

Aktivitätsmessung auf nukleinsäuremodifizierten Oberflächen

Der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Potsdam
eingereichte

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.) in der Wissenschaftsdisziplin Biochemie vorgelegt

von Dipl.-Biotechnologe Peter Michael Schmidt,
geboren am 25. Februar 1967 in Landstuhl

Potsdam, im März 2003

Danksagung

Mein großer Dank geht an Herrn PD Dr. F.F. Bier und Herrn Prof. Dr. Scheller für die interessante Aufgabenstellung und ihre persönliche und fachliche Energie und die finanzielle Unterstützung, die der wichtige Grundstein für diese Arbeit war. Weiterhin möchte ich Frau Dr. Eva Ehrentreich-Förster und Herrn Dr. Frank Kleinjung danken, die mit mir gemeinsam Berlin-Buch, Luckenwalde und Potsdam-Rehbrücke durchgestanden haben und mir engagiert sowohl mit fachlichem Rat und viel Verständnis sowie mit großer Hilfsbereitschaft immer zur Seite gestanden haben.

Ich danke allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Scheller für die wertvolle Zusammenarbeit und das stets gute Arbeitsklima in Berlin-Buch und Luckenwalde. Ebenso möchte ich der Abteilung Molekulare Bioanalytik des Instituts für biomedizinische Technik der Fraunhofer-Gesellschaft (Fhg-IBMT) danken, die mir großes Verständnis und viel Hilfsbereitschaft entgegengebracht haben; insbesondere Christian, Dennie, Rothin, Ralph, Alexander und Nenad für das Gewinnen des Dife-Volleyball-Pokals sowie Andrea, Michaela und Dag für erfolgreiche Messungen am Scanner. Mein weiterer Dank geht auch an meine lieben Kollegen Kathi, Edda, Markus, Jörg, Jenny, Mandy, Xenia, Alexandra, Susanne, Kati, Dirk, Bettina, die ebenfalls für ein sehr schönes Arbeitsklima sorgen. Daneben möchte ich auch Marc und Oliver, unseren „kleinen Elephanten“, danken für ihre Unterstützung und moralischen Beistand.

Mein Dank richtet sich auch an meine Familie und meine Freunde, von denen hier speziell meine „Mitbewohnerin“ Ulrike Treichel erwähnt sei, die durch ihre Geduld und Gelassenheit mir die Arbeit um ein Wesentliches erleichterten. Ebenfalls danke ich meiner Freundin Kati Vehlow für ihre emotionale Betreuung.

Erklärung

Hiermit bestätige ich, Peter Michael Schmidt, geboren am 25.02.1967, dass diese Arbeit bisher an keiner anderen Hochschule eingereicht worden ist und von mir selbständig und ausschließlich mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt wurde.

Peter Michael Schmidt, Potsdam, 06. März 2003

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Ziel der Arbeit	1
1.2 Analytik der Enzym-DNA-Wechselwirkung	2
1.3 Früherkennung von Tumoren	7
2. Material und Methoden	13
2.1 Optische Methoden	13
2.1.1 Gitterkoppler	13
2.1.2 BIACore 2000	15
2.1.3 Faseroptik	17
2.2 Chemische Methoden zur Präparierung von Oberflächen	19
2.2.1 Silanisierung	19
2.2.2 Adsorptive Bindung	21
2.2.3 Kovalente Bindung von Nucleinsäuren	21
2.3 Bestimmung der Kinetik des Restriktionsendonuklease <i>EcoRI</i> im Mikroarray	23
2.3.1 Chemikalien und Lösungen	23
2.3.2 Oligonukleotide und Enzym	23
2.3.3 Mikrodosiertechniken	26
2.3.3.1 Plotten mit Mikropipettiersystem (Piezo-Ink-Jet-Technik)	26
2.3.3.2 Plotten mit Probot (Kapillar-Stempel-Technik)	26
2.3.4 Auftragen der Proben	27
2.3.5 Prinzip der Messungen am Biochip-Scanner	29
2.4 Messung der Aktivität des Klenow ⁻ -Fragmentes auf der Oberfläche	33
2.4.1 Puffer	33
2.4.1.1 Gitterkoppler	33
2.4.1.2 BIACore 2000	33
2.4.2 Oligonukleotide und Nucleotide	33
2.4.3 Enzym	34
2.4.4 Aktivitätsmessung in Lösung	37
2.4.5 Modifizierung der Sensoroberfläche	39
2.4.5.1 Gitterkoppler	39
2.4.5.2 BIACore 2000	39
2.4.6 Aktivitätsmessung auf der Oberfläche	40
2.4.6.1 Gitterkoppler	40
2.4.6.2 BIACore 2000	41

2.5	Aktivitätsmessung des Enzyms Telomerase	43
2.5.1	Puffer	43
2.5.2	Oligonukleotide und Nukleotide	43
2.5.3	Enzym Telomerase	46
2.5.4	Herstellung des Zellextraktes der HL60 Zellen	48
2.5.5	TRAP Assay	49
2.5.6	Messung der Telomeraseaktivität auf der Oberfläche	49
2.5.7	Induzierung der NIH 3T3-Zellen durch das Kanzerogen N-Nitroso-N-Methylharnstoff	50
3.	Ergebnisse	53
3.1	Aktivitätsmessung von Restriktionsendonukleasen im Microarray am Beispiel von <i>EcoRI</i>	53
3.1.1.	Qualitative Auswertung	53
3.1.2.	Quantitative Analyse	60
3.2	Zusammenfassung	63
3.3	Diskussion	64
3.4	Aktivitätsmessung von Klenow ⁻ -Fragment auf optischen Oberflächen	67
3.4.1	Aktivitätsmessung am Gitterkoppler	67
3.4.2	Aktivitätsmessung am BIAcore 2000	70
3.4.2.1.	Modifizierung der Chipoberfläche	70
3.4.2.2.	Auswertung der Aktivitätsmessung	73
3.5	Zusammenfassung	76
3.6	Telomerase	77
3.6.1	Aktivitätsmessung der Telomerase in Lösung	77
3.6.2	Labelfreie Messungen	79
3.6.3	Fluoreszenz-Messungen mit faseroptischen Sensoren	84
3.6.4	Messen der Telomeraseaktivität in NIH 3T3-Zellen	90
3.7	Zusammenfassung	93
3.8	Diskussion	94
4.	Ausblick	98
5.	Literatur	100

Abbildungsverzeichnis

1.1	Mehrstufige Entstehung einer Krebserkrankung	7
1.2	Reaktionsort der Telomerase	10
2.1	Messprinzip des Gitterkopplers	13
2.2	Aufbau der SPR-Apparatur des BIACore 2000	15
2.3	Aufbau der Messapparatur für Fluoreszenzmessungen an der optischen Faser	17
2.4	AFM-Aufnahme einer Glasoberfläche	20
2.5	Reaktionsschema der Silanisierung der Glasoberflächen	20
2.6	Reaktionsverlauf einer chemischen Kopplung von Nukleinsäuren	22
2.7	Bindungs- und Schneidvorgang von <i>EcoRI</i> in Lösung	24
2.8	Darstellung der beiden Mikrodosiersysteme	27
2.9	Schematische Darstellung des Messprinzips des Biochip-Scanners	29
2.10	Aufbau des Biochip-Scanners	29
2.11	Darstellung der Fragmente der DNA-Polymerase I	35
2.12	Darstellung der 3'-5'-Exonuklease-Aktivität	35
2.13	Darstellung der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität	36
2.14	Bestimmung des K_M -Wertes des Klenow ⁻ -Fragmentes	39
2.15	Darstellung der chemischen Struktur von DNA, phosphothioat- modifizierten DNA und PNA	44
2.16	Reaktionsmechanismus der Telomerase	47
2.17	Struktur des Kanzerogens N-Nitroso-N-Methylharnstoff	51
3.1	Messung der <i>EcoRI</i> -Kinetik auf der Chipoberfläche	53
3.2a	Messkurven der <i>EcoRI</i> -Kinetik im Microarray	55
3.2b	Messkurven der <i>EcoRI</i> -Kinetik im Microarray	55
3.2c	Messkurven der <i>EcoRI</i> -Kinetik im Microarray	56
3.3	<i>EcoRI</i> -Kinetik Messkurven im Vergleich	57
3.4	Bilddarstellung eines 6x11-Arrays	58
3.5	Vergleich der enzymatischen Kinetiken von <i>EcoRI</i>	59
3.6	Messkurven der Reaktion von <i>EcoRI</i> nach Zugabe von Mg^{2+}	60
3.7	Kinetische Messung der <i>EcoRI</i> -Reaktion	61

3.8	Schema der Aktivitätsmessung des Klenow ⁻ -Fragmentes auf der Oberfläche	68
3.9	Messung der Aktivität des Klenow ⁻ -Fragmentes	69
3.10	Chemische Modifizierung der Oberfläche im BIACore 2000 durch Streptavidin	70
3.11a	Bindung des biotinylierten Primer auf der Oberfläche	71
3.11b	Hybridisierung des Template-Stranges an den immobilisierten Primer	71
3.12	Messung der enzymatischen Strangsynthese	73
3.13	Aktivitätsmessung des Klenow ⁻ -Fragmentes	74
3.14	Darstellung des Agarosegels und der TRAP-Produkte	77
3.15	Intensitätsverteilung der TRAP-Produkte im Gel	78
3.16	Aufbau der Oberfläche für labelfreie Messungen	79
3.17	Aktivitätsmessung der Telomerase am Gitterkoppler mit phosphothioat-modifiziertem Primer	80
3.18	Aktivitätsmessung der Telomerase am Gitterkoppler mit unmodifiziertem Primer	81
3.19	Vergleich der Aktivitätsmessung der Telomerase mit Kontrollmessungen auf der Oberfläche	82
3.20	Vergleich der Telomeraseaktivität im Gel bei unterschiedlichen Reaktionstemperaturen (A) und Intensitätsverteilung (B)	83
3.21	Schematische Darstellung des Einbaus von gelabelten Nukleotiden	85
3.22	Messung der Telomeraseaktivität auf der faseroptischen Oberfläche	86
3.23	Schema des Nachweises der Telomeraseaktivität durch markierte Sonde	87
3.24	Messung der Telomeraseaktivität mit FITC-dUTP	88
3.25	Messung der Telomeraseaktivität mit markierter DNA-Sonde	89
3.26	Messung der Telomeraseaktivität in NIH 3T3-Zellen vor und nach der Induktion durch ein Kanzerogen	91

1. Einleitung

1.1 Ziel der Arbeit

Es ist heute aus pharmazeutischen und medizinischen Gründen von großem Interesse, Muster aktiver Proteine in der Zelle oder in Organellen bzw. Mikroorganismen zu charakterisieren. Dabei ist es u.a. das Ziel pharmazeutischer Unternehmen, krankheitsrelevante Proteine zu identifizieren, die als Angriffspunkte neuer Medikamente in Frage kommen. Die zunehmende Bedeutung dieser Diagnostik spiegelt sich auch in verschiedenen Marktanalysen wider, die bis ins Jahr 2005 ein Volumen von 5,8 Milliarden US-Dollar prognostizieren.

Bei der Beantwortung dieser neuen diagnostischen Anforderung stoßen herkömmliche Techniken an ihre Leistungsgrenzen. Daher sind alternative Methoden, die Wechselwirkungen und Aktivitäten von Proteinen in einer kürzeren Zeit genauer nachweisen, von großem Interesse.

Die Entwicklung optischer Messsysteme für eine gezielte Analyse von ausgewählten Proteinen bietet einen vielversprechenden Ansatz, da diese Systeme auch für ein breites Feld molekularer Reaktionen geeignet sind.

Unter diesen Gesichtspunkten wurden in der vorliegenden Arbeit Methoden entwickelt, die es ermöglichen, auf Oberflächen optischer Sensoren, Bindungsstudien und Aktivitätsmessungen nukleinsäuremodifizierender Enzyme mit geringem apparativen und zeitlichen Aufwand durchzuführen.

Optische Sensoren wie z.B. Evaneszenzfeldgeräte bewiesen in früheren Arbeiten (Kleinjung et al., 1997), (Bier et al., 2002) ihre Effizienz bei der Analyse von Hybridisierungskinetiken von Nukleinsäuren und bilden die Grundlage für die Messungen der Kinetiken von Enzymen wie Restriktionsendonukleasen und Polymerasen. Die Entwicklung der Messanalytik für das Erfassen der Kinetik umfasst auch die Modifizierung der Sensoroberfläche, um Reaktionsbedingungen für den Ablauf der enzymatischen Reaktion auf der Sensoroberfläche zu ermöglichen. Die Spezifität des Sensors wird erreicht durch die Auswahl der Sequenz und die chemische Struktur der Nukleinsäuren. Gleichzeitig muss das Reaktionssystem auf der Oberfläche so gewählt werden, dass unspezifische Wechselwirkungen minimiert oder ausgeschlossen werden können. Dies wurde bisher schon auf den Oberflächen elektrochemischer Biosensoren untersucht (Scheller et al., 2001). Ein Vorteil der Messungen auf der Oberfläche gegenüber denen in der Lösung liegt darin, dass die

Reaktionsführung so gewählt werden kann, dass die Reaktionskinetik des Enzyms getrennt von der Bindungskinetik gestartet wird.

Die Arbeit selbst ist in zwei Abschnitte gegliedert:

1. Entwicklung neuartiger Protein-DNA-Methodik;
2. Anwendung dieser neu-entwickelten Methodik im Bereich der Tumordiagnostik

Der erste Abschnitt unterteilt sich dabei in 2 Bereiche aufgrund der beiden untersuchten Protein-Typen, einer Restriktionsendonuklease und einer Polymerase. Zu Beginn wird die spezifische Identifizierung von Nukleinsäuren im Microarray durch Protein-DNA-Wechselwirkung am Beispiel einer Restriktionsendonuklease dargestellt. Die Proteine werden zur Funktionsmessung durch immobilisierte DNA-Moleküle auf den Trägermaterialien fixiert.

Daneben wurde die Aktivität von Polymerasen, d.h. DNA-synthetisierenden Enzymen, an immobilisierten Substraten auf Oberflächen bestimmt. Die Verwendung eines bereits gut charakterisierten Enzyms, dem Klenow-Fragment, ermöglicht den systematischen Aufbau eines Messsystems.

Im zweiten Abschnitt werden diese entwickelten Messsysteme angewandt, um die Aktivität des Enzyms Telomerase im Zellextrakt zu detektieren, ohne Amplifizierung der Signale wie in konventionellen Verfahren (z.B. TRAP-Assay) durchzuführen.

Abschließend wird das Verhalten der Telomeraseaktivität in normalen Zellen, durch ein Kanzerogen induziert, analysiert.

1.2 Analytik der Enzym-DNA Wechselwirkung

In den letzten Jahren wurden Hochdurchsatz-Screening-Methoden entwickelt (Wang, 2000), (Christensen, 2002), (Pirrung, 2002) und optimiert, um neuen Anforderungen in der Genomik und Proteomik gerecht zu werden. Diese Ansätze ermöglichen die Durchsicht von Hunderten von Bibliotheken nach bestimmten Sequenzen oder spezifischen Proteinen. Dabei wurde bei der Identifizierung des menschlichen Genoms die Bedeutung solcher Screening-Systeme deutlich (Venter et al., 2001). In der Proteomik werden die Anforderungen an solche Testsysteme noch wachsen, da durch posttranslationale Modifizierungen die Anzahl der Proteine die Anzahl der

Gensequenzen um ein Vielfaches übertrifft und auch die Funktion des Proteins von großem Interesse ist. Die Fähigkeit, Millionen von Proteinvarianten zu erzeugen und ihre Aktivitäten zu vergleichen, ermöglicht es nicht nur, Proteine mit neuen Eigenschaften zu entwerfen, sondern auch die Struktur und Funktion von Proteinen zu verstehen. Da es aufgrund der Komplexität der Proteine sehr schwierig ist, neue Funktionen durch gerichtete Mutationen ins aktive Zentrum eines Proteins einzuführen, versucht man eher zahlreiche Mutanten gleichzeitig zu erzeugen und auf die gewünschte Aktivität zu testen (Lin, 2002). DNA-Markierungen, die direkt an die jeweiligen Proteine gebunden sind, erlauben die spezifische Identifizierung des Proteins und dienen gleichzeitig als Code für die Proteinsequenz.

