functionalization for detection of DNA hybridization by electrochemical impedance spectroscopy. *Langmuir*, **21**, 1022-1027.
- Park SJ, Taton TA, & Mirkin CA (2002) Array-based electrical detection of DNA with nanoparticle probes. *Science*, **295**, 1503-1506.
- Patolsky F, Weizmann Y, & Willner I (2002) Redox-active nucleic-acid replica for the amplified bioelectrocatalytic detection of viral DNA. *J Am Chem Soc*, **124**, 770-772.
- Pedrero M, Campuzano S, & Pingarrón JM (2009) Electroanalytical Sensors and Devices for Multiplexed Detection of Foodborne Pathogen Microorganisms. *Sensors*, **9**, 5503-5520.
- Piana S & Bilic A. The Nature of the Adsorption of Nucleobases on the Gold [111] Surface. *J Phys Chem B*, **110**, 23467-23471.
- Pinder JC & Gratzer WB (1970) On the basis of specific fragmentation of ribonucleic acid by nucleases. *Biochemistry*, **9**, 4519-4524.
- Pioch D, Jurgen B, Evers S, Maurer KH, Hecker M, & Schweder T (2008a) Improved Sandwich-hybridization assay for an electrical DNA-chip-based monitoring of bioprocess-relevant marker genes. *Appl Microbiol Biotechnol*, **78**, 719-728.
- Pioch D, Schweder T, & Jurgen B (2008b) Novel developments for improved detection of specific mRNAs by DNA chips. *Appl Microbiol Biotechnol*, **80**, 953-963.
- Pioch D, Jürgen B, Evers S, Maurer KH, Hecker M, & Schweder T (2007) At-line Monitoring of Bioprocess-Relevant Marker Genes. *Eng Life Sci*, **7**, 373-379.
- Pöhlmann C, Wang Y, & Sprinzl M (2007) Elektronische DNA-Chips. *Biospektrum*, **13**, 159-161.
- Poland H (2006) Integrating genomics against infectious disease. *Nat Genet*, **38**, 513-514.
- Pozhitkov AE, Stedtfeld RD, Hashsham SA, & Noble PA (2007a) Revision of the nonequilibrium thermal dissociation and stringent washing approaches for identification of mixed nucleic acid targets by microarrays. *Nucleic Acids Res*, **35**, e70.
- Pozhitkov AE, Tautz D, & Noble PA (2007b) Oligonucleotide microarrays: widely applied--poorly understood. *Brief Funct Genomic Proteomic*, **6**, 141-148.
- Prathima N, Harini M, Rai N, Chandrashekara RH, Ayappa KG, Sampath S, & Biswas SK (2005) Thermal study of accumulation of conformational disorders in the self-assembled monolayers of C8 and C18 alkanethiols on the Au111 surface. *Langmuir*, **21**, 2364-2374.
- Priano G, Pallarola D, & Battaglini F (2007) Endotoxin detection in a competitive electrochemical assay: synthesis of a suitable endotoxin conjugate. *Anal Biochem*, **362**, 108-116.

Protozanova E, Yakovchuk P, & Frank-Kamenetskii MD (2004) Stacked-unstacked equilibrium at the nick site of DNA. *J Mol Biol*, **342**, 775-785.

Pyshnyi DV, Lomzov AA, Pyshnaya IA, & Ivanova EM (2006) Hybridization of the bridged oligonucleotides with DNA: thermodynamic and kinetic studies. *J Biomol Struct Dyn*, **23**, 567-580.

Pyshnyi DV, Pyshnaya I, Levina A, Goldberg E, Zarytova V, Knorre D, & Ivanova E (2001) Thermodynamic analysis of stacking hybridization of oligonucleotides with DNA template. *J Biomol Struct Dyn*, **19**, 555-570.

Reske T, Mix M, Bahl H, & Flechsig GU (2007) Electrochemical detection of osmium tetroxide-labeled PCR-products by means of protective strands. *Talanta*, **74**, 393-397.

Rijpens NP & Herman LM (2002) Molecular methods for identification and detection of bacterial food pathogens. *J AOAC Int*, **85**, 984-995.

Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, Rosenwald S, Spector Y, Zepeniuk M, Benjamin H, Shabes N, Tabak S, Levy A, Lebanony D, Goren Y, Silberschein E, Targan N, Ben-Ari A, Gilad S, Sion-Vardy N, Tobar A, Feinmesser M, Kharenko O, Nativ O, Nass D, Perelman M, Yosepovich A, Shalmon B, Polak-Charcon S, Fridman E, Avniel A, Bentwich I, Bentwich Z, Cohen D, Chajut A, & Barshack I (2008) MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nat Biotechnol*, **26**, 462-469.

Rosi NL & Mirkin CA (2005) Nanostructures in biodiagnostics. *Chem Rev*, **105**, 1547-1562.

Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, Pusztai L, Ravdin PM, & Hortobagyi GN (2009) The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist*, **14**, 320-368.

Rule RA, Pozhitkov AE, & Noble PA (2009) Use of hidden correlations in short oligonucleotide array data are insufficient for accurate quantification of nucleic acid targets in complex target mixtures. *J Microbiol Methods*, **76**, 188-195.

Sambrook J & Russell DW (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor.

SantaLucia J, Jr. (1998) A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 1460-1465.

SantaLucia J, Jr. & Hicks D (2004) The thermodynamics of DNA structural motifs. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **33**, 415-440.

Santoro SW & Joyce GF (1997) A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4262-4266.

Sassolas A, Leca-Bouvier BD, & Blum LJ (2008) DNA biosensors and microarrays. *Chem Rev*, **108**, 109-139.

Scheffe JH, Lehmann KE, Buschmann IR, Unger T, & Funke-Kaiser H (2006) Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. *J Mol Med*, **84**, 901-910.