Neben der Markierung von Proteinbibliotheken werden auch vollkommen neue Ansätze getestet, die DNA-Markierung überflüssig machen, wie z.B. Massenspektrometrie (MS). Die technische Fortschritte in der Ionisationstechnik (ESI, Elektronenspray-Ionisation) und MALDI (matrixunterstützte Laserdesorption und -ionisation), (Andersen et al., 2000), (Chalmers et al., 2000) spielen eine große Rolle. Bei diesen Analysemethoden wird das Protein zunächst tryptisch verdaut. Dieser Verdau wird dann in kleine Peptide fragmentiert, deren Massen oder Sequenzen durch MS zugänglich sind und zur Bestimmung der Proteinsequenz herangezogen werden (Henzel et al., 1993). Somit kann die Identität der durch 2-D-Gelelektrophorese getrennten Proteine bestimmt werden (Shevchenko et al., 1996).

Die meisten Fortschritte wurden in den letzten beiden Jahrzehnten in der Entwicklung von Methoden erzielt, die Proteine mit ihrer spezifischen DNA direkt koppeln (Cornish et al., 2002). Die enzymatische Umsetzung stellt eine höhere Hürde dar, wobei die Grundlage für eine effiziente Analyse der Enzymaktivitätsmessung in der Bindung zwischen DNA und Protein liegt. Bezüglich der Interaktion von DNA und Protein sind verschiedene Techniken etabliert worden, die in direkte Verbindung, Kompartimentierung oder räumliche Trennung unterschieden werden.

All diese Techniken eignen sich besonders gut für Bindungstests, die in hohem Maße dazu beitragen, Proteine mit neuen Funktionen zu entwickeln und zu detektieren. Dabei muss bei den Techniken und Methoden die Stabilität der Verbindung und die Vereinbarkeit mit vielen strukturell verschiedenen Proteinen beachtet werden.

In Tabelle 1.1 sind unterschiedliche Techniken, basierend auf DNA-Protein-Wechselwirkung, zusammengefasst:

	Methode	Verbindung von DNA und Protein	Testsysteme (Selektion oder Screening)
1	Phagen-Display-Methode	Phagenpartikel	Bindung an Affinitätsmatrix
2	Ribosomen-Display-Methode	Ribosomenkomplex	Bindung an Affinitätsmatrix
3	mRNA-Peptid-Fusion	Peptid-mRNA-Fusion	Bindung an Affinitätsmatrix
4	Peptid am Plasmid	Peptid-Plasmid-Komplex	Bindung an Affinitätsmatrix
5	Zelloberflächen-Display-Technik	Zelle	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)
6	<i>in-vitro</i> -Kompartimentierung	Wasser-in-Öl-Tröpfchen	PCR
7	Genetische Testsysteme	Zelle	Komplementation, kolorimetrische Tests
8	Mikrotiterplatten	Räumliche Adressierung	Radiometrisch, UV/VIS-Absorption oder Fluoreszenz

Tabelle 1.1 Verknüpfung von DNA und Protein in verschiedenen Testsystemen

Die Methoden sind danach eingeteilt, ob sie auf einer direkten Verbindung, Kompartimentierung oder räumlichen Trennung beruhen. Methoden wie mRNA-Display und Peptide-am-Plasmid gehören zu der ersten Kategorie, während die übrigen Display-Techniken auf einer indirekten Verbindung zwischen DNA und Enzym basieren. Die *in-vitro*-Kompartimentierung gehört zu der zweiten, während Methode 7 und 8 der Tabelle 1.1 den Vorteil einer räumlichen Trennung aufweisen.

Phagen-Display-Techniken wurden angewandt, um die Bindungsspezifität von DNA-Bindeproteinen zu verändern (Choo et al., 1994), (Jamieson et al., 1994). Neuerdings wird auch angestrebt diese Technik an die enzymatische Katalyse anzupassen (Xia et al., 2002).

Die Ribosomen-Display- und mRNA-Peptid-Techniken basieren auf der Kopplung zwischen translatiertem Peptid und der dazugehörigen mRNA (Roberts et al., 1999). Ein Nachteil dieser Methode besteht darin, dass die Reaktionsschritte *in-vitro* durchgeführt werden. Dadurch wird es schwierig, Membranproteine, die posttranslational modifiziert werden, zu exprimieren. Ein Hauptanwendungsgebiet dieser Techniken liegt in dem Durchmustern von Peptidbibliotheken (Cwirla et al., 1997).

Das Zelloberflächen-Display umschreibt eine Methode, bei der Proteine auf der Oberfläche lebender Zellen präsentiert werden (Stahl et al., 1997). Dabei wird ein Protein an ein Membranprotein fusioniert und so auf der Zelloberfläche verankert. Die Detektion erfolgt dann durch fluoreszenzaktiviertes Zellsortieren (FACS).

Der Schwerpunkt der erwähnten Methoden liegt noch immer in der Charakterisierung der Bindung und im Screening zahlreicher Bindungsmutanten. Die Herausforderung liegt heutzutage darin, diese Methoden an die Entdeckung katalytischer Aktivität anzupassen. Es existieren bereits Ansätze wie FRET (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer), die diese Umsetzung anstreben (Perkins et al., 1996), (Pedersen et al., 1998). Die Schwierigkeit dieser Methoden besteht allerdings darin, in diesen ja/nein-Tests Enzyme mit einem großen Bereich katalytischer Effizienz auseinander zu halten.

Unter Kompartimentierungsmethoden versteht man Ansätze zur Kopplung von Proteinen und DNA, bei denen der Komplex in einem eigenen Kompartiment eingeschlossen wird. In zellulären Tests wird das erreicht, indem die DNA die Synthese des Proteins in der Zelle steuert. Dieses Testsystem ist sehr effizient, weil Millionen von Plasmid-DNA-Molekülen, von denen jedes ein unterschiedliches Protein oder eine Proteinvariante kodiert, in einem Ansatz in die Zelle transferiert werden können (Cornish et al., 2002).

Ebenso spielt das „Zwei-Hybrid-System“ eine wesentliche Rolle bei der Analyse von DNA-Enzym-Wechselwirkung (Vidal et al., 1999), (Uetz et al., 2000). Ursprünglich entwickelt, um potentielle Protein-Protein-Wechselwirkung *in-vivo* zu testen, wurde das System erweitert, um Protein-DNA- und Protein-RNA-Wechselwirkungen sowie die Interaktion von Proteinen und niedermolekularen Substanzen zu analysieren (Griffith et al., 2000). In letzter Zeit wurde zelluläre Kompartimentierung mit einem einfachen *in-vitro*-System, einer Wasser-Öl-Emulsion, nachgeahmt (Tawfik et al., 1998). In diesem Reaktionsraum wurden die individuellen, zellulären Vorgänge wie Transkription und Translation durchgeführt, wobei sich die Robustheit dieser *in-vitro*-Kompartimentierung noch erweisen muss.

Zelluläre und genetische Tests sind technisch gradlinig, da sie sich die Fortschritte der Molekularbiologie zu eigen machen. Das Hauptproblem dieser Tests liegt in dem Aussondern von falsch-positiv und falsch-negativen Ergebnissen.

Methoden für die Proteinanalytik, die auf der Basis räumlicher Zuordnung beruhen befassen sich mit Array-Techniken, wie z. B. Mikrotiterplatten-Tests und Proteinchips

(Christensen, 2002). Dabei wird die Identität eines Proteins bzw. Peptides mit einer eindeutigen räumlichen Position wie der Vertiefung einer Mikrotiterplatte oder Stelle auf einem Chip (Emili et al., 2000), (Grayhack et al., 2001), (Zhu et al., 2001) zurückverfolgt. Aufgrund der räumlichen Isolierung lassen sich nicht nur die Bindungsstudien sondern auch die enzymatische Katalyse gut durchführen (Thorn et al., 1995) und unterstützen maßgeblich beim Proteindesign (Giver et al., 1998).

In den letzten Jahren begann man analog zu den DNA-Chips auch Proteinchips zu entwickeln, die Proteinfunktionen und –sequenzen in Größenordnungen des Genoms untersuchen können. Hierbei werden verschiedene Trägermaterialien wie z.B. Nitrocellulosemembran (Ge et al., 2000), Glasträger (Rowe et al., 1999), (MacBeath et al., 2000) und Polyacrylamid-Gel (Arenkov et al., 2000) verwendet. Dazu müssen für die Anwendung auf Chips die Proteine intensiv aufgereinigt werden, was auch den limitierenden Schritt dieser Methode darstellt. Auf der anderen Seite werden für diese Technik geringere Mengen an Probenvolumen benötigt. Die bisherigen Entwürfe von Proteinchips sind eher geeignet für Bindungsanalysen (Schweitzer et al., 2000) als für enzymatische Aktivitätstests. Da die Bindung allein nicht zur Charakterisierung von Proteinen ausreicht, werden verstärkt Bemühungen unternommen, um diese neue Techniken den Anforderungen für Aktivitätstest anzupassen. Eine Möglichkeit wird untersucht, bei der Proteine in Nanovertiefungen immobilisiert vorliegen und somit eine räumliche Trennung der einzelnen Proteine erreicht werden soll (Zhu et al., 2000), (Ziauddin et al., 2001).

Die in dieser Arbeit angewendete Methode beschreibt, wie neben der Bindungsstudie auch die enzymatische Aktivität erfasst werden kann. Im Gegensatz zu den oben erwähnten Techniken können beide Schritte wie die Bindung und die Katalyse auf einer Oberfläche zeitlich getrennt voneinander beobachtet und analysiert werden.

In früheren Arbeiten wurde die Grundidee dargestellt (Bier et al., 1996). Dabei wurde das biologische System, bestehend aus der DNA und dem Enzym, auf der Oberfläche eines optischen Sensors gekoppelt. Hierbei bildet die spezifische, molekulare Erkennung der DNA und des Enzyms und die daraus resultierende hochaffine Bindung der beiden Komponenten die Grundlage für die Aktivitätsmessung.

Die im Anschluß an die Bindung verlaufende Aktivitätsmessung wird nicht nur qualitativ (ja/nein-Test) sondern auch quantitativ analysiert. Dieser Umstand eröffnet völlig neue Anwendungsmöglichkeiten, da somit die Aktivitätsunterschiede von

Wildtypen und Mutanten sichtbar gemacht werden. Ebenso wird auch der Einfluss regulatorischer, niedermolekularer Substanzen auf die enzymatische Reaktion untersucht.

Die Herausforderung besteht noch immer darin, geschickte Testsysteme für die interessierenden Aktivitäten zu entwickeln. Dies fördert das Verständnis über Struktur, Funktion, molekulare Wechselwirkung und Regulation der Proteine in der Zelle, das eine wichtige Grundlage für die Früherkennung und Umgang mit Krankheiten wie Alzheimer, Diabetes und Krebs darstellt (Scheller et al., 1997).

1.3. Früherkennung von Tumoren

Bei der Krebsentstehung geht man von einem mehrstufigen Prozess aus (Shields et al., 1990). Diese Umwandlung von normalen Genen in Onkogene, deren Produkte für das ungeordnete Zellwachstum verantwortlich sind, wird Induktion genannt. Diese Tumorzellen, die sich keiner Wachstumskontrolle mehr unterordnen, durchlaufen anschließend mehrere Stufen bis zur klinischen Manifestation des Tumors. Die Entstehung einer Krebserkrankung wird schematisch in Abbildung 1.1 dargestellt.



Abbildung 1.1 Mehrstufige Entstehung einer Krebserkrankung (nach Shields und Harris, Shields et al., 1990)

Auslöser für DNA-Veränderungen, die tumorartiges Wachstum induzieren, sind Kanzerogene. Diese umfassen chemische Substanzen, Strahlung und Viren, deren Wirkung dazu führt, dass durch die Entstehung und Transkription von Onkogenen gesunde Zellen entartet wachsen und sich in Tumorzellen wandeln. Daher ist es von großem Interesse, solche Substanzen und ihre Wirkung auf Zellen zu identifizieren und zu charakterisieren.

Ein Standardtest für solche Untersuchungen ist der AMES-Test benannt nach Bruce Ames (Ames et al., 1973). Dieser Test dient der Klassifizierung mutagener Substanzen und wird auch als Hinweis auf die Kanzerogenität (krebserregende Wirkung) einer Substanz gewertet. Dabei werden Bakterien, deren Histidin-Biosyntheseweg inaktiviert wurde, auf histidinfreiem Medium ausgestrichen. Entfaltet der zu testende Stoff eine mutagene Wirkung auf diese Bakterien, wird Wachstum von Zellen beobachtet, deren Histidin-Synthese aktiviert wurde. Die Auswirkung und Dosierung der Substanzen wird auf Bakterien getestet. Man geht aber davon aus, dass diese Substanzen beim Säuger ebenfalls kanzerogen wirken. Damit sollen wirkliche Krebsursachen leichter identifiziert und Informationen über die Höhe der menschlichen Expositionen und über die kanzerogene Potenz von Substanzen geliefert werden.

Ein wichtiges Ziel ist die Entwicklung von Testsystemen, die alle relevanten Mutationen in einem bestimmten Gen verlässlich aufspüren und die Entstehung von Tumoren frühzeitig erkennen. Ziel einer guten Diagnostik ist es, dass Tumore erfasst werden können, wenn sie noch klein sind oder gerade erst in den bösartigen Zustand übergehen.

Verfahren wie z.B. Positronen-Emissionstomographie (PET) und Computertomographie (CT) unterstützen histopathologische Untersuchungen zur Überprüfung klinischer Verdachtsdiagnostik. Daneben werden Produkte von Tumorzellen (z.B. tumorassoziierte Antigene) als Reaktion des Organismus auf das maligne Wachstum von gesundem Gewebe gebildet, die man als Tumormarker bezeichnet (Roche 1999).

Der Vergleich der Muster von gesundem und Tumorgewebe liefert wichtige Informationen über den Typ und das Stadium des Tumors. Zu den Tumormarkern gehören unterschiedliche Substanzen, von denen einige Beispiele in Tabelle 1.2 zusammengestellt sind.

Tumormarker(Abkürzung)	Bedeutung/Substanzgruppe	Tumore/Erläuterung
Onkofetale Antigene:		
CEA	Karzinoembryonales Antigen	Gastrointestinales Karzinom, Bronchial-, Mammakarzinom
AFP	α_1 -Fetoprotein	Leberzellkarzinom, Keimzellenkarzinom
CA Carbohydrate Antigene:		
CA 19-9		Pankreaskarzinom, Magenkarzinom, Hepatobiliäres Karzinom
Antigene:		
PSA	Prostata-spezifisches Antigen	Prostatakarzinom
Proteine:		
β_2 -M	β_2 -Mikroglobulin	Maligne Neoplasie des lymphatischen Systems
Hormone		
β HCG	Humanes Choriongonadotropin	Nicht seminomatöse Keimzellentumore, Seminome, Blasenmole
Enzyme:		
NSE	Neuron-spezifische Enolase	Kleinzelle, Bronchialkarzinom, Neuroblastom, Apudome
SP	Saure Phosphatase	Prostatakarzinom
AP	Alkalische Phosphatase	Ursprung Skelett, Leber, Gallenwege

Tabelle 1.2 Darstellung der Tumormarker und Untergliederung in verschiedene Substanzgruppen (Senn et al., 1998)

In der Tabelle 1.2 werden auch Enzyme als Tumormarker aufgeführt wie die Phosphatase, die z.B. in Osteoblasten angereichert vorliegen. Deren Aktivitätsmessung sowie die Detektion ihrer Reaktionsprodukte im Serum gilt als verlässlicher Nachweis von Tumoren (Senn et al., 1998).

In dieser Arbeit wurde die Aktivität des Enzyms Telomerase mit Hilfe optischer Analysesysteme bestimmt.

Darüberhinaus eignet sich die Veränderung der Aktivität der Telomerase für die Früherkennung von Tumoren, da die Zunahme der Aktivität der Telomerase bereits früh nach der Induktion der Zellen eintritt (Elenbaas et al., 2001).

Dies konnte bereits bei dem Vergleich der Telomeraseaktivität mit histologischen Markern bewiesen werden. Während bei den cytologischen Untersuchungen von unterschiedlichen Blasenkrebszellen 67% der Tumore identifiziert wurden, erkannte man über die Telomeraseaktivität 77% der Tumore frühzeitig (Granger et al., 2002).

Telomere und Telomerase sind wegen ihrer Bedeutung für die Krebsentstehung weiterhin Gegenstand intensiver Forschung, so z.B. wurden bereits die Rolle der Telomerbiologie bei der Krebsentstehung in unterschiedlichen Geweben untersucht (Counter et al., 1994), (Sommerfeld et al., 1996), (Mokbel, 2000).

Die Telomerase selbst gerät neben seiner Funktion als potentieller Tumormarker in das Blickfeld als möglicher Ansatz für Antitumor-Therapeutika (Autexier et al., 1999), denn Ziel einer Krebstherapie ist es, das unkontrollierte Wachstum eines Tumors zu stoppen. Die Tumorzellen sollen daran gehindert werden, sich weiter zu teilen, wobei Hemmung der Telomerase ein geeigneter Ansatz sein könnte (Raymond et al., 1999).

Gegenstand dieser Arbeit ist die Entwicklung eines optischen Meßsystems, um enzymatische Aktivität direkt oder nur mit geringem zeitlichen Aufwand zu analysieren. Der optische Sensor dient als Messplattform, um die Aktivität von Polymerasen am immobilisierten Substrat zu beobachten. Das Ziel ist es, die Aktivität des Enzyms Telomerase auf der Sensoroberfläche direkt im Zellextrakt zu messen. Dabei soll die Eigenschaft der Telomerase als Polymerase ausgenutzt werden, um das Signal zu generieren, ohne auf Amplifizierungsschritte wie die PCR zurückzugreifen. Damit soll eine konkurrenzfähige Methode entstehen, die individuelle Aktivitäten der Telomerase in unterschiedlichen Zellen erfasst. Darüberhinaus soll mit dieser Analytik die Induktion von Zellen detektiert und somit Substanzen auf ihre Kanzerogenität überprüft werden.

Der Nachweis der Telomeraseaktivität erfolgt im Gegensatz zum AMES-Test direkt am Menschen. Der TRAP-Assay (telomerase rapid amplification protocol), (Kim et al., 1994) der Firma Intergen (Intergen, USA) kombiniert die Messung der Aktivität der Telomerase mit einem PCR-Schritt, um eine niedrigere Nachweisgrenze zu erreichen. Dabei werden radioaktiv-markierte Substanzen verwendet, die nach

abgeschlossener Reaktion in zeitaufwendigen Schritten für die Auswertung aufgereinigt werden müssen.

Im Laufe dieser Arbeit soll ein optisches Verfahren zur Analyse enzymatischer Aktivität entwickelt werden, das sein Potential in der Detektion der Telomeraseaktivität zeigt. Dabei soll durch das System die Verwendung komplexer Marker und die damit verbundene aufwendige Aufreinigung der Proben für die Auswertung der Ergebnisse minimiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Optische Methoden

Die ersten beiden nachfolgenden beschriebenen Geräte gehören zu den optischen intrinsischen Transducern, deren Messgröße die Veränderung des effektiven Brechungsindex ist. Hierbei werden geräteabhängig oberflächengeführte Licht- bzw. Plasmonwellen erzeugt. Durch den Kontakt der biologischen Komponenten mit der Sensoroberfläche wird der effektive Brechungsindex der lichtleitenden Struktur verändert. Durch die zeitliche Änderung des Brechungsindex an der Oberfläche können die dazugehörigen Ursachen wie Assoziation oder Dissoziation unmarkierter biologischer Komponenten in Echtzeit verfolgt werden.

Als weiteres wurde ein faseroptischer Aufbau benutzt, der Assoziation und Dissoziation von fluoreszenzmarkierten Molekülen auf der Oberfläche detektiert. Diese Messmethode wird in zunehmendem Maße im Bereich der Bioanalytik und Prozesskontrolle eingesetzt (Scheper et al., 1999).

2.1.1 Gitterkoppler

Der schematische Aufbau des Gitterkopplers, sein Messprinzip und der Verlauf des evaneszenten Feldes in optisch unterschiedlichen Medien sind in Abbildung 2.1 dargestellt.

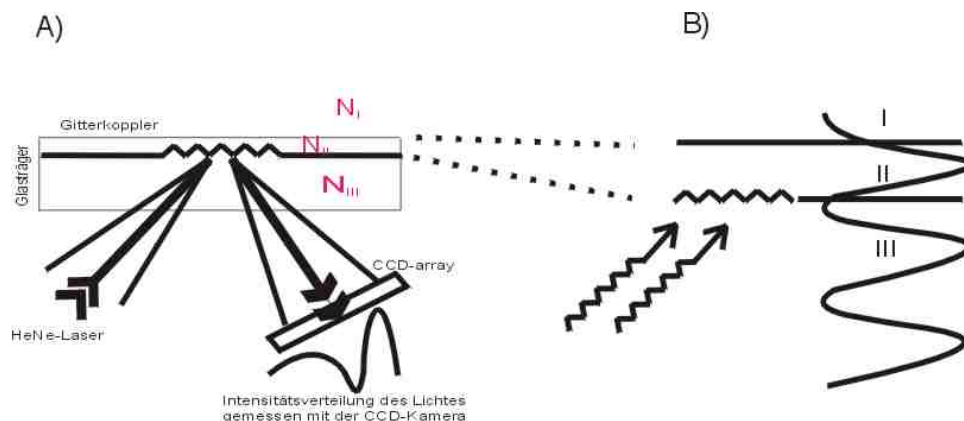


Abbildung 2.1 Messprinzip des Gitterkopplers:

- A) Einfall des Lichtstrahls und Querschnitt des Gitterkoppler-Chips.
- B) Skizze der Feldverteilung in den Bereiche mit unterschiedlichem Brechungsindex N ($N_{II} > N_I$, N_{III}). Dabei entspricht I der biologischen Messzone, II dem Wellenleiter und III dem Glasträger.

Hierbei wird ein planarer Wellenleiter von einem Laserstrahl unter verschiedenen Winkeln angestrahlt. Das Einkoppeln des Lichtes in den Lichtwellenleiter erfolgt durch Beugung an der Gitterstruktur. Der Einkoppelwinkel selbst ist exakt definiert.

Die Brechungsindices des Glasträgers und des Wellenleiters sind konstant und bekannt. Der Brechungsindex der Probe ist die einzige Variable in diesem System. Dieser Gesamt-Brechungsindex setzt sich zusammen aus dem Brechungsindex der Probenlösung und dem Brechungsindex des akkumulierten Binders durch den Bindungsvorgang auf der Oberfläche. Während der Messung bleibt auch der Brechungsindex der Lösung konstant, so dass die Veränderung des effektiven Brechungsindex Δ_{Neff} nur durch die biomolekulare Interaktion an der Wellenleiter-Oberfläche hervorgerufen wird und die Wechselwirkung sichtbar macht.

Im reflektierten Licht fehlt die Komponente, die unter dem Koppelwinkel eingestrahlt wurde. Ein Intensitätsminimum wird sichtbar. Da die Einkoppel- gleich den Auskoppelbedingungen sind, entsteht direkt neben dem Minimum ein Intensitätsmaximum (Abbildung 2.1A).

Die Messgröße ist die relative Position des Minimums. Die Position ändert sich proportional zu der bereits erwähnten Änderung des Brechungsindex an der oberen Grenzfläche des Wellenleiters. Der Grund für dieses Verhalten liegt in der Wellennatur des Lichtes. Die einfallende Welle (Abb. 2.1B) bildet mit der reflektierten Welle eine stehende Welle im Trägermaterial (Zone III). Im Wellenleiter (Zone II) bildet sich eine monomodale Welle, die sich nach rechts ausbreitet, während eine exponentiell abfallende Welle, das evaneszente Feld (Zone I), in den Außenraum reicht. Die Wellen in den 3 Bereichen sind über sogenannte Stetigkeitsbedingungen der elektromagnetischen Gleichungen an den Phasengrenzen miteinander gekoppelt. Diese Kopplung führt dazu, dass kleine Störungen in Zone I den durch zwei Phasengrenzen getrennten auskoppelnden Strahl verändern (Bier et al., 1997), (Kleinjung, 1998).

Der verwendete Laser ist ein Helium-Neon Laser der Klasse IIIb (10mW, Uniphase, San Jose, USA). Die Komponenten der optischen Strecke wurden von der Firma Owis (Staufen, Deutschland) geliefert. Alle Schläuche bestehen aus Teflon, um Adsorption von Nukleinsäuren und Eintragen von Luft in das Fließsystem zu vermeiden (Innendurchmesser 0,635 mm, Spetec GmbH, Erding, Deutschland). Die Probenlösungen wurden über eine peristaltische Pumpe durch die Fließzelle gepumpt (Perimax 12, Spetec GmbH, Erding, Deutschland). Die Messsignale wurden

mit Hilfe einer CCD-Kamera (Thompson TH 7803, USA) detektiert und zur rechnergestützten Auswertung übertragen. Die integrierten optischen Glasträger waren ASI-3200 Glaschips (Artificial Sensing Instruments, Zürich, Schweiz). Auf den Glasträgern sind die Wellenleiter nach einem speziellen Verfahren aufgedampft (Kunz 1991). Die Wellenleiter bestehen aus Tantaloxid (Ta_2O_5 , $0,75 \mu\text{m}$ Gitterkonstante, 160 nm mittlere Filmdicke); (Lukosz et al., 1983).

2.1.2 BIACore 2000

Bei den Versuchen zur Messung der enzymatischen Katalyse auf nukleinsäuremodifizierten Oberflächen wurden Messungen am BIACore 2000 (BIACore, Upsalla, Schweden) durchgeführt.

In Abbildung 2.2 wird das Messprinzip, die Oberflächenplasmon-Resonanz, und der Aufbau dargestellt

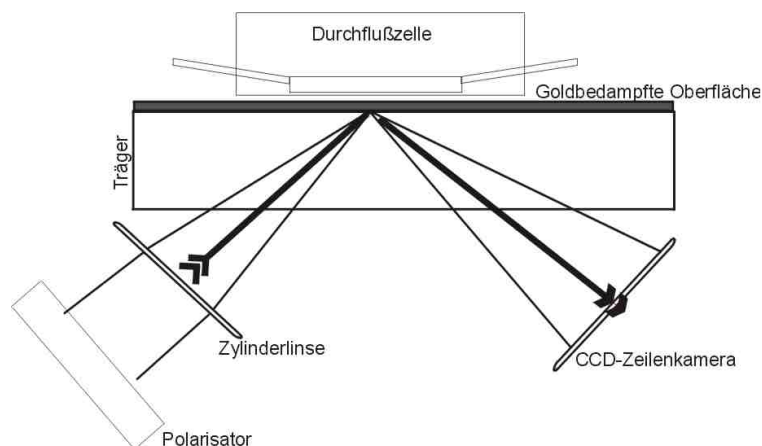


Abbildung 2.2 Aufbau der SPR-Apparatur des BIACore 2000. Polarisiertes Licht wird durch eine Zylinderlinse auf der Goldschicht fokussiert. Dort werden Plasmonen durch das auftreffende Licht angeregt. Dies erzeugt ein Intensitätsminimum im auskoppelnden Strahl der auf eine CCD-Kamera trifft und ausgewertet wird. Die Anlagerungsvorgänge auf der Oberfläche verändern den Brechungsindex und somit die Position des Minimums.

Ein wichtiges Element in diesem Messaufbau ist ein Metallfilm aus Gold, der sich zwischen Probenmedium und Glasplättchen befindet. Diese Goldschicht erfüllt denselben Zweck wie der Wellenleiter beim Gitterkoppler. In dieser Schicht werden sog. Oberflächenplasmonen (d.h. Schwingungen der freien Ladungsträger im Goldfilm) durch die Photonen angeregt.

Bei Totalreflexion fehlt im auskoppelnden Strahl die Energie, die zur Anregung der Plasmonen benötigt wird. Es entsteht wie beim Gitterkoppler ein Intensitätsminimum, dessen Position sich mit Änderung des Brechungsindex verändert. Die Änderung des Brechungsindex an der oberen Grenzfläche des Wellenleiters erfolgt dann durch Anlagerungsvorgänge auf der Oberfläche, die detektiert werden.

Dieses Gerät der Firma BIACore (Upsalla, Schweden) basiert auf einem ähnlichen Messprinzip wie der Gitterkoppler, nämlich der Bestimmung der Veränderung des effektiven Brechungsindex. Dieser optische Sensor erlaubt die Detektion und Auswertung von Bindungsprozessen niedermolekularer Stoffe (<200 Da) in Echtzeit ohne Markierungsprozeduren. Darüberhinaus ermöglicht das Fließsystem parallele Messungen der Enzym-DNA-Interaktion auf unterschiedlich präparierten Oberflächen und deren simultane Detektion.

Das Messsignal wird in willkürlichen Einheiten „response units“ (RU) angegeben. Zur besseren Verdeutlichung werden die gewonnenen Daten dann in Oberflächenbeladung umgerechnet ($1000 \text{ RU} = 1 \text{ ng/mm}^2$), (Karlsson et al., 1991).

Die hierfür verwendeten Chips waren CM5-Chips derselben Firma und besaßen funktionelle $-\text{COOH}$ Gruppen auf der Oberfläche. Bei den CM5-Chips ist auf der Goldoberfläche eine Dextran-Matrix aufgebracht, deren Aufgabe darin besteht, die aktive Oberfläche aufgrund der zahlreichen funktionellen Gruppen zu vergrößern. Die Immobilisierungsprozeduren, die für die Kopplung von Oligonukleotide auf der Oberfläche der CM5-Chips verwendet wurden, sind in den Standard-Protokollen der Firma BIACore ausführlich beschrieben (BIACore „Application Handbook“, 1995).

2.1.3 Faseroptik

Der Sensor wird in Abbildung 2.3 dargestellt. Das dem Gerät zugrunde liegende Prinzip ist die Messung evaneszenter Fluoreszenz.