- Schena M, Shalon D, Davis RW, & Brown PO (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, **270**, 467-470.
- Schlenoff JB, Li M, & Ly H (1995) Stability and Self-Exchange in Alkanethiol Monolayers. *J Am Chem Soc*, **117**, 12528-12536.
- Schröder H, Hoffmann L, Muller J, Alhorn P, Fleger M, Neyer A, & Niemeyer CM (2009) Addressable Microfluidic Polymer Chip for DNA-Directed Immobilization of Oligonucleotide-Tagged Compounds. *Small*.
- Sedmak JJ & Grossberg SE (1977) A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Anal Biochem*, **79**, 544-552.
- Seidel M & Niessner R (2008) Automated analytical microarrays: a critical review. *Anal Bioanal Chem*, **391**, 1521-1544.
- Settanni L & Corsetti A (2007) The use of multiplex PCR to detect and differentiate food- and beverage-associated microorganisms: A review. *J Microbiol Methods*, **69**, 1-22.
- Shafer DE, Inman JK, & Lees A (2000) Reaction of Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) with maleimide and alpha-haloacyl groups: anomalous elution of TCEP by gel filtration. *Anal Biochem*, **282**, 161-164.
- Shchepinov MS, Case-Green SC, & Southern EM (1997) Steric factors influencing hybridisation of nucleic acids to oligonucleotide arrays. *Nucleic Acids Res*, **25**, 1155-1161.
- Sheridan GE, Masters CI, Shallcross JA, & MacKey BM (1998) Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in Escherichia coli cells. *Appl Environ Microbiol*, **64**, 1313-1318.
- Siva AC, Nelson LJ, Fleischer CL, Majlessi M, Becker MM, Vessella RL, & Reynolds MA (2009) Molecular assays for the detection of microRNAs in prostate cancer. *Mol Cancer*, **8**, 17.
- Small J, Call DR, Brockman FJ, Straub TM, & Chandler DP (2001) Direct Detection of 16S rRNA in Soil Extracts by Using Oligonucleotide Microarrays. *Appl Environ Microbiol*, **67**, 4708-4716.
- Smolina IV, Cherny DI, Nietupski RM, Beals T, Smith JH, Lane DJ, Broude NE, & Demidov VV (2005) High-density fluorescently labeled rolling-circle amplicons for DNA diagnostics. *Anal Biochem*, **347**, 152-155.
- Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Mark WD, Huse SM, Neal PR, Arrieta JM, & Herndl GJ (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 12115-12120.
- Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, & Brennan M (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, **51**, 1409-1416.
- Southern E, Mir K, & Shchepinov M (1999) Molecular interactions on microarrays. *Nat Genet*, **21**, 5-9.

Stedtfeld RD, Wick LM, Baushke SW, Tourlousse DM, Herzog AB, Xia Y, Rouillard JM, Klappenbach JA, Cole JR, Gulari E, Tiedje JM, & Hashsham SA (2007) Influence of dangling ends and surface-proximal tails of targets on probe-target duplex formation in 16S rRNA gene-based diagnostic arrays. *Appl Environ Microbiol*, **73**, 380-389.

Steel AB, Herne TM, & Tarlov MJ (1998) Electrochemical quantitation of DNA immobilized on gold. *Anal Chem*, **70**, 4670-4677.

Steel AB, Levicky RL, Herne TM, & Tarlov MJ (2000) Immobilization of nucleic acids at solid surfaces: effect of oligonucleotide length on layer assembly. *Biophys J*, **79**, 975-981.

Stemmann O, Gorr IH, & Boos D (2006) Anaphase topsy-turvy: Cdk1 a securin, separate a CKI. *Cell Cycle*, **5**, 11-13.

Straub TM, Dockendorff BP, Quinonez-Diaz MD, Valdez CO, Shutthanandan JI, Tarasevich BJ, Grate JW, & Bruckner-Lea CJ (2005) Automated methods for multiplexed pathogen detection. *J Microbiol Methods*, **62**, 303-316.

Streit S, Michalski CW, Erkan M, Kleeff J, & Friess H (2009) Northern blot analysis for detection and quantification of RNA in pancreatic cancer cells and tissues. *Nat Protoc*, **4**, 37-43.

Suenaga H, Liu R, Shiramasa Y, & Kanagawa T (2005) Novel approach to quantitative detection of specific rRNA in a microbial community, using catalytic DNA. *Appl Environ Microbiol*, **71**, 4879-4884.

Sugimoto N, Nakano S, Katoh M, Matsumura A, Nakamuta H, Ohmichi T, Yoneyama M, & Sasaki M (1995) Thermodynamic parameters to predict stability of RNA/DNA hybrid duplexes. *Biochemistry*, **34**, 11211-11216.

Takiya T, Futo S, Tsuna M, Namimatsu T, Sakano T, Kawai K, & Suzuki T (2004) Identification of single base-pair mutation on uidA gene of Escherichia coli O157:H7 by Peptide Nucleic Acids (PNA) mediated PCR clamping. *Biosci Biotechnol Biochem*, **68**, 360-368.

Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, Castoldi M, Soutschek J, Koteliansky V, Rosenwald A, Basson MA, Licht JD, Pena JT, Rouhanifard SH, Muckenthaler MU, Tuschl T, Martin GR, Bauersachs J, & Engelhardt S (2008) MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature*, **456**, 980-984.

Tian T, Shu Y, Chen J, Hu Z, Xu L, Jin G, Liang J, Liu P, Zhou X, Miao R, Ma H, Chen Y, & Shen H (2009) A functional genetic variant in microRNA-196a2 is associated with increased susceptibility of lung cancer in Chinese. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **18**, 1183-1187.

Tian Y, He Y, & Mao C (2006) Cascade signal amplification for DNA detection. *Chembiochem*, **7**, 1862-1864.

Tomalia DA, Huang B, Swanson DR, Brothers HM, & Klimash JW (2003) Structure control within poly(amidoamine)dendrimers: size, shape and regio-chemical mimicry of globular proteins. *Tetrahedron*, **59**, 3799-3813.

- Tombelli S, Mascini M, & Turner AP (2002) Improved procedures for immobilisation of oligonucleotides on gold-coated piezoelectric quartz crystals. *Biosens Bioelectron*, **17**, 929-936.
- Tsourkas A, Behlke MA, Rose SD, & Bao G (2003) Hybridization kinetics and thermodynamics of molecular beacons. *Nucleic Acids Res*, **31**, 1319-1330.
- Tyagi S & Kramer FR (1996) Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol*, **14**, 303-308.
- Uhlenbeck OC, Baller J, Doty P (1970) Complementary oligonucleotide binding to the anticodon loop of fMet-transfer RNA. *Nature*, **225**, 508-510.
- Um SH, Lee JB, Kwon SY, Li Y, & Luo D (2006) Dendrimer-like DNA-based fluorescence nanobarcodes. *Nat Protoc*, **1**, 995-1000.
- Umek RM, Lin SW, Vielmetter J, Terbrueggen RH, Irvine B, Yu CJ, Kayyem JF, Yowanto H, Blackburn GF, Farkas DH, & Chen YP (2001) Electronic detection of nucleic acids: a versatile platform for molecular diagnostics. *J Mol Diagn*, **3**, 74-84.
- Vallee-Belisle A, Ricci F, & Plaxco KW (2009) Thermodynamic basis for the optimization of binding-induced biomolecular switches and structure-switching biosensors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 13802-13807.
- van der Meide PH, Vijgenboom E, Talens A, & Bosch L (1983) The role of EF-Tu in the expression of tufA and tufB genes. *Eur J Biochem*, **130**, 397-407.
- van der Pol B, Quinn TC, Gaydos CA, Crotchfelt K, Schachter J, Moncada J, Jungkind D, Martin DH, Turner B, Peyton C, & Jones RB (2000) Multicenter evaluation of the AMPLICOR and automated COBAS AMPLICOR CT/NG tests for detection of *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Microbiol*, **38**, 1105-1112.
- Varallyay E, Burgyan J, & Havelda Z (2007) Detection of microRNAs by Northern blot analyses using LNA probes. *Methods*, **43**, 140-145.
- Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, Ghosh D, Pienta KJ, Sewalt RG, Otte AP, Rubin MA, & Chinnaiyan AM (2002) The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*, **419**, 624-629.
- Vaughan EE, Schut F, Heilig HG, Zoetendal EG, de Vos WM, & Akkermans AD (2000) A molecular view of the intestinal ecosystem. *Curr Issues Intest Microbiol*, **1**, 1-12.
- Vernon SD, Farkas DH, Unger ER, Chan V, Miller DL, Chen YP, Blackburn GF, & Reeves WC (2003) Bioelectronic DNA detection of human papillomaviruses using eSensor: a model system for detection of multiple pathogens. *BMC Infect Dis*, **3**, 12.
- Vester B, Lundberg LB, Sørensen MD, Babu BR, Douthwaite S, & Wengel J (2002) LNAzymes: Incorporation of LNA-Type Monomers into DNAzymes Markedly Increases RNA Cleavage. *J Am Chem Soc*, **124**, 13682-13683.

- Vester B & Wengel J (2004) LNA (locked nucleic acid): high-affinity targeting of complementary RNA and DNA. *Biochemistry*, **43**, 13233-13241.
- Vilas-Boas GT, Peruca AP, & Arantes OM (2007) Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. *Can J Microbiol*, **53**, 673-687.
- Vogt E, Kirsch-Volders M, Parry J, & Eichenlaub-Ritter U (2008) Spindle formation, chromosome segregation and the spindle checkpoint in mammalian oocytes and susceptibility to meiotic error. *Mutat Res*, **651**, 14-29.
- von Wintzingerode WF, Bocker S, Schlotelburg C, Chiu NH, Storm N, Jurinke C, Cantor CR, Gobel UB, & van den BD (2002) Base-specific fragmentation of amplified 16S rRNA genes analyzed by mass spectrometry: a tool for rapid bacterial identification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 7039-7044.
- von Wintzingerode WF, Gobel UB, & Stackebrandt E (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev*, **21**, 213-229.
- Waldman SA & Terzic A (2009) A study of microRNAs in silico and in vivo: diagnostic and therapeutic applications in cancer. *FEBS J*, **276**, 2157-2164.
- Wallace RB, Shaffer J, Murphy RF, Bonner J, Hirose T, & Itakura K (1979) Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Res*, **6**, 3543-3557.
- Wan Y, Zhang J, Liu G, Pan D, Wang L, Song S, & Fan C (2009) Ligase-based multiple DNA analysis by using an electrochemical sensor array. *Biosens Bioelectron*, **24**, 1209-1212.
- Wang J (2006) Electrochemical biosensors: towards point-of-care cancer diagnostics. *Biosens Bioelectron*, **21**, 1887-1892.
- Wang J (1999) Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review. *J Pharm Biomed Anal*, **19**, 47-53.
- Wang J (2008) Electrochemical glucose biosensors. *Chem Rev*, **108**, 814-825.
- Wang J, Li J, Baca AJ, Hu J, Zhou F, Yan W, & Pang DW (2003) Amplified voltammetric detection of DNA hybridization via oxidation of ferrocene caps on gold nanoparticle/streptavidin conjugates. *Anal Chem*, **75**, 3941-3945.
- Wang K, Tang Z, Yang CJ, Kim Y, Fang X, Li W, Wu Y, Medley CD, Cao Z, Li J, Colon P, Lin H, & Tan W (2009) Molecular engineering of DNA: molecular beacons. *Angew Chem Int Ed Engl*, **48**, 856-870.
- Wang Y, Stanzel M, Gumbracht W, Humenik M, & Sprinzl M (2007) Esterase 2-oligodeoxynucleotide conjugates as sensitive reporter for electrochemical detection of nucleic acid hybridization. *Biosens Bioelectron*, **22**, 1798-1806.
- Wark AW, Lee HJ, & Corn RM (2008) Multiplexed detection methods for profiling microRNA expression in biological samples. *Angew Chem Int Ed Engl*, **47**, 644-652.

- Watson JD & Crick FH (1953) Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, **171**, 737-738.
- Weckx S, Carlon E, DeVuyst L, & Van HP (2007) Thermodynamic behavior of short oligonucleotides in microarray hybridizations can be described using Gibbs free energy in a nearest-neighbor model. *J Phys Chem B*, **111**, 13583-13590.
- Wei F, Wang J, Liao W, Zimmermann BG, Wong DT, & Ho CM (2008) Electrochemical detection of low-copy number salivary RNA based on specific signal amplification with a hairpin probe. *Nucleic Acids Res*, **36**, e65.
- Wetmur JG & Davidson N (1968) Kinetics of renaturation of DNA. *J Mol Biol*, **31**, 349-370.
- Whitesides GM & Labinis PE (1990) Wet Chemical Approaches to the Characterization of Organic Surfaces: Self- Assembled Monolayers, Wetting, and the Physical-Organic Chemistry of the Solid-Liquid Interface. *Langmuir*, **6**, 87-96.
- Wilson ML & Gaido L (2004) Laboratory diagnosis of urinary tract infections in adult patients. *Clin Infect Dis*, **38**, 1150-1158.
- Wimberly BT, Brodersen DE, Clemons WM, Jr., Morgan-Warren RJ, Carter AP, Vornrhein C, Hartsch T, & Ramakrishnan V (2000) Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*, **407**, 327-339.
- Windbichler N, von PF, Mayer O, Csaszar E, & Schroeder R (2008) Isolation of small RNA-binding proteins from E. coli: evidence for frequent interaction of RNAs with RNA polymerase. *RNA Biol*, **5**, 30-40.
- Woese CR, Magrum LJ, Gupta R, Siegel RB, Stahl DA, Kop J, Crawford N, Brosius J, Gutell R, Hogan JJ, & Noller HF (1980) Secondary structure model for bacterial 16S ribosomal RNA: phylogenetic, enzymatic and chemical evidence. *Nucleic Acids Res*, **8**, 2275-2293.
- Wojciechowski M, Sundseth R, Moreno M, & Henkens R (1999) Multichannel Electrochemical Detection System for Quantitative Monitoring of PCR Amplification. *Clin Chem*, **45**, 1690-1693.
- Wolfenden R, Ridgway C, & Young G (1998) Spontaneous Hydrolysis of Ionized Phosphate Monoesters and Diesters and the Proficiencies of Phosphatases and Phosphodiesterases as Catalysts. *JACS*, **120**, 833-834.
- Wolny PM, Spatz JP, & Richter RP (2009) On the Adsorption Behavior of Biotin-Binding Proteins on Gold and Silica. *Langmuir*, DOI 10.1021/la902226b.
- Wolter A, Niessner R, & Seidel M (2008) Detection of Escherichia coli O157:H7, Salmonella typhimurium, and Legionella pneumophila in water using a flow-through chemiluminescence microarray readout system. *Anal Chem*, **80**, 5854-5863.
- Woo PC, Lau SK, Teng JL, Tse H, & Yuen KY (2008) Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect*, **14**, 908-934.