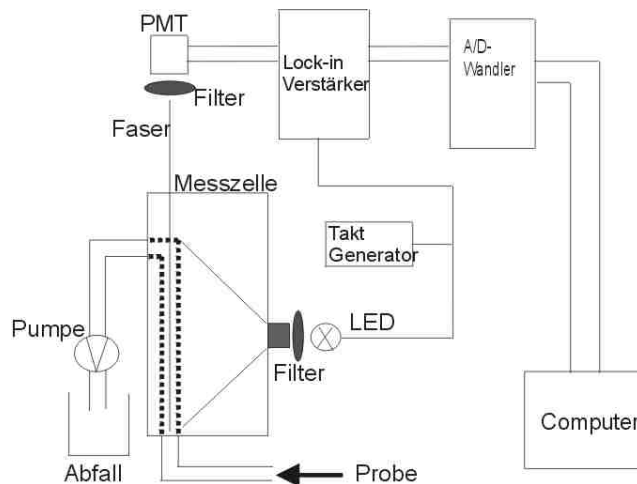


Abbildung 2.3 Aufbau der Messapparatur für Fluoreszenzmessungen an der optischen Faser (Kleinjung et al. 1997)

Das Anregungslicht der blauen getakteten LED passiert den Bandpassfilter (480nm) und trifft auf die Messfaser in der Durchflusszelle. Ein Teil des emittierten Lichtes der Fluorophoren gelangt entlang der Faser durch einen Kantenfilter in den Photomultiplier. Von dort gelangt das verstärkte Signal in den Lock-In-Verstärker. Anschließend wird das Signal durch einen A/D-Wandler modifiziert und im Rechner ausgewertet.

Die Schutzummantelung der verwendeten Fasern wird entfernt und der Glaskern freigelegt. Anschließend werden die Glasoberflächen chemisch präpariert, was in Kapitel 2.2 eingehender behandelt wird. Danach werden die biologischen Komponenten kovalent auf der Oberfläche gekoppelt.

Durch Hybridisierung immobilisierter Oligomere mit fluoreszenz-markierten komplementären Gegensträngen werden die Bindungsreaktionen sichtbar gemacht. Dabei werden die Fluoreszenzfarbstoffe durch eine Leuchtdiode angeregt. Das von den angeregten Fluorophoren emittierte Licht wird entlang der Glasfaser zur Signalverstärkung zum Photomultiplier geleitet und anschließend computergestützt ausgewertet.

Der Vorteil der evaneszenten Fluoreszenzmessung liegt in der Tatsache, dass nur an der Oberfläche gebundene fluoreszenz-markierte Biomoleküle detektiert werden.

Die in diesen Versuchen verwendeten Fasern sind HPCS-Fasern (hard plastic cladded silica, Hartplastik ummantelte Quarz-Fasern) mit einem reinen Quarz-Kern,

umgeben von einer Polymer-Schicht (cladding) und einer Schutzummantelung, dem Tefzel^R-Mantel. Der interne Durchmesser der Fasern beträgt 400 µm (Laser Components, Olching, Deutschland).

Das Anregungslicht liefert eine getaktete blaue LED (Nichia, Tokushima, Japan) und wird durch einen Bandpassfilter (480 nm, Omega Optical, Seefeld, Deutschland) in die Messzelle geleitet. Das Anregungslicht trifft senkrecht auf die Faseroberfläche und wird durch einen Bandpassfilter 475AF40 (Excitation von 455-495nm, Omega Optical, Seefeld, Deutschland) selektiert. Das Fluoreszenzlicht wird zu einem Photomultiplier (PMT, R1463, Hamamatsu-Deutschland, Herrsching, Deutschland) geleitet. Dessen Signal wird durch einen Lock-In-Verstärker (LIA-MV-150, FEMTO, Berlin, Deutschland) weiter verstärkt, der durch Diodenpuls getaktet wurde. Die verwendete Fließzelle, eine T-förmige Glaskapillare, besitzt ein effektives Volumen von 20µl. Die Proben wurden mit einer peristaltischen Pumpe (Perimax 12, Spetec GmbH, Erding, Deutschland) durch die Messzelle gepumpt. Das Schlauchsystem besteht aus Teflon-Schläuchen (Innendurchmesser 0,635 mm, Spetec GmbH, Erding, Deutschland), um Adsorption und Dispersion der Probenlösungen zu minimieren. Alle Komponenten der Faseroptik wurden von einem Rechner gesteuert.

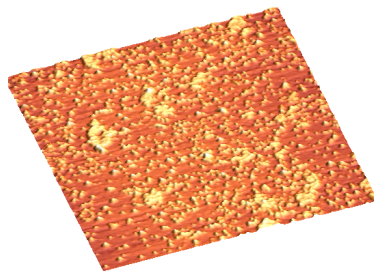
2.2 Chemische Methoden zur Präparierung von Oberflächen

In diesem Abschnitt werden die Oberflächenmodifikationen behandelt. Dies ist der grundlegende Schritt, um die biologischen Komponenten, z.B. Nukleinsäuren auf den optischen Sensoren zu immobilisieren. Die im Nachfolgenden beschriebene Reaktionen haben als Grundlage eine gläserne Sensoroberfläche. Den Reaktionsschritten voraus gehen einfache Reinigungsschritte mit Wasser und Ethanol. Dadurch werden jegliche organische Oberflächenverunreinigungen entfernt, die nachfolgende Beschichtungsschritte stören könnten.

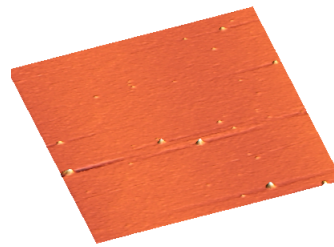
2.2.1 Silanisierung

Der Vorgang der Silanisierung dient dazu, die funktionellen OH-Gruppen der Glasoberfläche durch Amino-Gruppen zu ersetzen, über die kovalente Bindungen mit phosphorylierten Nukleinsäuren eingegangen werden.

Der Silanisierungsvorgang erfolgte nur bei den Chips des Gitterkopplers und der Glasoberfläche der optischen Faser. Diese Oberflächen wurden nach dem mehrfachen Spülen mit Wasser und vergälltem Ethanol in „Piranha-Lösung“ (H_2SO_4 conc. + 10%(v/v) H_2O_2) 5 min. gereinigt. Nach Ablauf dieser Zeit und wiederholtem intensivem Spülen mit Wasser wurden die funktionellen -OH Gruppen der Glasoberflächen mit 5M NaOH aktiviert. Bei diesem Schritt wurde je nach optischem Transducer die Natronlauge in unterschiedlicher Dauer eingesetzt. Die Wellenleiter des Gitterkopplers wurden maximal 30 sec. aktiviert, da längerer Kontakt mit der Natronlauge den Wellenleiter anätzt und den Transducer zerstört. Die optischen Fasern wurden mehrere Stunden der Natronlauge ausgesetzt. Anschließend wurden die Oberflächen erneut ausgiebig gespült. Der Silanisierungsprozess erfolgte, indem die Oberflächen für 2h bei 80°C mit 10%igem (v/v) Aminopropyl-triethoxysilan (APTS), pH 3.45, inkubierten. Nach Abschluss des Silanisierungsvorganges wurden die Glaschips und Fasern gespült und bei 115°C 15 min. getrocknet. In Abbildung 2.4 wird anhand von AFM-Aufnahmen (AtomForce Microscope) die Oberflächenbeschaffenheit vor und nach der Silanisierung dargestellt. Dabei wird deutlich, dass die Silanisierung zu einer glatteren und homogeneren Oberflächenbeschaffenheit führt.



A) (20µmx20µmx255nm)



B) (20µmx20µmx160nm)

Abbildung 2.4 AFM-Aufnahme einer Oberfläche aus Glas vor (A) und nach der Silanisierung (B)

Die silanisierten Oberflächen dienen als Grundlage für die kovalente Kopplungsmethode (Kessel et al., 1991); (Buszewski et al., 1998) und für die adsorptive Bindung von Streptavidin (Polzius et al., 1993); (Brandenburg et al., 1995). In Abbildung 2.5 wird das Reaktionsschema der Silanisierung der Glasoberflächen dargestellt.

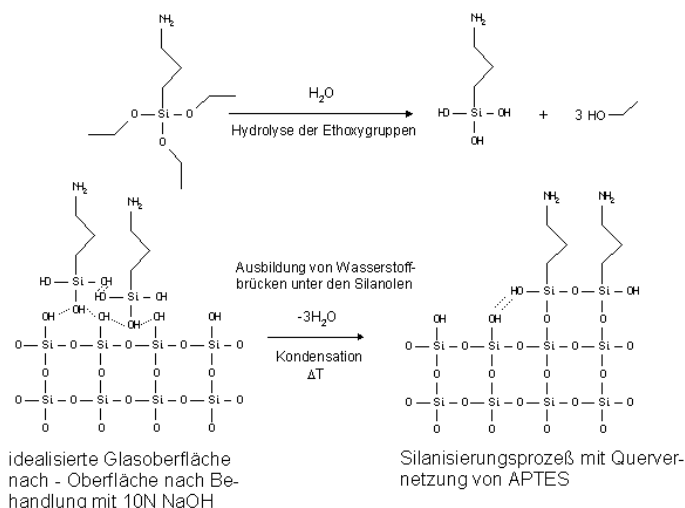


Abbildung 2.5 Reaktionsschema der Silanisierung der Glasoberflächen.

Die Ethoxygruppen des APTES werden im Wässrigen zu Ethanolgruppen hydrolysiert. Die Hydrolyse wird begünstigt durch das saure Medium (pH 3,45). Das Silanol bildet mit der aktivierte Glasoberfläche Wasserstoffbrücken. Im letzten Schritt bilden sich stabile Siloxane, durch Kondensation von Wasser.

2.2.2 Adsorptive Bindung

Diese Bindungsarten wurden bei den Gitterkopplerchips und den Glasträgern für den Biochip-Scanner eingesetzt. Bei den Glasträgern des Scanners handelte es sich um Deckgläser (20mmx20mm, Roth, Karlsruhe, Deutschland). Dabei wurden bei der Verwendung von Avidin nur durch Natronlauge aktivierte und bei Streptavidin silanisierte Deckgläser verwendet (Fernandez Romero et al., 1998).

Im Falle von Streptavidin wurden die silanisierten Glasoberflächen mit in Wasser gelöstem Streptavidin betropft. Die Konzentration dieser Lösungen betrug 50µg/ml und die Inkubation der Oberflächen mit dieser Lösung dauerte 2-3h bei Raumtemperatur. Danach wurde die Streptavidin-Lösung mit Wasser abgespült und die optischen Transducer staubfrei bei Raumtemperatur bis zur Messung aufbewahrt. Bei der Verwendung von Avidin war die Silanisierung der Oberflächen nicht erforderlich. Die Oberfläche der Glasträger wurde mit 5M NaOH für 1 h aktiviert. Nach intensivem Spülen mit Wasser inkubiert man diese Chips mit in Wasser gelöstem Avidin in der Konzentration von 50 µg/ml. Dieser Ansatz wurde dann über einen Zeitraum von 2h bei Raumtemperatur auf der aktivierten Glasoberfläche inkubiert, intensiv mit Wasser gespült, getrocknet und anschließend staubfrei aufbewahrt.

2.2.3 Kovalente Bindung von Nukleinsäuren

Diese Bindungsart ermöglichte eine stabile Kopplung von biologischen Bindern wie Nukleinsäuren auf der Oberfläche. Nukleinsäuren mit funktionellen Gruppen wie Phosphatgruppen am 5'-Ende werden durch ein Kopplungsreagenz auf den silanisierten Oberflächen immobilisiert. Durch diese Bindungsart sind die Sensor-Oberflächen regenerierbar und erlauben Mehrfachmessungen. Dies gestaltet sich im Falle der adsorptiven Bindung von Avidin und Streptavidin als schwieriger, da die Moleküle beim Regenerieren mit Lauge oder Säure auf der Oberfläche beschädigt oder von ihr entfernt werden.

Im ersten Schritt wird eine 50 mM 1-Methylimidazol-Lösung hergestellt. Der pH-Wert dieser Lösung wird mit 2 mM HCl auf pH 6 eingestellt, um ein saures Medium zu garantieren, das die Kopplungsreaktion ermöglicht. Mit dieser Lösung wird der

phosphorylierte Einzelstrang zu den jeweiligen erforderlichen Arbeitskonzentrationen verdünnt. Im letzten Schritt wird das Kopplungsreagenz hinzugegeben, 10 mM 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC). Nach kurzem intensiven Mischen wird diese Lösung auf die silanisierten Oberflächen getropft und für 2h bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend mit Wasser gespült und danach getrocknet. Im Anschluss daran werden die präparierten Glaschips bei Raumtemperatur staubfrei aufbewahrt.

Der Ablauf der kovalenten Bindung wird in Abbildung 2.6 wiedergegeben.

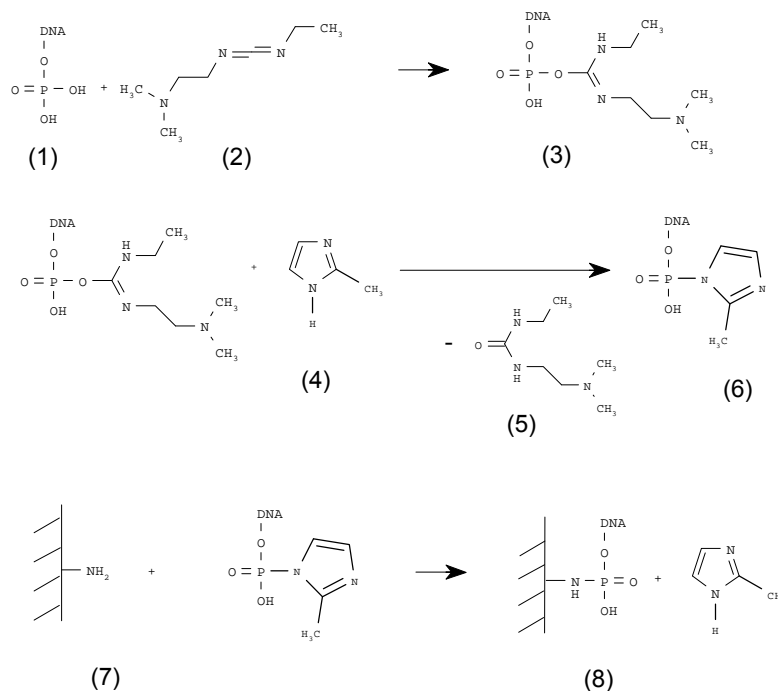


Abbildung 2.6 Reaktionsverlauf einer chemischen Kopplung von phosphorylierten Nukleinsäuren auf silanisierter Oberfläche mit Hilfe des Kopplungsreagenz EDC

Das phosphorylierte Oligomer (1) reagiert mit dem N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimid (EDC) (2). Bei dieser Carbodiimid-Aktivierung reagiert der Phosphomonoester mit dem EDC zu einem O-phospho-isoharnstoff (3). Dieser wiederum reagiert mit Methylimidazol (4) unter Abspaltung eines Harnstoffderivates (5) zu einem Phosphormethylimidazol (6). Diese Verbindung reagiert mit dem Nukleophilen wie z. B. der aminierten Oberfläche (7) zu stabilen Phosphoamiden (8). Die Aufgabe des Methylimidazols in dieser Reaktion besteht darin, das EDC-aktivierte Oligomer zu stabilisieren und die Reaktion zu katalysieren.

2.3 Bestimmung der Kinetik der Restriktionsendonuklease *EcoRI* im Mikroarray

2.3.1 Chemikalien und Lösungen

Alle Lösungen wurden autoklaviert oder steril filtriert und entgast. Die Experimente wurden bei 25°C und bei einer Pumpgeschwindigkeit von 30 µl/min durchgeführt.