Wood WI, Gitschier J, Lasky LA, & Lawn RM (1985) Base composition-independent hybridization in tetramethylammonium chloride: a method for oligonucleotide screening of highly complex gene libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 1585-1588.

Wuyts J, Perriere G, & Van de PY (2004) The European ribosomal RNA database. *Nucleic Acids Res*, **32**, D101-D103.

Xiao Y, Lubin AA, Baker BR, Plaxco KW, & Heeger AJ (2006) Single-step electronic detection of femtomolar DNA by target-induced strand displacement in an electrode-bound duplex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 16677-16680.

Xin Y, Laing C, Leontis NB, & Schlick T (2008) Annotation of tertiary interactions in RNA structures reveals variations and correlations. *RNA*, **14**, 2465-2477.

Yang L & Ellington AD (2008) Real-time PCR detection of protein analytes with conformation-switching aptamers. *Anal Biochem*, **380**, 164-173.

Yilmaz O & Demiray E (2007) Clinical role and importance of fluorescence in situ hybridization method in diagnosis of H pylori infection and determination of clarithromycin resistance in H pylori eradication therapy. *World J Gastroenterol*, **13**, 671-675.

Young BD & Paul J (1973) Ribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization as a second-order reaction. *Biochem J*, **135**, 573-576.

Yuan BF, Zhuang XY, Hao YH, & Tan Z (2008) Kinetics of base stacking-aided DNA hybridization. *Chem Commun (Camb)*, **48**, 6600-6602.

Zhang J, Lang HP, Huber F, Bietsch A, Grange W, Certa U, McKendry R, Guntherodt HJ, Hegner M, & Gerber C (2006) Rapid and label-free nanomechanical detection of biomarker transcripts in human RNA. *Nat Nanotechnol*, **1**, 214-220.

Zhang J, Lao R, Song S, Yan Z, & Fan C (2008) Design of an oligonucleotide-incorporated nonfouling surface and its application in electrochemical DNA sensors for highly sensitive and sequence-specific detection of target DNA. *Anal Chem*, **80**, 9029-9033.

Zhao W, Ali MM, Brook MA, & Li Y (2008) Rolling circle amplification: applications in nanotechnology and biodetection with functional nucleic acids. *Angew Chem Int Ed Engl*, **47**, 6330-6337.

Zhu LX, Zhang ZW, Wang C, Yang HW, Jiang D, Zhang Q, Mitchelson K, & Cheng J (2007) Use of a DNA microarray for simultaneous detection of antibiotic resistance genes among staphylococcal clinical isolates. *J Clin Microbiol*, **45**, 3514-3521.

Zor T & Selinger Z (1996) Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal Biochem*, **236**, 302-308.

Anhang A: Übersicht der verwendeten Chemikalien, Biochemikalien und Oligonukleotide

Tabelle A-1: Übersicht der verwendeten Chemikalien und deren Bezugsquellen.

Bezeichnung	Bezugsquelle
1-Dodecylmercaptan	Sigma-Aldrich (Steinheim)
1-Oktanthiol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
2-Aminophenol	Acros Organics (Geel, Belgien)
2-Mercaptoethanol	Fluka (Neu-Ulm)
2-Naphtylacetat	Fluka (Neu-Ulm)
2-Propanol	Fluka (Neu-Ulm)
3-Mercapto-1-propanol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
4-Nitrophenylacetat	Fluka (Neu-Ulm)
6-Mercapto-1-hexanol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
11-Mercapto-1-undecanol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
11-Mercapto-1-undecanolsäure	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Aceton	Acros Organics (Geel, Belgien)
Acetonitril	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Acrylamid/ Bisacrylamid (30% bzw. 40%)	Roth (Karlsruhe)
Agar	AppliChem (Darmstadt)
Agarose	Eurogentec (Köln)
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck (Darmstadt)
Biotin-Maleimid	Reactolab SA (Servion, Schweiz)
BlockIT	Arrayit (Sunnyvale, USA)
Bradfordlösung (Roti-Nanoquant)	Roth (Karlsruhe)
Borsäure	Grüssing (Filsum)
Bromchlorphenolblau	Merck (Darmstadt)
Coomassie Brilliant Blau G250	ICN Biomedicals (Aurora, Ohio, USA)
Chloroform	Acros Organics (Geel, Belgien)
Dextransulfat-Natriumsalz aus <i>Leuconostoc</i> ssp.	Fluka (Neu-Ulm)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fluka (Neu-Ulm)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck (Darmstadt)
di-Natriumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
Echtblausalz BB	Fluka (Neu-Ulm)
EDTA	Merck (Darmstadt)
Essigsäure (konz.)	Merck (Darmstadt)
Ethanol abs.	VWR (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Serva (Heidelberg)
Formaldehyd (37 %)	Merck (Darmstadt)
Formamid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Gelfiltrationsstandard	Biorad (München)
GelRed Nucleic Acid Stain	Biotrend (Köln)

Glaskügelchen (\varnothing 425 – 600 μm)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Glaskügelchen (\varnothing < 106 μm)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
Harnstoff	Grüssing (Filsum)
HEPES	Roth (Karlsruhe)
Isoamylalkohol	Merck (Darmstadt)
Methanol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Methyl-PEO ₈ -NHS-Ester	Pierce (Bonn)
MOPS	Fluka (Neu-Ulm)
Natriumacetat	Grüssing (Filsum)
Natriumazid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumchlorid (NaCl)	Grüssing (Filsum)
Natriumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt)
NBT/BCIP	Roche (Mannheim)
NHS-PEG ₂ -Maleimid	Pierce (Bonn)
NHS-PEG ₆ -Maleimid	Pierce (Bonn)
NHS-PEG ₁₂ -Maleimid	Pierce (Bonn)
N,N-Dimethylformamid	Merck (Darmstadt)
N-Lauroylsarcosin	Ciba-Geigy (New Jersey, USA)
<i>p</i> -Aminophenylbutyrat	Laboratorium für Biochemie, Universität Bayreuth
PAMAM Dendrimer, Generation 3 und 5	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Phenol	Roth (Karlsruhe)
Polyethylenglykol (PEG 8.000)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Salzsäure	Ridel-de Haën (Seelze)
SDS	Merck (Darmstadt)
Silber/Silberchloridlösung	Acheson Colloiden B.V. (Scheemda, Niederlande)
SM(PEG) ₂	Pierce (Bonn)
Stains all	Sigma-Aldrich (Steinheim)
sulfo-SMCC	Pierce (Bonn)
TCEP	Pierce (Bonn)
TCEP (immobilisiert)	Pierce (Bonn)
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin)	Merck (Darmstadt)
TMAC	AppliChem (Darmstadt)
Triethylamin	Merck (Darmstadt)
Triethylenglykomono-11-mercaptoundecylether	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tris	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tween 20	Fluka (Neu-Ulm)
Xylencyanol	Serva (Heidelberg)

Tabelle A-2: Übersicht der verwendeten Biochemikalien und Enzyme und deren Bezugsquellen.

Bezeichnung	Bezugsquelle
Achromopeptidase aus <i>Achromobacter lyticus</i>	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Alkalische Phosphatase-Streptavidin-Konjugat	Roche (Mannheim)
Ampligase	Biozym (Hess, Oldendorf)
CircLigase	Biozym (Hess, Oldendorf)
Concanavalin A aus <i>Canavalia ensiformis</i> (Typ IV)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
DNA-Längenstandards (50 bp – 10 kb)	Eurogentec (Köln), Fermentas (St. Leon-Rot), NEB (Frankfurt)
DNase I (RNase-frei)	Qiagen (Hilden)
Exonuclease VII	USB (Cleaveland, USA)
Exonuclease λ	USB (Cleaveland, USA)
Heringssperma DNA	Boehringer Ingelheim (Mannheim)
Lysozym	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Meerrettich Peroxidase-Streptavidin-Konjugat	Roche (Mannheim)
Mutanolysin aus <i>Streptomyces globisporus</i> ATCC 21553	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Proteinase K	Qiagen (Hilden)
Pfu-Polymerase	Promega (Mannheim)
Proteinstandard (PageRuler Prestained Protein Ladder)	Fermentas (St. Leon-Rot)
Restriktionsendonukleasen und Restriktionspuffer	NEB (Frankfurt am Main)
Ribonukleosid-Vanadylkomplex	NEB (Frankfurt am Main)
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
RNasin	Promega (Mannheim)
Taq-Polymerase	Biozym (Hess, Oldendorf), GE Healthcare (München)
T4 DNA-Ligase	NEB (Frankfurt am Main)

Tabelle A-3: Bezeichnung und Zusammensetzung für die Kultivierung von Bakterien und Hefen verwendeter Nährmedien.

Bezeichnung	Zusammensetzung
BHI	37 g Hirn-Herz-Infusion (BD, Le Pont de Claix, Frankreich) ad 1.000 mL ddH ₂ O (pH 7,4)
<i>Brilliance E. coli/coliform selective agar</i>	28,1 g <i>Brilliance E. coli/coliform selective agar</i> (Oxoid, Hampshire, UK) ad 1.000 mL ddH ₂ O (pH 6,7)
DHL	63,5 g DHL (Merck, Darmstadt) ad 1.000 mL ddH ₂ O (pH 7,2)
LB	5 g NaCl 10 g Pepton (Gerbu, Gaiberg)

	5 g Hefeextrakt (Serva, Heidelberg) ad 1.000 mL ddH ₂ O (pH 7,0)
MRS	52,2 g MRS (Merck, Darmstadt) ad 1.000 mL ddH ₂ O (pH 5,7)
M9	10,5 g K ₂ PO ₄ 4,5 g KH ₂ PO ₄ 0,5 g tri-Natrium-citrat 1,0 g Ammoniumsulfat ad 1.000 mL ddH ₂ O + 15 mL 40 % (w/v) Glukose + 4 mL 1,7 M CaCl ₂ + 2,5 mL 1 M MgSO ₄
Nutrient Broth	5 g Pepton 3 g Fleischextrakt (Fluka, Neu-Ulm) ad 1.000 mL ddH ₂ O (pH 7,0)
Peptonwasser (gepuffert)	25,5 g Peptonwasser (Merck, Darmstadt) ad 1.000 mL ddH ₂ O (pH 7,0)
Psi Broth	20 g Trypton (BD, Heidelberg) 5 g Hefeextrakt (BD, Heidelberg) 5 g MgSO ₄ ad 1.000 mL ddH ₂ O (pH 7,6)
Standard I-Nähragar	37,0g Standard I-Nähragar (Merck, Darmstadt) ad 1.000 mL ddH ₂ O (pH 7,5)
YPD	10 g Hefeextrakt 20 g Pepton 20 g Glukose ad 1.000 mL ddH ₂ O (pH 6,5)

Tabelle A-4: **Übersicht der verwendeten Oligonukleotide.** Die *GenBank accession number* der für die Auswahl der Fänger herangezogenen Sequenzen ist jeweils in Klammern angegeben. Basenaustausche sind gegebenenfalls fett markiert, die T7-Promotor-Sequenz ist unterstrichen.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Modifikation
Fänger-Oligonukleotide für die Bakteriendetektion		
ECOLI (X08725)	ACGGTTCCCGAAGGCACATTCTCATTTTTTTTTT	3' Thiol
ECOLI_V3 (X08725)	GAGCAAAGGTATTAACCTTACTCCTTTTTTTTT	3' Thiol
EHEC (L31880)	ACAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATTTTTTTTTT	3' Thiol
HALVEI (M59155)	AGAGTTCCCGAAGGCACTAAAGCATTTTTTTTTT	3' Thiol
CFREUNDII (AJ233408)	AGAGTTCCCGAAGGCACCAAAAGCATTTTTTTTTT	3' Thiol
SDYSENTERIAE (X96966)	ACAGTTCCCGAAGGCACCCTCGTATTTTTTTTT	3' Thiol
BSUBTILIS (AJ276351)	TCTGCCCCGAAGGGGACGTCCTATTTTTTTTT	3' Thiol
BATROPHAEUS (AB021181)	TCTGCCCCGAAGGGGAAGCCCTATTTTTTTTT	3' Thiol
LISTERIA (S55473)	TTTGTCCCGAAGGGAAAGCTCTGTTTTTTTT	3' Thiol
LEUCONOSTOC	TTTGTCTCCGAAGAGAACACTTCTTTTTTTTT	3' Thiol