Bei den Puffern wurde unterschieden in Laufpuffer und in Reaktionspuffer. Mit dem Laufpuffer wurden alle DNA- und Enzym-Lösungen angesetzt. Dieser bestand aus 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl und 1 mM EDTA. Die Reaktion des Enzyms wurde durch Zugabe des Reaktionspuffers gestartet, der zusätzlich den Kofaktor 10 mM MgCl₂ enthielt. Die Reaktion wurde mit dem Stopp-Puffer abgestoppt, der kein MgCl₂ sondern in einer erhöhten Konzentration EDTA (10 mM) als Komplexbildner für zweiwertige Kationen enthielt.

Die verwendeten Oligomere wurden bei der Firma BioTez (Berlin-Buch, Deutschland) synthetisiert und dort ebenfalls mit Biotin oder mit dem Marker Fluoresceinisothiocyanat (FITC) modifiziert. Die lyophilisierten Oligomere wurden in sterilem Wasser resuspendiert. Die Konzentration der Stammlösungen betrug 500 µM und wurden bei -20°C gelagert. Zur Immobilisierung der Biotin-markierten Oligomere wurde eine Konzentration von 2 µM auf die Oberflächen gegeben. Die Konzentration der FITC-markierten DNA betrug während der Versuche 500 nM bei der Auftragung auf die Chip-Oberfläche.

2.3.2 Oligonukleotide und Enzym

Das Enzym ist die Restriktionsendonuclease *EcoRI*, von der Firma Bio-Fermentas (Vilnius, Litauen).

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die spezifische doppelsträngige DNA-Sequenzen erkennen und diese schneiden. Sie wurden in vielen Prokaryoten identifiziert. Die natürliche Aufgabe dieser Enzyme besteht darin, dass sie das Eindringen von Phagen-DNA in die Bakterienzelle unterbinden sollen, indem sie diese schneidet und abbaut (Modrich et al., 1982).

Das Enzym *EcoRI* gehört in die Klasse II, da es aus einem Dimer zweier identischer Untereinheiten besteht. Als Kofaktor für die Induktion enzymatischer Aktivität wird

Mg²⁺ benötigt. Enzyme dieser Klasse wie *EcoRI* und *Hind III* sind einige der Hauptwerkzeuge bei DNA-Rekombinationstechniken. Die Struktur von *EcoRI* und der Reaktionsmechanismus in Lösung ist bereits Objekt verschiedener Arbeiten gewesen (Alves et al., 1989) und ausgiebig erforscht und beschrieben.

Aufgrund dieser Kenntnisse wurde *EcoRI* als Modellenzym genutzt, um sowohl die Bindungs- als auch die Restriktionskinetik mit einem Oberflächensensor in Echtzeit zu erfassen. Dies wird dadurch begünstigt, dass ein Fehlen des Kofaktors Mg²⁺ die Reaktion im Stadium der Enzym-Substrat-Bindung stoppt. Die Zugabe des Kofaktor schaltet die Reaktion an. Dadurch lässt sich der Vorgang der Enzym-Substrat-Bindung vollständig von der katalytischen Aktivität trennen.

In Abbildung 2.7 wird die Reaktion von *EcoRI* an einem doppelsträngigen DNA-Fragment in Lösung gezeigt.

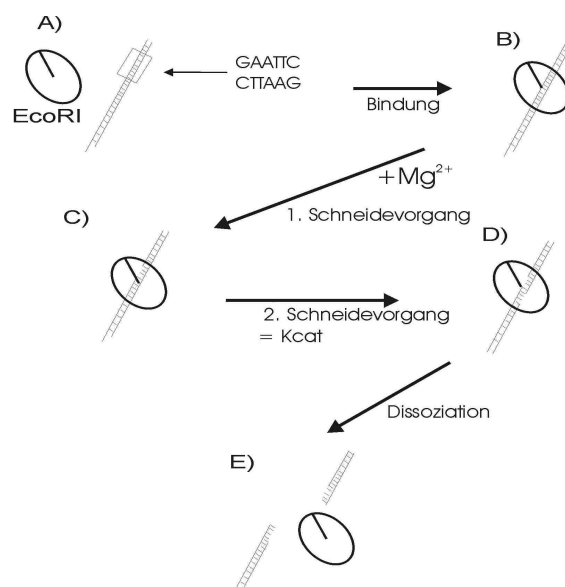


Abbildung 2.7 Bindungs- und Schneidevorgang von *EcoRI* in Lösung.

A) In Abwesenheit des Kofaktor Mg²⁺ treffen Enzym und DNA mit der spezifischen Sequenz aufeinander und das Enzym bindet an die Erkennungssequenz (B). Nach Zugabe von Mg²⁺ wird der doppelsträngige DNA-Strang geschnitten (C). Nach dem Schneiden des 2. Stranges (D) löst sich der Enzym-DNA-Komplex auf und die Produkte werden sichtbar (E).

Wie in Abbildung 2.7 verdeutlicht, kann das Reaktionsende erst mit dem Auflösen des Komplexes (Schritt E) beobachtet werden kann. Daher wird der 2. Schnitt mit der Wechselzahl k_{cat} beschrieben. Denn erst durch diesen Schnitt werden die Reaktionsprodukte freigesetzt.

In dieser Arbeit wird die Aktivität von *EcoRI* an mehreren DNA-Strängen mit unterschiedlichen Sequenzen parallel analysiert. Durch den Einsatz von Microarrays wurde die Reaktionskonstante in multiplen Spots an verschiedenen immobilisierten DNA-Molekülen gemessen und der Einfluss unterschiedlicher Plotttechniken auf den Reaktionsablauf beobachtet. Die Konzentration der Stammlösung des Enzyms beträgt 17 µg/ml. Diese Stammlösung wurde für die Versuche verdünnt auf die Konzentration von 1 µg/ml.

Neben den Oligonukleotiden wurde auch ein FITC-Biotin-Konjugat verwendet. Seine Aufgabe bestand darin, die Begrenzung des Arrays im Scanner sichtbar zu machen. Dadurch wurde die Optik des Scanners genau auf das geplottete Array justiert und ermöglichte die anschließende Auswertung der einzelnen Spots. Dieses Konjugat wurde im Institut synthetisiert.

Die verwendeten Oligomere haben folgende Sequenzen:

DNA_{1immob}: 5'- Biotin-CTT CAA GAA TTC TCA TGT-----3'

DNA_{1FITC}: 3'-----GAA GTT CTT AAG AGT ACA--FITC-5'

Diese beiden Stränge sind komplementär zueinander. Der Strang DNA 1_{immob} wird über Biotin auf der Avidin-beschichteten Chipoberfläche adsorptiv immobilisiert. Der Strang DNA 1_{FITC} hybridisiert an der DNA 1_{immob} und macht durch seine FITC-Markierung die Bindung und den enzymatischen Verdau sichtbar. Nach der Hybridisierung enthält dieser Doppelstrang die Binde- und Schneidesequenz für die Restriktionsendonuklease (unterstrichene Sequenz).

DNA_{2immob}: 5'-Biotin- TAT CCC GAA TTC CCC A-----3'

DNA_{2FITC}: 3'-----ATA GGG CTT AAG GGG T--FITC-5'

Der Unterschied zwischen DNA 1 und DNA 2 liegt in dem GC-Anteil der Nachbarschaftsregion der Schnittsequenz des Enzyms, der bei der DNA 2 höher ist.

DNA_{3immob}: 5'-Biotin- CTC CAC CAC TCT CAA TCC-----3'

DNA_{3FITC}: 3'-----GAG GTG GTG AGA GTT AGG-FITC-5'

DNA 3 wird nicht vom Enzym geschnitten, da sie keine Schnittsequenz aufweist. Sie dienen als Kontrolle.

2.3.3 Mikrodosiertechniken

2.3.3.1 Plotten mit Mikropipettiersystem (Piezo-Ink-Jet-Technik)

Es wurde hierbei das Pipettiersystem Nano-Plotter der Firma GeSim verwendet (Gesellschaft für Silizium-Mikrosysteme mbH, Dresden, Deutschland). Mit Hilfe dieses Pipettiersystems können auf Oberflächen zahlreiche Spots gesetzt werden, die ein Microarray bilden.

Dabei wird ein mit Flüssigkeit gefülltes Kapillarsystem über einen elektromechanischen Aktor (Piezokristall) einem kurzen Druckpuls ausgesetzt. Dieser Druckpuls pflanzt sich durch die Flüssigkeit fort und führt an einer gegen Luft geöffneten Düse (30-100 μm Durchmesser) zu einer Beschleunigung der Flüssigkeit bis zu 100000g. Aufgrund der Ausströmung und der geringen Fähigkeit zur Komprimierung der Flüssigkeit wird diese wieder abgebremst. Trägheit und Oberflächenspannung der Flüssigkeit führen zu einer Abschnürung eines kleinen Tropfens mit einer Fluggeschwindigkeit von 2 (bis 5) m/s (Döring et al., 1991) wie in Abbildung 2.8 beschrieben. Das Tropfvolumen hängt neben dem Düsendurchmesser (30-100 μm) auch von der Spannungshöhe und Dauer des Spannungspulses am Aktuator und von der Viskosität der Flüssigkeit ab.

Für diese molekularbiologische Applikation wurden 20x20 mm Glaschips der Firma Roth verwendet, die im Vorfeld mit Avidin beschichtet wurden. Dabei wurden mit einer Pikoliterpipette (Pico-Tip) 5 Tropfen pro Spot gesetzt. Das Gesamttropfvolumen betrug 1,25 nl pro Spot.

2.3.3.2 Plotten mit Probot (Kapillar-Stempel-Technik)

Das Robot System Probot (Bai GmbH, Bioanalytische Instrumente, Deutschland) dient dazu, Nanolitermengen einer Probe in ein Array auf miniaturisierte

Probenträger aufzubringen. Dies erfolgt mit hoher Positioniergenauigkeit und Wiederholbarkeitsrate.

Dabei wird aus einer Mikrotiterplatte in eine Kapillare das Probenvolumen gesaugt und dann auf den Chip durch Adhäsionskräfte abgelegt. Dazu wird die Kapillare (LC-Packings, Fused Silica Tubings, 150 µm I.D., 280 µm O.D., USA) in unmittelbare Nähe des Glaschips gebracht, ohne diesen zu berühren. Zwischen den einzelnen Tropfvorgängen wird die Kapillare intensiv gespült, um Kontaminationen zu vermeiden. Der Abstand zwischen den Punkten beträgt 0,5 mm. Das Gesamttropfenvolumen betrug 3 nl.

In Abbildung 2.8 werden unterschiedliche Mikrodosier-techniken graphisch beschrieben.

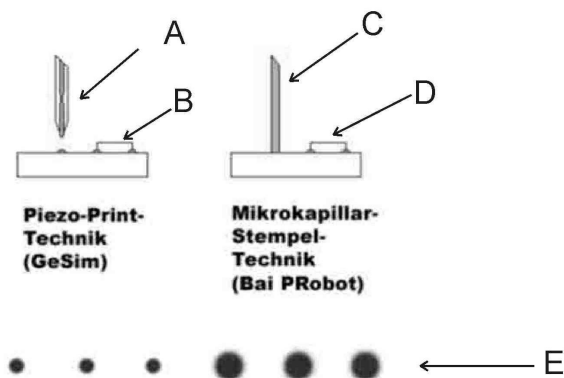


Abbildung 2.8 Darstellung der beiden Mikrodosier-Systeme und den jeweiligen charakteristisch gesetzten Spots.

Bei dem Gerät von GeSim wird über eine Düse (A) die Flüssigkeit durch hohen Druck auf die Oberfläche gespritzt. Der Abstand der gesetzten Spots untereinander ist 0,5 mm (B). Bei dem Gerät von Bai setzt eine Silica-Kapillare (C) die Tropfen über eine Kolbenpumpe auf die Oberfläche. Der hier gewählte Abstand zwischen den Spots beträgt 0,5 mm (D). Die Tropfmuster der beiden Geräte sind dargestellt (E).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden beide Techniken verwendet, um die Microarrays herzustellen. Dabei sind in der oberen Zeile die Grundprinzipien der Dosiersysteme zu erkennen. In der unteren Zeile werden sowohl die Größe wie auch die Geometrie der gesetzten Tropfen durch die jeweilige Technik gezeigt.

2.3.4 Auftragen der Proben

Beim Auftragen der biotinylierten DNA-Oligomere durch die beiden Techniken musste darauf geachtet werden, dass sich die Tropfbereiche und das Auslesefenster

des DNA-Scanners überlagerten. Dies wurde dadurch erreicht, dass der äußere Rand des Tropfbereiches durch ein biotinyliertes FITC-Konjugat markiert wurde. Mit dessen Hilfe wurde der Scanner justiert, um alle Spots beobachten zu können. Durch den Plotter wurden die biotinylierten Oligomere auf die Glasoberfläche getropft und dort immobilisiert. Diese Oligomere werden im laufenden Text DNA_{1,2,3}_{immob} bezeichnet. Die Hybridisierung der FITC-markierten Oligomere erfolgte dann im Scanner, indem diese Oligomere hintereinander über die gesamte Oberfläche gegeben wurden.

Die Struktur des Arrays gliedert sich wie in Tabelle 2.1 beschrieben :

FITC-Konjugat	DNA ₁ _{immob} /DNA ₁ _{FITC}	DNA ₃ _{immob} /DNA ₃ _{FITC}	DNA ₂ _{immob} /DNA ₂ _{FITC}	DNA ₃ _{immob} /DNA ₃ _{FITC}	FITC-Konjugat
DNA ₃ _{immob} /DNA ₃ _{FITC}	DNA ₂ _{immob} /DNA ₂ _{FITC}	DNA ₁ _{immob} /DNA ₁ _{FITC}	DNA ₃ _{immob} /DNA ₃ _{FITC}	DNA ₂ _{immob} /DNA ₂ _{FITC}	DNA ₃ _{immob} /DNA ₃ _{FITC}
DNA ₁ _{immob} /DNA ₁ _{FITC}	DNA ₂ _{immob} /DNA ₂ _{FITC}	DNA ₃ _{immob} /DNA ₃ _{FITC}	DNA ₁ _{immob} /DNA ₁ _{FITC}	DNA ₃ _{immob} /DNA ₃ _{FITC}	DNA ₂ _{immob} /DNA ₂ _{FITC}
DNA ₃ _{immob} /DNA ₃ _{FITC}	DNA ₁ _{immob} /DNA ₁ _{FITC}	DNA ₃ _{immob} /DNA ₃ _{FITC}	DNA ₃ _{immob} /DNA ₃ _{FITC}	DNA ₂ _{immob} /DNA ₂ _{FITC}	DNA ₃ _{immob} /DNA ₃ _{FITC}
DNA ₂ _{immob} /DNA ₂ _{FITC}	DNA ₃ _{immob} /DNA ₃ _{FITC}	DNA ₂ _{immob} /DNA ₂ _{FITC}	DNA ₁ _{immob} /DNA ₁ _{FITC}	DNA ₃ _{immob} /DNA ₃ _{FITC}	DNA ₂ _{immob} /DNA ₂ _{FITC}
DNA ₃ _{immob} /DNA ₃ _{FITC}	DNA ₁ _{immob} /DNA ₁ _{FITC}	DNA ₃ _{immob} /DNA ₃ _{FITC}	DNA ₂ _{immob} /DNA ₂ _{FITC}	DNA ₃ _{immob} /DNA ₃ _{FITC}	DNA ₂ _{immob} /DNA ₂ _{FITC}
DNA ₁ _{immob} /DNA ₁ _{FITC}	DNA ₂ _{immob} /DNA ₂ _{FITC}	DNA ₃ _{immob} /DNA ₃ _{FITC}	DNA ₁ _{immob} /DNA ₁ _{FITC}	DNA ₂ _{immob} /DNA ₂ _{FITC}	DNA ₁ _{immob} /DNA ₁ _{FITC}
DNA ₃ _{immob} /DNA ₃ _{FITC}	DNA ₁ _{immob} /DNA ₁ _{FITC}	DNA ₂ _{immob} /DNA ₂ _{FITC}	DNA ₁ _{immob} /DNA ₁ _{FITC}	DNA ₃ _{immob} /DNA ₃ _{FITC}	DNA ₂ _{immob} /DNA ₂ _{FITC}
DNA ₁ _{immob} /DNA ₁ _{FITC}	DNA ₃ _{immob} /DNA ₃ _{FITC}	DNA ₃ _{immob} /DNA ₃ _{FITC}	DNA ₂ _{immob} /DNA ₂ _{FITC}	DNA ₁ _{immob} /DNA ₁ _{FITC}	DNA ₁ _{immob} /DNA ₁ _{FITC}
DNA ₂ _{immob} /DNA ₂ _{FITC}	DNA ₃ _{immob} /DNA ₃ _{FITC}	DNA ₁ _{immob} /DNA ₁ _{FITC}	DNA ₃ _{immob} /DNA ₃ _{FITC}	DNA ₁ _{immob} /DNA ₁ _{FITC}	DNA ₁ _{immob} /DNA ₁ _{FITC}
DNA ₃ _{immob} /DNA ₃ _{FITC}	DNA ₁ _{immob} /DNA ₁ _{FITC}	DNA ₂ _{immob} /DNA ₂ _{FITC}	DNA ₁ _{immob} /DNA ₁ _{FITC}	DNA ₂ _{immob} /DNA ₂ _{FITC}	FITC-Konjugat

Tabelle 2.1 Darstellung des 6x11 Formats und der Positionen der einzelnen DNA-Molekülen und des FITC-Konjugates

2.3.5 Prinzip der Messungen am Biochip-Scanner

Die präparierten Glaschips werden in das Fließsystem des Scanners eingebaut. Der Aufbau des Scanners wird schematisch im Blockdiagramm Abbildung 2.9 dargestellt.