(M22034)		
LINNOCUA (S55473)	ATGGTTTTATGGGATTGGCTCCACTTTTTTTTT	3' Thiol
LMONOCYTOGENES	ATAGTTTTATGGGATTAGCTCCACTTTTTTTTT	3' Thiol
(X56153)		
UNI_16S	CCCGGGAACGTATTCACCGTTTTTTTTT	3' Thiol
UNI_23S	GAGCCGACATCGAGGTGCCAAAACCTTTTTTTTT	3' Thiol
oligodT	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	3' Thiol
ECOLI_3TSpacer	ACGGTTCCTCCGAAGGCACATTCTCATT	3' Thiol
ECOLI_6TSpacer	ACGGTTCCTCCGAAGGCACATTCTCATT	3' Thiol
ECOLI_12TSpacer	ACGGTTCCTCCGAAGGCACATTCTCATT	3' Thiol
UD1082_komplementär	ATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCTTTTTTTTT	3' Thiol
ECOLI_5'SH	TTTTTTTTTACGGTTCCTCCGAAGGCACATTCTCA	5' Thiol
LISTERIA_5'SH	TTTTTTTTTTTTGTCCCAGGGAAAAGCTCTG	5' Thiol
HALVEI_5'SH	TTTTTTTTTAGAGTTCCTCCGAAGGCACTAAAGCA	5' Thiol
Helfer-Oligonukleotide für die Bakteriendetektion		
Helfer ⁻	TTCACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTC	
Helfer ⁺	CTCAGCACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCAC	
Helfer ⁺ _3nt gap	ACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGT	
Helfer ⁺ _6nt gap	ACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACC	
Helfer+_10nt gap	GAGCTGACGACAACCATGCAC	
Helfer_LISTERIA	GCTTCATGTAGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAGT	
Helfer_LEUCONOSTOC	CTCAGCACACGAGCTGACGACGACCATGCACCACCTGTCAC	
Helfer_ECOLI	GAGCTGACGACAACCATGCAC	
Helfer_UD1082	TCTCTGAAAACCTCCGTGGATGTCAAG	
Helfer_ECOLI_V3	GAGTTAGCCGGTGCTTCTCTGCGGGTAACGTCAAT	
Helfer_23S_1	CMWACCCTTGGGACCKRCTHCAGCCCCAGGATGYGAY	
Helfer_23S_2	RAACCCAGCTCGGTRCCRCRTTAAWKGGCGAACAGC	
Detektoroligonukleotide für die Bakteriendetektion		
UD1082	TTTTTTGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACAT	5' Amino
UD1082_Biotin	TTTTTTGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACAT	5' Biotin
UD_LISTERIA	TTTTTTGGCATGCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCG	5' Amino
UD2866_23S rRNA	TTTTTTGATAGGGACCGAACTGTCTCACGACGACGTCT	5' Amino
Oligonukleotide für 16S rRNA-Sequenzierung und <i>in vitro</i>-Transkription		
16SrRNA_for_T7	CGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGAGCATGTGGTTAATTCGA	
16SrRNA_for	GGAGCATGTGGTTAATTCGA	
16SrRNA_rev	ATTGTAGCACGTGTGTAGCCC	
Oligonukleotide für South-Western-Blot		
UD1082_SWB-Biotin	ATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCTTTTT	5' Biotin
Oligonukleotide für DNazym-Spaltung der 16S rRNA		
A1117	GCAACAAAGGAGGCTAGCTACAACGAAAGGGTTGCG	
G1006	ATCTCTGAAAAGGCTAGCTACAACGATTCCGTGGAT	
Oligonukleotide für <i>Molecular Beacon</i>		
MB_ECOLI_9	GTCAATGAGCAAAGGTATTAACCTTACTCCTCATTGAC	5' Thiol, 3' Biotin
MB_ECOLI_6	AATGAGCAAAGGTATTAACCTTACTCCTCATT	5' Thiol, 3'

MB_ECOLI_3	GAGCAAAGGTATTAACCTTACTCCTC	Biotin 5' Thiol, 3' Biotin
MB_Target	GAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGAC	
MB_1MM	GAGTAAACTTAATACCTTTGCTCATTGAC	
MB_2MM	GAGTAATCTTAATACCTTTGCTCATTGAC	
MB_3MM	GAGTATTCTTAATACCTTTGCTCATTGAC	
MB_NM	CCTTCGATCGGCAAAGTACGATGTCGATA	
Helfer_MB_1	GGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGGGTAA	
Helfer_MB_2	CCTTCCTCCCCGCTGAAAGTACTTTACAACCC	
Oligonukleotide für PCR-Amplifikation und Detektion		
uidA_for	GTGATCACTAATACGACTCACTATAGGACGGCCTGTGGGCATTCACT	
uidA_rev	CAATTGCCCGGCTTCTTGTAAAC	
uidA_rev_P	CAATTGCCCGGCTTCTTGTAAAC	5' Phosphat
uidA-Fänger	GATCAATTCACAGTTTTTCGCGATTTTTTTTT	3' Thiol
uidA-Detektor	TTTTTTGCTTCTTGTAAACGCGCTTCCACCAACGCT	5' Amino
Oligonukleotide für Zwei-Komponenten-Hybridisierung (Dendrimertechnologie)		
A31	TTTTTCAATACCTGTATTCCTCGCCTGTC	5' Amino
PM	TTTTTGACAGGCGAGGAATACAGGTATTG	5' Thiol
1MM	TTTTTGACAGGCGAGGTATACAGGTATTG	5' Thiol
2MM	TTTTTGACAGGCGAGCTATACAGGTATTG	5' Thiol
3MM	TTTTTGACAGGCGAGCTTACAGGTATTG	5' Thiol
Oligonukleotide für Rolling Circle Amplifikation		
UD1082-RCA	GACAGGCGAGGAATACAGGTATTGTTTTTGGTTGCGCTCGTTCGGGGACT TAACCAACAT	
Primer-RCA	CAATACCTGTATTCTCGCCTGTCTTTTTTCACAGCTGAGGATAGGACAT	
Templat für zirkuläre DNA	CTCAGCTGTGTAACAACATGAAGATTGTAGGTCAGAACTCACCTGTTAGAA ACTGTGAAGATCCCTTATTATGTCCTATC	5' Phosphat
RCA1	TTTTTAACAACATGAAGATTGTA	5' Amino
RCA2	TTTTTTCAGAACTCACCTGTTAG	5' Amino
RCA3	TTTTTACTGTGAAGATCGCTTAT	5' Amino
Oligonukleotide für Herstellung der komplementären miRNA-Sonden		
miR10a_1	GGTGGTAATACGACTCACTATAGGCAGAGCTTCCCTT	
miR10a_2	TGTGTTTGTCCCGAAGGGAAAGCTCTGC	
miR10a_3	CGGGGACAAACACAAATTCCGATCTACAGGG	
miR10a_4	CTTAACCAACATTACCCTGTAGATCCGAAT	
miR10a_5	TAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC	
miR10a_6	GGTTGCGCTCGTTGCGGGA	
miR16_1	GGTGGTAATACGACTCACTATAGGTGAGAATGTGCCTT	
miR16_2	TGGCGACGGTTCCCGAAGGCACATTCTCAC	
miR16_3	CGGGAACCGTCGCAATATTTACGTGCTGC	
miR16_4	CTTAACCAACATTAGCAGCACGTAATAT	
miR16_5	TAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC	
miR16_6	GGTTGCGCTCGTTGCGGGA	
miR21_1	GGTGGTAATACGACTCACTATAGGTAGGACGTCCTT	
miR21_2	GTTGATCTGCCCCGAAGGGGACGTCCTAC	
miR21_3	CGGGGGCAGATCAACATCAGTCTGATAAGC	
miR21_4	CTTAACCAACATTAGCTTATCAGACTGAT	