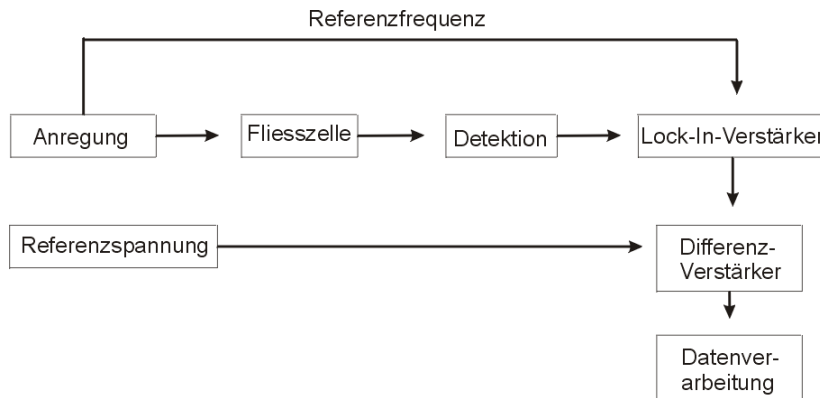


Abbildung 2.9 Schematische Darstellung des Messprinzips des Biochip-Scanners (Griep, 2000)

Die Umsetzung dieses Prinzips wird in Abbildung 2.10 gezeigt.

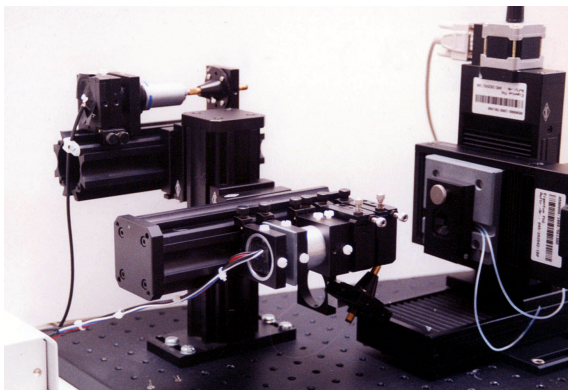


Abbildung 2.10 Aufbau des Biochip-Scanners.

Im rechten Bildabschnitt befindet sich die Fließzelle, die mit 0,5 mm Teflonschläuchen an eine peristaltische Pumpe (nicht im Bild) angeschlossen ist. Die vordere Zeile trägt den Detektor-Aufbau, die hintere Zeile die Anregungseinheit mit der Fasereinkopplung.

In der Abbildung 2.10 ist der realisierte Aufbau des Biochip-Scanners zu sehen, der für die folgenden Messungen verwendet wurde.

Bei diesem Durchfluss-Chip-Auslesegerät werden Hybridisierungen von Oligomeren, die durch einen kovalent gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, an komplementären und nicht-komplementären immobilisierten unmarkierten Einzelsträngen in Echtzeit beobachtet. Die dabei entstehenden

Hybridisierungsmuster geben Auskunft über Passgenauigkeit der Sequenzen. Die Aktivität der Restriktionsendonuklease *EcoRI* wird durch Abnahme der Fluoreszenzintensität beobachtet, die auf die enzymatische Abtrennung der Stränge von der Oberfläche zurückzuführen ist.

Dies ist möglich, da das enzymatisch bedingte Ablösen der DNA von der Oberfläche mit der Intensitätsabnahme der Fluoreszenz korreliert.

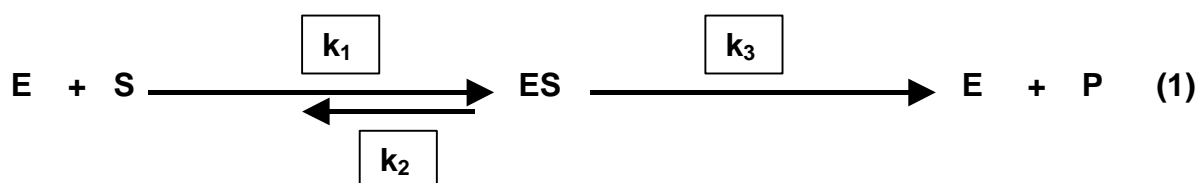
Die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes Fluoresceinisothiocyanat (FITC) erfolgte bei 475 nm, die Emission von FITC liegt bei einer Wellenlänge von 510 nm. Wegen dieser Eigenschaft wird ein optischer Aufbau gewählt, der nur das Licht der angeregten Fluorophore durchlässt und das Anregungslicht ausschließt. Dies verhindert starkes Hintergrundrauschen.

Im ersten Schritt wurden die einzelsträngigen biotinylierten DNA auf einer Avidin-beschichteten Oberfläche immobilisiert. Dabei werden diese unterschiedlichen Oligomere nacheinander über die Oberfläche geleitet.

Im 2. Schritt wurde dann ein DNA-Gemisch auf die Chipoberfläche geleitet, bestehend aus den verschiedenen FITC-markierten Oligomeren. Anschließend wurde die Restriktionsendonuklease auf die Oberfläche gegeben, wo dessen Bindung am DNA-Substrat erfolgte. Die katalytischen Reaktionen wurden dann durch den Austausch des Laufpuffers mit dem Reaktionspuffer eingeleitet.

Die Auswertung der Daten erfolgte in allen Fällen durch den Vergleich der verschiedenen Signalverläufe und Kurvenanpassung mit nicht-linearer Regression. Daraus wurden die Geschwindigkeitskonstanten des Enzyms k_{cat} ermittelt.

Der mathematische Hintergrund wird in den nachfolgenden Gleichungen beschrieben:



wobei **E** das Enzym, **S** das Substrat, **ES** den Enzym-Substrat-Komplex und **P** das Produkt bezeichnet. Dieser Mechanismus ist als Michaelis-Menten-Kinetik bekannt und beschreibt die Umsätze im stationären Gleichgewicht.

Mit *EcoRI* wird ein Enzym-Substrat-Komplex vorgestellt, dessen Reaktion durch fehlende Co-Faktoren im Stadium des Enzym-Substrat-Komplexes gestoppt werden kann. Das bedeutet, dass Gleichung (1) in 2 Teilgleichungen zerfällt: die Bildung des

Enzym-Substrat-Komplexes und die Katalyse mit anschließendem Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes. Die Immobilisierung eines der Reaktionspartner auf einer Oberfläche bindet den Komplex auf derselben. Den Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes bei der Zugabe des Co-Faktors kann man direkt beobachten.

Nehmen wir nun an, dass die 2. Teilgleichung



die Katalyse direkt beschreibt. Da der aktive Enzym-Substrat-Komplex (sofort) entfernt wird, ist die Änderung der Menge an Enzym-Substrat-Komplex direkt proportional zur vorhandenen Menge an Enzym-Substrat-Komplex mit der Proportionalitätskonstanten $-k_3$.

$$d[\text{ES}]_A = -k_3 [\text{ES}]_A dT \quad (3)$$

Die Klammer $[\]_A$ bezeichnet eine Flächenbelegung, keine echte Konzentration. Das Enzym ist an einen immobilisierten DNA-Strang gebunden. So können für beide Substanzen keine Konzentrationen im eigentlichen Sinne angegeben werden, sondern nur Oberflächenbeladungen. Diese Oberflächenbeladung ist die Messgröße von Oberflächensensoren.

Die Lösung der Differentialgleichung ist eine Exponentialfunktion für die Belegung der Oberfläche mit Enzym-Substrat-Komplex:

$$[\text{ES}]_A(t) = [\text{ES}_0]_A e^{-k_3 t} \quad (4)$$

wobei $[\text{ES}_0]_A$ die Anfangsbelegung ist. Die Proportionalitätskonstante des Umsatzes zur Menge an Enzym-Substrat-Komplex führt dazu, dass aus dem Umsatz auf die Menge an Enzym-Substrat-Komplex geschlossen werden kann. Die Größe $[\text{ES}_0]_A$ in **Gl. (4)** gibt die Belegung mit Enzym-Substrat-Komplex wieder. Das bedeutet, dass die Reaktion zu jeder Zeit in kompletter Sättigung abläuft.

Die Ermittlung der Dissoziationskonstanten ergibt daher direkt die Wechselzahl k_3 (turn over number, $k_3 = k_{cat}$). Zur Bestimmung dieser Konstanten ist die Kenntnis der Konzentration sowohl des Substrates als auch des Enzyms nicht erforderlich. Daher scheiden diese Größen hier im Gegensatz zu anderen Methoden als Fehlerquellen aus. Darüberhinaus ist die Wechselzahl kein Grenzwert steigender Substratkonzentrationen sondern der Wert bei kompletter Sättigung.

2.4 Messung der Aktivität des Klenow⁻-Fragments auf der Oberfläche

2.4.1 Puffer

2.4.1.1 Gitterkoppler

Der Reaktionspuffer bestand aus 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl und 0,1 mg/ml BSA. Alle Versuche wurden mit dem Reaktionspuffer durchgeführt. Alle Chemikalien wurden in analytischer Qualität von Fluka (Taufkirchen, Deutschland) erworben.

Die Fließgeschwindigkeit betrug 10 µl/min und die Reaktionstemperatur 25°C. Alle Lösungen wurden autoklaviert und filtriert. Um die Bildung von Luftblasen im Fließsystem zu verhindern, wurden die Puffer zusätzlich vor den jeweiligen Experimenten entgast.

Die Hybridisierungsexperimente wurden mit einem Puffer durchgeführt, der aus den folgenden Komponenten bestand: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl.

2.4.1.2 BIACore 2000

Bei den Versuchen am BiaCore wurde ein anderer Laufpuffer verwendet (10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl und 10 mM MgCl₂). Die enzymatischen Aktivitätsmessungen wurden im Reaktionspuffer des Klenow⁻- Fragmentes durchgeführt. Dazu wurde das System nach der Präparierung der Chip-Oberflächen umgepuffert. Die Fließgeschwindigkeit betrug 5 µl/min und die Reaktionstemperatur betrug 37°C.

2.4.2 Oligonukleotide und Nukleotide

Der Primer und das Template mit allen benötigten Modifizierungen wurden von der Firma BioTez (Berlin-Buch, Deutschland) hergestellt.

Der Primer war:

5'-Biot-TAG CTA TGG AAT TCC TCG TAG GCA-3'

Als Template wurde verwendet:

5'-(dA)₅₀-GC CTA CGA GGA ATT CCA TAG CTA-3'

Alle Oligonukleotide wurden in steril filtriertem Wasser suspendiert und bei -20°C aufbewahrt. Die Konzentration dieser Stammlösung betrug jeweils $500\ \mu\text{M}$ und wurde photometrisch bei $260\ \text{nm}$ überprüft.

Die einzelnen Arbeitskonzentrationen wurden unmittelbar vor den Messungen verdünnt. Die Primer lagen dann mit einer Konzentration von $2\ \mu\text{M}$ vor, und die Template-Stränge mit einer Konzentration von $1\ \mu\text{M}$.

Die unmarkierten Nukleotide (dNTP, Pharmacia, Stockholm, Schweden) lagen ebenfalls in Wasser gelöst in einer Stammkonzentration von $100\ \text{mM}$ vor.

Die $^3\text{HdTTP}$ -Nukleotide (Amersham, Braunschweig, Deutschland) lagen in einer Aktivität von $200\ \mu\text{Ci}$ vor als [Methyl- ^3H]-thymidin 5'-Triphosphat- NH_4 -Salz gelöst in einem Ethanol/Wasser-Gemisch im Verhältnis $1:1(\text{v/v})$. Diese markierten Nukleotide hatten im Reaktionsmix eine Aktivität von $1\ \mu\text{Ci}$.

2.4.3 Enzym

Die DNA-Polymerase I ist ein $103\ \text{kDa}$ Monomer. Bei Spaltung durch die Protease Subtilisin entsteht ein kleines Fragment mit $36\ \text{kDa}$, die 5'-3'-Exonuklease, und ein $67\ \text{kDa}$ -Fragment, das Klenow-Fragment, bestehend aus Polymerase und 3'-5'-Exonuklease.

Die Aufgabe der DNA-Polymerase I ist es, schrittweise Ligation von Desoxyribonukleotideinheiten mit Hilfe des Matrizen-Stranges und des Kofaktors Mg^{2+} an das 3'-Hydroxylende eines wachsenden DNA-Moleküls zu katalysieren. Der Reaktionsmechanismus lautet wie folgt:



Hierbei beschreibt $(dNMP)_n$ die bereits eingebauten monophosphorylierten Nucleoside, die den synthetisierten Strang bilden, während dNTP für Desoxynucleosidtriphosphat steht. Durch die enzymatische Reaktion wird ein weiteres Nucleotid unter Abspaltung zweier Phosphatgruppen (PPi) an den Strang ligiert.

Bei der DNA-Polymerase I sind die Bereiche für 3 unterschiedliche enzymatische Aktivitäten in einer einzigen Polypeptidkette angeordnet wie in Abbildung 2.11 dargestellt wird.

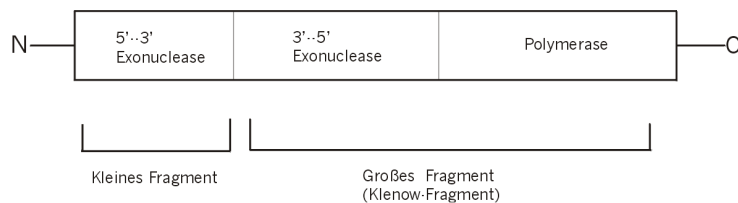


Abbildung 2.11 Darstellung der beiden Fragmente der DNA-Polymerase I mit den unterschiedlichen katalytischen Komponenten in einer Peptidkette

Neben der Polymerisation kann die DNA Polymerase I auch die Hydrolyse von DNA katalysieren. Dabei wird unterschieden zwischen 3'-5'-Exonuklease und 5'-3'-Exonuklease. Im ersten Fall wird ein falsch eingebautes Nucleotid durch fehlerhafte Basenpaarung mit dem Matrizenstrang erkannt und entfernt, bevor die Polymerisation weiter geht (Abbildung 2.12). Die Polymerase I überprüft das Ergebnis jedes von ihr katalysierten Polymerisationsschrittes, bevor sie mit dem nächsten fortfährt („proofreading-activity“). Da dieser Schritt entgegen der 5'-3'-Syntheserichtung läuft, wird er mit 3'-5'-Exonukleaseaktivität bezeichnet.

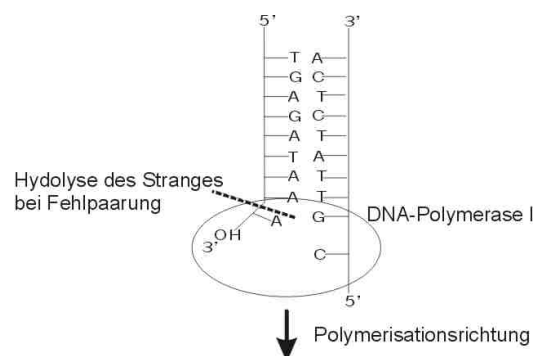


Abbildung 2.12 Darstellung der 3'-5'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase I

Der zweiten Exonukleaseaktivität, 5'-3'-Exonukleaseaktivität, fällt bei der Replikation der DNA ebenfalls eine besondere Rolle zu.

Ihre Aufgabe besteht darin, die RNA Primermoleküle, die bei der Synthese des „Lagging-Strand“ in der DNA Replikation nötig sind, durch DNA Nukleotide zu ersetzen.

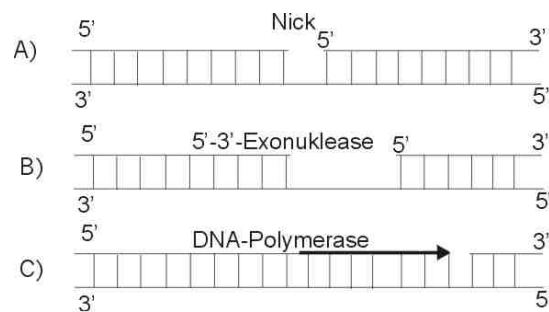


Abbildung 2.13 Darstellung der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität und der Polymeraseaktivität der DNA-Polymerase I. (A) Offene Phosphodiesterbindung, „Nick“ ist in der DNA präsent. 5'-3'-Exonuklease greift am 5'-Ende des „Nick“ an und entfernt Teile der DNA (B). Die Polymeraseaktivität des Enzyms schließt die entstandene Lücke (C).

Die Polymerase- und 3'-5'-Exonukleaseaktivität bilden zusammen das sog. Klenow-Fragment mit einem Molekulargewicht von 76 kDa. Diese Enzymkomponente wird aus der Polymerase I gewonnen durch Behandlung mit der Protease Subtilisin. Dadurch wird die 5'-3'-Exonuklease entfernt. Für die Polymerisation in 5'-3'-Richtung benötigt es, wie bereits erwähnt, ein freies 3'-Hydroxylende. Das Klenow-Fragment wird überwiegend in der Molekularbiologie im Rahmen von Sequenzierungen und Strangsynthese eingesetzt, bei denen die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase I stören würde.

In manchen Arbeitsschritten stört auch die 3'-5'-Exonukleaseaktivität des Klenow-Fragmentes. So wurde bei der SDA-Technik (strand displacement amplification) (Walker et al., 1992), (Walter et al., 1994) eine weitere Variante des Klenow-Fragmentes benutzt. Durch Einführen von Mutationen in den Teil des Polymerase I Gens, das die entsprechende Aktivität kodiert, wurde auch diese Exonukleaseaktivität entfernt und das entstehende Enzym wird Klenow, exo^- bezeichnet.

Diese Enzymkomponente, im weiteren Verlauf dieser Arbeit Klenow $^-$ genannt, wird aus einem rekombinanten *E.coli*-Stamm isoliert. Diese Version des Klenow-

Fragments wurde ausgewählt, um jegliche Exonukleaseaktivität ausschließen und potentielle unerwünschte Nebenreaktionen auf der Oberfläche am immobilisierten DNA-Substrat vermeiden zu können.

Das Enzym wurde von der Firma MBI Fermentas erworben und lag in einer Konzentration von 5 U/ μ l vor. Dabei entsprach 1 U der Menge Enzym, die den Einbau von 10 nmol Deoxyribonukleotide in 30 min bei 37°C durchführt (MBI Fermentas, Vilnius, Litauen). Die Menge des Enzyms betrug bei der Aktivitätsmessung in Lösung 0,2 U/ml und es wird in der Arbeit fortlaufend als Klenow-Fragment bezeichnet. Die Konzentration wurde bestimmt mit Hilfe eines photometrischen BCA-Protein-Assays (Pierce, USA). Die durchschnittliche Enzymkonzentration betrug 600 μ g/ml.

2.4.4 Aktivitätsmessung in Lösung

Die Aktivität des Enzyms wurde in Lösung bestimmt, um sie mit den Aktivitäten auf der Oberfläche vergleichen zu können. Dazu wurden radioaktiv markierte Nukleotide in den synthetisierten Strang eingebaut und später detektiert. Die in Lösung benutzten Primer und Templates waren mit denen in den Oberflächenexperimenten identisch. Vor Beginn der enzymatischen Messung wurden der Primer und das Template im Verhältnis 1:1 vorhybridisiert. Dabei lagen beide Oligomere in einer Konzentration von 0,1 μ M vor.

Die Hybridisierung erfolgte, indem die beiden Oligonukleotide im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) auf 90°C erhitzt und dann langsam auf Raumtemperatur abgekühlt wurden. Darauf folgte der enzymatische Aktivitätstest.

Zur Bestimmung der Enzymparameter v_{\max} und K_m wurden unterschiedliche Nukleotidkonzentrationen verwendet. Das radioaktiv markierte $^3\text{HdTTP}$ wurde mit einer Aktivität von 1 μ Ci in den Ansätzen verwendet. Dieses „heiße“ Substrat wird immer in einer konstanten Menge dem Assay beigelegt. Verändert wird die Menge des „kalten“ Substrats, d.h., der nicht-markierten Nukleotide. Die Menge des Klenow-Fragmentes betrug 0,2 U/Ansatz.

Die quantitative Auswertung dieser Experimente basiert auf der Messung der Veränderung der Substrat- oder Produktkonzentration. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird als Differenzenquotient, $v = \Delta s / \Delta t$ ermittelt und sollte idealerweise über die Dauer der Messung konstant sein. Im Bereich hoher Substratkonzentrationen ($s \gg K_m$) ist diese Forderung erfüllt, da die Reaktionsgeschwindigkeit dann nicht von der Substratkonzentration abhängt. Das bedeutet, dass die erforderliche Substratkonzentration mindestens dem K_m entsprechen muss, i. d. R. nimmt man für diese Tests den doppelten K_m -Wert als Ausgangswert.

Die Versuche wurden durch Zugabe des Enzyms im Schüttler bei 37°C gestartet. In bestimmten Zeitintervallen wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 M EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) gestoppt, indem es den Kofaktor Mg^{2+} durch Komplexbildung inaktivierte. Im Anschluss daran wurden die Proben auf GF/A-Filterpapier (Glass Micro Fibre Filter/A, Whatman, USA) gegeben, die durch jeweilige Porengröße die eingebauten synthetisierten radioaktiv markierten Oligonukleotide von den 3HdTTP -Nukleotiden trennte, die nicht eingebaut wurden. Dann werden die Filter bei 50°C für 30 min getrocknet. Anschließend werden die Filter mit kalter Trichloressigsäure (TCE) (+ 1% NaH_2PO_4) mehrfach gewaschen, um noch vorhandenes ungebundenes Substrat zu entfernen. Die auf dem Filterpapier gebundenen Oligonukleotide wurden in Szintillatorflüssigkeit („Ready Protein“, Beckmann, Deutschland) mindestens 2h aufbewahrt, um die Chemilumineszenz abklingen zu lassen und anschließend die Aktivität der markierten Nukleotide vermessen.

Dabei ist zu beobachten, dass durch diese Filter das Signal der radioaktiv-markierten Basen gequenchet wird. Das heißt, nicht der erwartete vollständige Zerfall wird beobachtet, sondern nur ein Bruchteil dessen. Diese Abweichung vom erwarteten Wert wird als „Quencheffekt“ bezeichnet. Um diesen zu ermitteln, wird eine Kalibrierkurve ermittelt sowohl für die Lösungen, die auf dem GF/A-Filter aufgetragen werden, wie auch für die Lösungen, die direkt in den Szintillator gegeben werden. Dabei wurde eine Verminderung von 40% ermittelt. Diese Verminderung muss nun bei allen Werten berücksichtigt werden.

Bei diesen Messungen wurde der K_M -Wert des Klenow-Fragments mit Hilfe eines Lineweaver-Burk-Plots ermittelt, wie in Abbildung 2.14 dargestellt wird.

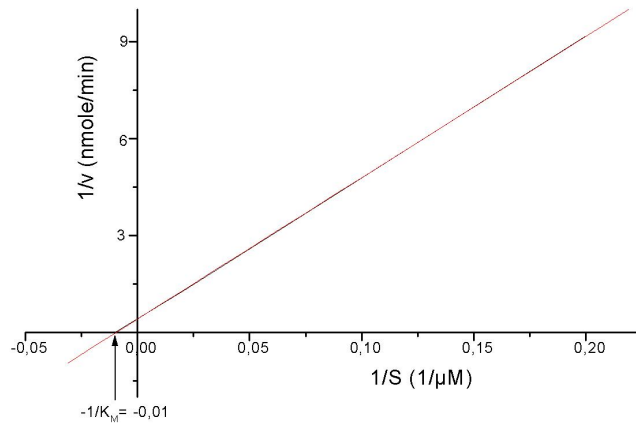


Abbildung 2.14 Bestimmung des K_M -Wertes des Klenow-Fragmentes in Lösung mittels Lineweaver-Burk-Plot. Das Substrat für das Enzym ist das Nukleotid dTTP. Der K_M -Wert beträgt $100\mu\text{M}$.

2.4.5 Modifizierung der Sensoroberfläche

2.4.5.1 Gitterkoppler

Die notwendigen Schritte zur Präparierung der Sensoroberfläche werden in Abschnitt 2.2 beschrieben.

2.4.5.2 BIAcore 2000

Für die Kopplung wurde Streptavidin in einer Konzentration von $0,5\text{ mg/ml}$ in 10 mM Natriumacetat-Puffer, pH 5 aufgenommen. Diese Stammlösung wurde dann für die einzelnen Versuchsschritte verdünnt. Der Prozedur der Immobilisierung ging eine

Aktivierung und Modifizierung der Oberfläche voraus. Die Reaktionstemperatur betrug 25°C.

Im ersten Schritt wurde die Oberfläche aktiviert, um die Bindung von Streptavidin zu ermöglichen. Dazu wurde 0,1 M NHS mit 0,4 M EDC im Verhältnis 1:1 vermischt und auf die Oberfläche gegeben. Nach diesem Aktivierungsschritt wurde Streptavidin in der Konzentration von 250 µg/ml auf die Oberfläche aufgebracht. Im Anschluss erfolgte die Deaktivierung der nicht abgesättigten Bindungsstellen durch 1 M Ethanolamin, pH 8.5.

Im Anschluss daran wurden die biotinylierten Primer über die Biotin-Streptavidin-Bindung auf der Oberfläche gekoppelt. Der biologische Aufbau wurde vervollständigt durch Hybridisierung des Templates an dem immobilisierten Primer.

2.4.6 Aktivitätsmessung auf der Oberfläche

2.4.6.1 Gitterkoppler

Nach der Beschichtung der Oberflächen mit Streptavidin wurden im nächsten Schritt die Oligonukleotide immobilisiert. Die Fließrate betrug in allen Versuchen 10 µl/min und alle Reaktionen wurden bei einer Reaktionstemperatur von 25°C durchgeführt.

Durch die Wechselwirkung mit der Streptavidin-modifizierten Oberfläche erfolgte die Immobilisierung des Biotin-markierten Primers. Dieser wurde in einer Konzentration von 1 µM in der Reaktionslösung auf die Oberfläche gegeben. Der Aufbau des biologischen Systems wurde komplementiert durch die Hybridisierung des Primers mit dem Template-Strang, dessen Konzentration in Reaktionslösung ebenfalls 1 µM betrug.

Das Klenow-Fragment wurde in einer Menge von 500 U/ml über die Oberfläche geleitet. Zunächst wurde das Enzym im Reaktionspuffer gelöst und ohne Nukleotide auf der Oberfläche eingesetzt. Danach wurde das Dissoziationsverhalten des Enzyms beobachtet, indem man reinen Laufpuffer über einen längeren Zeitraum hinzugab. Innerhalb dieses Reaktionsabschnittes wurde dTTP in einer Konzentration von 1 mM hinzugegeben. Die gemessenen Brechungsindex-Änderungen wurden umgerechnet in Oberflächenbeladung Γ ($\Gamma = 3000 \times \Delta N_{\text{eff}} (\times 10^{-6}) \text{ ng/mm}^2$), (Tiefenthaler et al., 1992). Die enzymatische Reaktion wurde anschließend gestartet,

indem Enzym und Nukleotide zeitgleich zugegeben wurden. Gestoppt wurde die Reaktion durch Umschalten auf Laufpuffer. Das Enzym dissoziiert von der Oberfläche. Zurück bleibt nur die immobilisierte DNA, die mit den vom Klenow eingebauten Nukleotiden verlängert wurde.

2.4.6.2 BIACore 2000

Die Versuchsreihe begann mit der bereits beschriebenen Oberflächenpräparierung der Chips, beschrieben in Abschnitt 2.4.5.2.

Nach der chemischen Modifizierung erfolgte die Immobilisierung der Oligonukleotide auf der Oberfläche. Die Fließgeschwindigkeit betrug in allen Versuchen 5 µl/min und die Reaktionstemperatur betrug 25°C.

Die biotinylierte DNA wurde auf die Chipoberfläche immobilisiert und durch Zugabe des Template-Stranges bildete sich das DNA/DNA-Hybrid.

Darauf folgte die Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 37°C. Der Start der Messung der DNA-Enzym-Wechselwirkung erfolgte mit Zugabe eines Reaktionsgemisches bestehend aus Klenow⁺ (50 U/ml), dGTP (100 µM) und Puffer. Dies führte zur Anlagerung des Enzyms, ohne dass eine Strangverlängerung durch das Enzym eingeleitet wurde. Unmittelbar im Anschluss daran wurde die Base dGTP durch die Base dTTP in der gleichen Konzentration ersetzt. Damit wurde die Strangsynthese entlang des hybridisierten Template-Stranges gestartet.

Die Reaktion wurde durch Umschalten auf reinen Laufpuffer beendet.

Parallel zu den Aktivitätstests wurden verschiedene Kontrollen durchgeführt, um unspezifische Bindungen und Anlagerungen ausschließen zu können. Diese Kontrollen wurden zeitgleich in den verschiedenen Fließzellen des BIACore-Gerätes durchgeführt. Als Kontrolle wurden die jeweiligen Oberflächen unterschiedlich biologisch präpariert. Zum einen wurde ohne Template-Strang am immobilisierten Primer hybridisiert und zum anderen ohne Primer auf der Oberfläche immobilisiert. Bei den jeweiligen Versuchen wurde das Reaktionsgemisch hintereinander durch die verschiedenen Fließzellen geleitet und die unterschiedlichen Signalverläufe ausgewertet.