miR21_5	TAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGC	
miR21_6	GGTTGCGCTCGTTGCGGGA	
Fängeroligonukleotide für miRNA-Detektion		
miR-10a	TTTGTCCTCCGAAGGGAAAGCTCTGTTTTTTTTT	3' Thiol
miR-16	ACGGTTCCCGAAGGCACATTCTCATTTTTTTTT	3' Thiol
miR-21	TCTGCCCCGAAGGGGACGTCTATTTTTTTTTT	3' Thiol
Detektoroligonukleotid für miRNA- und mRNA-Detektion		
miR	TTTTTGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACAT	5' Amino
Synthetische RNAs		
miR-15	UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG	
miR-16	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	
miR-21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	
miR-16_5'terminal	UAUCAGCACGUAAAUAUUGGCG	
miR-16_3'terminal	UAGCAGCACGUAAAUAUUGCCG	
miR-16_zentral	UAGCAGCACGAAAUAUUGGCG	
miR-16_5'Überhang	UGCCUUAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	
miR-16_3'Überhang	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCGUUAAG	
Oligonukleotide für Herstellung der komplementären mRNA-Sonden		
GroEL_1	GGTTGGTAATACGACTCACTATAGGTGAGAATGTGCCTT	
GroEL_2	CATGGACGTTCCCGAAGGCACATTCTCAC	
GroEL_3	CGGGAACCGTCCATGCCGCCATACCGCCA	
GroEL_4	CTTAACCAACATCTGCTGGCGGTATGGGC	
GroEL_5	AGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGC	
GroEL_6	GGTTGCGCTCGTTGCGGGA	
tufA_1	GGTTGGTAATACGACTCACTATAGGTAGGACGTCCCCTT	
tufA_2	GGGCGCTGCCCCGAAGGGGACGTCTAC	
tufA_3	CGGGGGCAGACGCCCGCCCAACGGTACGG	
tufA_4	CTTAACCAACATGGCCGTACCGTTGGCGC	
tufA_5	CCATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGC	
tufA_6	GGTTGCGCTCGTTGCGGGA	
Securin_1	GGTTGGTAATACGACTCACTATAGGTGAGAATGTGCCTT	
Securin_2	GATGGGCACGTTCCCGAAGGCACATTCTCAC	
Securin_3	CGGGAACCGTGCCCATCCTTAGCAACCACACG	
Securin_4	CTTAACCAACATGGCACCCGTGTGGTTGCTA	
Securin_5	TGCCATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGC	
Securin_6	GGTTGCGCTCGTTGCGGGA	
Separase_1	GGTTGGTAATACGACTCACTATAGGTAGGACGTCCCCTT	
Separase_2	CAGCAGCTCTGCCCCGAAGGGGACGTCTAC	
Separase_3	CGGGGGCAGAGCTGCTGGTTGCAAGCCCTCAG	
Separase_4	CTTAACCAACATGCCATCCTGAGGGCTTGCA	
Separase_5	TGGCATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGC	
Separase_6	GGTTGCGCTCGTTGCGGGA	
Fängeroligonukleotide für mRNA-Detektion		
GROEL	ACGGTTCCCGAAGGCACATTCTCATTTTTTTTT	3' Thiol
TUFA	TCTGCCCCGAAGGGGACGTCTATTTTTTTTTT	3' Thiol
NM	TTTGTCCTCCGAAGGGAAAGCTCTGTTTTTTTTT	3' Thiol
SECURIN	ACGGTTCCCGAAGGCACATTCTCATTTTTTTTT	3' Thiol

SEPARASE	TCTGCCCCGAAGGGGACGTCCTATTTTTTTT	3' Thiol
Oligonukleotide für Northern Blot-Sonden		
groEL_for	AGCGCTGGCAACTCTGGTTG	
groEL_T7_rev	TAATACGACTCACTATAGGGTCGGTAACCATGCATTTCGGTG	
tufA_for	TGAGCACATCCTGCTGGGTC	
tufA_T7_rev	TAATACGACTCACTATAGGACGGTACGGCCGCCTTCACG	

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Mathias Sprinzl danke ich für die Möglichkeit, diese Dissertation in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen und für seine ständige Diskussionsbereitschaft. Durch sein Vertrauen war es mir möglich, selbständig und eigenverantwortlich zu arbeiten. Weiterhin möchte ich mich bei ihm für die Möglichkeit zur Teilnahme in diversen Konferenzen bedanken.

Ganz herzlich danke ich auch Herrn Prof. Dr. Olaf Stemmann für die Bereitstellung der HCT116-Zelllinien und für seine Bereitschaft das Zweitgutachten zu erstellen.

Desweiteren danke ich Herrn Dr. Yiran Wang für die Einführung in die Chip-Technologie und die vielen wissenschaftlichen Ratschläge.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Martin Humenik für seine kompetenten Ratschläge und die damit einhergehende unermüdliche Hilfsbereitschaft. Danke, dass du jederzeit bereit warst, mir bei Problemen aller Art zu helfen.

Auch Herrn Dr. Yiwei Huang möchte ich ganz herzlich für seine Hilfe bei molekularbiologischen Fragen danken. Die stundenlangen fachlichen und privaten Diskussionen waren eine Bereicherung.

Ein großes Dankeschön für alles auch der langzeitigen guten Seele im Labor, Antje Doppel. Du warst nicht nur eine fachliche Bereicherung, sondern hast mit deiner ständigen guten Laune den Laboralltag merklich bereichert. Vielen Dank für deine Bereitschaft immer zu helfen, wenn die Zeit mal knapp war.

Zusätzlich möchte ich mich bei Frau Dr. Irina Dieser bedanken, die mir am Ende meiner Arbeit eine Hilfe war.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Norbert Grillenbeck bedanken, der mir jederzeit hilfreich zur Seite stand und eine große Unterstützung bei der Fermentation und der Proteinaufreinigung war.

Danke an alle Mitarbeiter des Laboratoriums für Biochemie für ihre fachliche Hilfe und eine kurzweilige Zeit: Miriam Koch, Nadine Heydenreich, Anja Staufenbiel, Andrea Groß, Eva-Maria Gareis, Dr. Stefan Vörtler, Li Sheng, Iwan Grin und Christian Deiml. Auch die verschiedenen außeruniversitären Aktivitäten (Kosicé, Oskar, Dubliner, Badminton usw.) waren eine echte Bereicherung.

Ebenfalls möchte ich mich bei unserem Kooperationspartner Siemens Corporate Technology PS-6 (Erlangen) für die Unterstützung und Bereitstellung von Messgeräten bedanken. Besonderer Dank gilt hierbei Dr. Walter Gumbrecht, Dr. Manfred Stanzel, Dr. Heike Barlag und Peter Paulićka.

Ein großes Dankeschön auch für die Geduld und Unterstützung an das Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie des Max Rubner-Instituts in Kulmbach. Besonders

danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. Manfred Gareis, Frau Dr. Christina Scherbel, Herrn Dr. Bernd Heidenreich und Frau Liane Weber.

Ebenfalls möchte ich mich bei Frau Miroslava Zoldakova vom Lehrstuhl für Organische Chemie (Prof. Schobert) für die Bereitstellung der MCF-7-Zellen bedanken.

Bei Frau Gabi Kassler möchte ich mich für die Hilfe bei allen verwaltungstechnischen und sonstigen Schwierigkeiten bedanken.

Der größte Dank gilt meiner Mutter Ingrid, meinem verstorbenen Vater Hans und meinem Bruder Alexander mit Familie, ohne deren Liebe, Verständnis und Unterstützung mein bisheriger Weg und natürlich diese Arbeit nicht möglich gewesen wären.

Unendlicher Dank an meine Lebensgefährtin Antje, für alles, was du für mich getan hast. Es war großartig, wie du mich vor allem in der Endphase der Dissertation unterstützt hast und mir neue Kraft gegeben hast. Danke, dass du immer für mich da bist und an mich glaubst.

Für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit danke ich dem Forschungskreis der Ernährungsindustrie (FEI e.V., Projekt AiF 230 ZN) und der Siemens AG.

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

a) Wissenschaftliche Artikel

Pöhlmann C, Wang Y, & Sprinzl M (2007) Detection of nucleic acid: Electronic DNA chips [Nukleinsäuredetektion: Elektronische DNA-chips]. *BIOspektrum*, **13**, 159 – 161.

Humenik M, **Pöhlmann C**, Wang Y, & Sprinzl M (2008) Enhancement of Electrochemical Signal on Gold Electrodes by Polyvalent Esterase-Dendrimer Clusters. *Bioconjugate Chemistry*, **19**, 2456 - 2461.

Waibler Z, Anzaghe M, Frenz T, Schwantes A, **Pöhlmann C**, Ludwig H, Palomo-Otero M, Alcamí A, Sutter G, & Kalinke U (2009) Vaccinia virus-mediated inhibition of type I interferon responses is a multi-factorial process involving the soluble type I interferon receptor B18 and intracellular components. *Journal of Virology*, **83**, 1563 - 1571.

Pöhlmann C, Wang Y, Humenik M, Heidenreich B, Gareis M, & Sprinzl M (2008) Rapid, specific and sensitive electrochemical detection of foodborne bacteria. *Biosensors & Bioelectronics*, **24**, 2766 - 2771.

Pöhlmann C, Humenik M, & Sprinzl M (2009) Detection of bacterial 16S rRNA using multivalent dendrimer-reporter enzyme conjugates. *Biosensors & Bioelectronics* **24**: 3383 - 3386.

Heidenreich B, **Pöhlmann C**, Sprinzl M, & Gareis M (2009) Schnelldetektion von unerwünschten Keimen in der Lebensmittelproduktion mittels Biochip. *Mitteilungsblatt der Fleischforschung Kulmbach*, **48**, 77 - 84.

Pöhlmann C, Humenik M, & Sprinzl M (2009) Electrochemical nucleic acid biosensor for rapid identification of bacteria. *Proceedings of 3rd European Conference on Chemistry for Life Sciences*, submitted.

Heidenreich B, **Pöhlmann C**, Sprinzl M, & Gareis M (2009) Detection of *Escherichia coli* in meat with an electrochemical biochip. *Manuscript in preparation*.

Pöhlmann C, & Sprinzl M (2009) Electrochemical detection of microRNAs via gap hybridization assay. *Manuscript in preparation*.

b) Beiträge auf wissenschaftlichen Konferenzen

- Vorträge:

Heidenreich B, **Pöhlmann C**, Sprinzl M, & Gareis M (2009) Rapid detection of microorganisms during food production via electrochemical biochip. 44. Kulmbacher Woche, Kulmbach.

Pöhlmann C (2009) Application of electrochemical biochips for bacterial and cancer diagnostics. BZMB Seminar, Bayreuth, 28.07.2009.

Pöhlmann C, Humenik M, & Sprinzl M (2009) Use of an electrochemical nucleic acid biosensor for rapid identification of bacteria. 3rd European Conference on Chemistry for Life Sciences, Frankfurt am Main.

- Posterpräsentationen:

Pöhlmann C, Wang Y, & Sprinzl M (2007) Application of esterase as a reporter enzyme on an electronic biochip. 5. Structure and Stability of Biomacromolecules Conference in Kosice (Slowakei).

Pöhlmann C, Wang Y, Humenik M, Scherbel C, Gareis M, & Sprinzl M (2008) Application of esterase as a reporter enzyme on an electronic biochip. 10. Statusseminar Chiptechnologien in Frankfurt.

Heidenreich B, Böhnlein C, **Pöhlmann C**, Wang Y, Humenik M, Sprinzl M, & Gareis M (2008) Detection of E. coli during food production using 16S ribosomal RNA-based biochips. 10. Fachsymposium Lebensmittelmikrobiologie in Stuttgart.

Pöhlmann C, Humenik M, & Sprinzl M (2009) Novel approach of bacteria detection using multivalently labelled dendrimer-enzyme-oligonucleotide conjugates. 6. Deutsches BioSensor Symposium in Freiburg.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, dass ich anderweitig mit oder ohne Erfolg nicht versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.

Bayreuth, den 10.11.2009

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'CP' followed by a long, horizontal, slightly wavy line.

Christopher Pöhlmann