Die Syntheserate des Klenow⁺-Fragmentes wurde folgendermaßen berechnet:

Im ersten Schritt wird die Steigung des linearen Kurvenabschnittes bestimmt, der den Einbau der Nukleotide in den immobilisierten Strang beschreibt.

$$m = \text{Veränderung dRU/Zeit [RU/sec]} \quad 1)$$

Wobei **m** der Steigung und **RU** den Response Units entspricht. Neben der Steigung wird auch die gesamte Zunahme der Response Units über den gesamten Messzeitraum erfasst. Die Verwendung eines Oligonukleotides mit definierter Länge und definierter Sequenz als Template-Strang ermöglicht es, die maximale Anzahl der einzubauenden Nukleotide zu ermitteln und mittels dieses Wertes die Response Unit für ein Nukleotid zu bestimmen. In diesem Fall können 50 Nukleotide durch das Enzym eingebaut werden.

$$(RU_n - RU_{t_0}) / 50 \quad [RU/NT] \quad 2)$$

Hierbei entspricht **RU_n** dem Wert, an dem die Messung durch Umschalten auf Laufpuffer beendet wurde und **RU_{t₀}** dem Startwert der Messung. Durch Gleichung **1)** und **2)** wird die allgemeine Synthesegeschwindigkeit berechnet.

Parallel zu diesem Wert wird die Menge des am Primer-Template-Hybrid gebundenem Enzym bestimmt. Dieser Parameter ermöglicht es, anschließend die spezifische Syntheserate zu ermitteln.

2.5 Aktivitätsmessung des Enzyms Telomerase

2.5.1 Puffer

Der Reaktions-Puffer bestand aus 200 mM Tris-HCl, pH 8,3; 15 mM MgCl₂; 630 mM KCl; 0.5% Tween 20 und 10 mM EGTA (Ethylen Glycol-bis (β-aminoethyl Ethen) N,N,N',N'-Tetraessigsäure). Alle Experimente, sowohl die Aktivitätsbestimmungen in Lösung als auch auf der Sensoroberfläche, wurden mit autoklavierten und filtrierten Puffern durchgeführt.

Für die Aktivitätsmessung mussten die HL60-Zellen aufgeschlossen, d.h. lysiert, werden. Der dazu benötigte Lyse-Puffer bestand aus 0,5% 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylamino]propansulfonat(CHAPS), 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 5 mM Mercaptoethanol, 0,1 mM Benzamidin, 10 % Glycerol.

2.5.2 Oligonukleotide und Nukleotide

Alle Oligonukleotide wurden synthetisiert und HPLC-gereinigt von der Firma BioTez bezogen (Berlin-Buch, Deutschland). Die Oligonukleotide wurden in sterilem und filtriertem Wasser suspendiert und bei -20°C aufbewahrt. Die Konzentration dieser Stammlösung betrug jeweils 500 µM und wurde photometrisch bei der Wellenlänge 260 nm überprüft. Die Arbeitskonzentrationen betrug 1 µM verdünnt.

Bei der Verwendung der Oligonukleotide wurde nach dem jeweiligen Messverfahren unterschieden. Einige der verwendeten Oligonukleotide unterscheiden sich durch chemische Modifizierungen. Darunter fallen die phosphothioat-modifizierten Oligomere und die Peptid-Nukleinsäure (Peptide Nucleic Acid, PNA). Die Struktur dieser Moleküle ist in Abbildung 2.15 dargestellt.

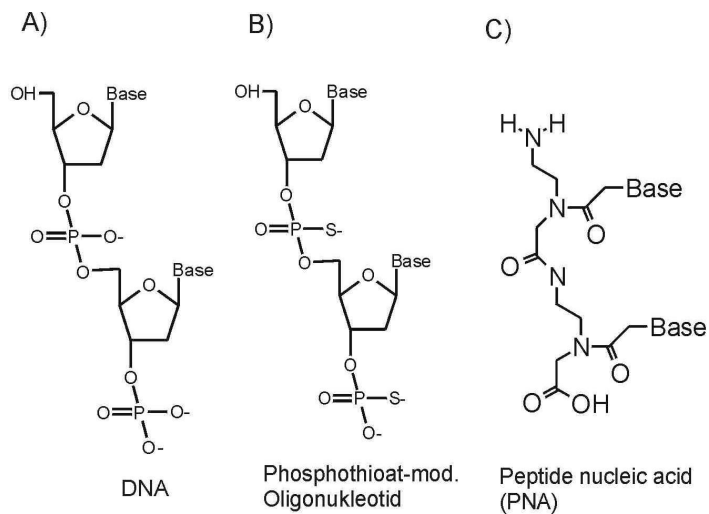


Abbildung 2.15 Darstellung der chemischen Strukturen von DNA (A), phosphothioat(PS)-modifizierter DNA (B) und Peptidnucleinsäure (C)

Der Unterschied zwischen nicht-modifizierten Nucleinsäuren (A) und phosphothioat-modifizierten Nucleinsäuren (B) liegt in dem Austausch des Sauerstoffatoms durch ein Schwefelatom. Die PNA (C) besitzt ein ungeladenes Rückgrat basierend auf einer Peptidbindung.

Bei den Versuchen am Gitterkoppler wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

A) immobilisierte DNA:

5'-p-TGT CCA GGC AGG TAG ATG ACG ACC-3'

B) Linker-DNA:

5'-GAT GGA TGA AAG GGT CGT CAT CTA-3'

C) PS-mod-Oligo:

5'-p-CTT TCA TCC ATC CTT ATC CTT TCA TCC ATC ATT CCG CCG TCG AGC
AGA GTT-3' (unterstrichene Primer Sequenz ist PS-modifiziert)

Die PNA wurde in der Gruppe von Prof. Bienert, Forschungs-Institut für molekulare Pharmakologie (FMP, Berlin-Buch) synthetisiert. Die Sequenz lautete:

PNA:(komplementär zu RNA-Komponente der Telomerase)

5'-G TTA GGG TTA GGG-Lys-NH₂-3'

Bei den Messungen der Aktivität der Telomerase an der optischen Faser wurden folgende Sequenzen verwendet:

PS-mod-Oligo:

5'-p-CTT TCA TCC ATC CTT ATC CTT TCA TCC ATC ATT CCG CCG TCG AGC
AGA GTT-3' (unterstrichene Primer Sequenz ist PS-modifiziert)

FITC-gelabelte DNA-Sonde: (komplementär zur enzymatisch verlängerten Strangsequenz)

FITC-5'-(CCAATC)₄-3'

Die unmarkierten Nukleotide (dNTP, Pharmacia, Schweden) lagen ebenfalls in Wasser gelöst, in einer Stammkonzentration von 100 mM vor und wurden mit Hilfe des Reaktionspuffers jeweils für die einzelnen Versuchsschritte verdünnt.

Im Rahmen der Messungen an der optischen Faser wurden Fluoresceinisothiocyanat-markierte Nukleotide, FITC-dUTP's, verwendet (Amersham, Life Science, Braunschweig). Sie lagen in einer Konzentration von 1 M vor und wurden bei -20°C gelagert. Sie wurden vor dem Experiment mit Wasser auf die jeweiligen Konzentrationen verdünnt.

Bei den Aktivitätsmessungen in Lösung wurden radioaktiv-markierte Nukleotide verwendet. Die ³HdTTP-Nukleotide (Amersham, Braunschweig, Deutschland) lagen in einer Konzentration von 200 µCi vor als [Methyl-3H]-thymidin 5'-Triphosphat-NH₄-Salz gelöst in einem Ethanol/Wasser-Gemisch im Verhältnis 1:1(v/v). Diese markierten Nukleotide lagen im Reaktionsmix in einer Aktivität von 1 µCi vor.

2.5.3 Enzym Telomerase

Telomere sind die Endbereiche der Chromosomen, die in normal-wachsenden Zellen nicht repliziert werden. Die Aufgabe dieser DNA-Sequenzen besteht darin, die Chromosomen vor End-to-end-Fusionen, Abbau und Verlusten durch falsche Chromosomenpaarung nach Zellteilung zu schützen (Greider et al., 1996); (Greider, 1998). Außerdem spielen sie eine wesentliche Rolle bei der Initiation der DNA-Replikation bei der Zellteilung. Verkürzte und beschädigte Telomere werden von der Zelle erkannt und führen zur Aktivierung des SOS-Systems der Zelle. Telomere sind einzelsträngige sich wiederholende DNA-Sequenzen von kurzen Guanosin-reichen Hexameren, die z.B. beim Menschen mit bis zu 200 Wiederholungen auftreten (Greider et al., 1996). Die Länge dieser Telomere in normalen menschlichen Zellen variiert von 7-13 kilo-Basen (Sharma et al., 1997).

Bei früheren Untersuchungen wurde bereits erkannt, dass bei allen Zellteilungen die Anzahl der Wiederholungen durch ausbleibende Synthese kontinuierlich abnimmt, bis eine kritische Länge von 1-2 kb (Sidorov et al., 2003) unterschritten wird. Dieser Vorgang entspricht dem regulären Alterungsprozess bei Vielzeller-Organismen (Prescott et al., 1999). Allerdings muss es einen der Abnahme der Telomere gegensteuernden Mechanismus geben, vor allem bei Keimbahnzellen, da sonst diese Organismen schon ausgestorben wären (Greider, 1996). DNA-Synthese wird von den DNA-Polymerasen (α , δ , ϵ) durchgeführt. Diese können die einzelsträngigen Telomere nicht verlängern, da sie einen Matrizenstrang als Vorlage benötigen.

Das Ribonukleoprotein Telomerase erfüllt die Aufgabe der Verlängerung der Telomere (Morin, 1989). Ein Ribonukleinsäure-Molekül, RNA, das in der Telomerase vorliegt, dient als Matrizenstrang für die Synthese. Dazu lagert sich das Enzym an das Ende eines Telomer-DNA-Stranges an und fügt passende Nukleotide an die Telomere. Nach Auffüllen eines 6-mers wandert die Telomerase an diesem Strang bis an das Ende weiter und setzt dort die Synthese fort (Abbildung 2.16).

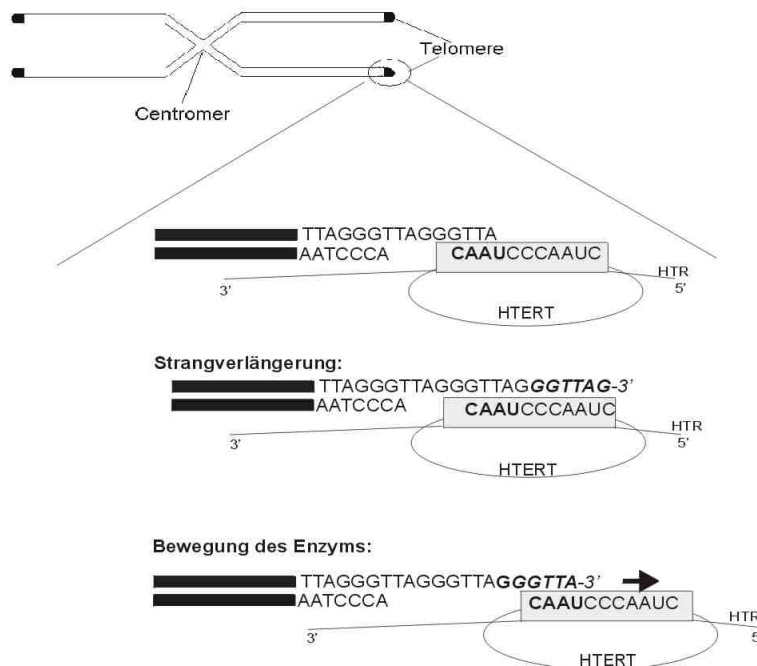


Abbildung 2.16 Reaktionsmechanismus der Telomerase. Verlängerung der Telomere durch Hinzufügen passender Nukleotide mit Hilfe der RNA (Humane Telomeric RNA, HTR) als Matrizenstrang. Anschließend wandert das Enzym bis an das Ende des nun verlängerten Telomers und setzt dort den Synthesevorgang weiter fort.

Das Enzym besteht aus 2 Proteinuntereinheiten, ein 123 kDa und ein 42 kDa großes Protein (Cech, 2000). Daneben wurde entdeckt, dass die Telomerase nur im Beisein der RNA aktiv ist (Beatti et al., 1998), (Weinrich et al., 1997). Weitere Untersuchungen ergaben, dass das größere Protein für die Synthese der Telomere verantwortlich ist. Die RNA-Untereinheit wurde auch in Zellen gefunden, die keine Telomeraseaktivität aufwiesen. Nach Hinzufügen der Protein-Komponenten der Telomerase wurde Telomerase-Aktivität beobachtet (Nakamura et al., 1997), Meyerson et al., 1997), (Cech, 2000).

Dieser Mechanismus der Induktion der Telomeraseaktivität wird auch im Zusammenhang mit Krebsentstehung und –entwicklung beschrieben. So wird in 90% aller Tumore eine erhöhte Telomeraseaktivität beobachtet (Cech, 2000), die unkontrolliertes Wachstum und Unsterblichkeit der Zellen bedeutet. Hier wird die Verringerung der Telomere bei der Zellteilung und somit der Alterungsprozess verhindert (Greider 1996).

2.5.4 Herstellung des Zellextraktes der HL60 Zellen

Die HL60 Zellen sind eine Tumorzell-Linie, die bevorzugt als Modell-System für die Entwicklung von Zytostatika eingesetzt wird.

- HL60 Zellen sind lymphoblasten-ähnliche promyelocytische menschliche Tumorzellen, die u. a. aufbewahrt werden in der American Type Culture Collection (ATCC, Nr.: CCL-240, Manassas, USA). Die Tumorart ist Leukämie.

Die Versorgung dieser Zell-Linie erforderte ein zweimaliges Wechseln des RPMI-Mediums (Roswell-Park-Memorial-Institute) pro Woche. Dieses ist angereichert mit 10% fötalem Kälberserum, 2mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Die Kultivierung wurde bei einer Temperatur von 37°C und 5% CO₂ durchgeführt. Alle Kulturen wurden regelmäßig auf Mycoplasmen untersucht. Diese zellwandlosen Prokaryoten sind häufig auftretende Kontaminanten in Gewebekulturen und wirken als Schmarotzer sowie auch als Erreger vieler Krankheiten wie z.B. Lungenseuche bei Rindern.

Die Herstellung des Zellextraktes der telomerasehaltigen Zellen HL60 begann mit zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS-Puffer. Zum Lysieren der Zellen wurden 10⁵ –10⁶ Zellen in 200 µl Lyse-Puffer resuspendiert. Diese Suspension wurde für 30 min. auf Eis gestellt und mehrfach durchmischt.

Im Anschluss daran wurde die lysierte Zellsuspension mit 100.000g zentrifugiert, um eine erfolgreiche Abtrennung der Zellreste von den wasserlöslichen Zellkomponenten wie z.B. der Telomerase zu erhalten. Der erhaltene Überstand wurde verdünnt auf eine Zellmenge von 10⁶ Zelläquivalente/ml, aliquotiert und bei –80°C aufbewahrt. Dabei spielte weniger die Temperatur eine Rolle. Wichtig ist in diesem Präparationsschritt nur das Schockgefrieren der Proben. Danach konnten die Proben auch bei –20°C aufbewahrt werden. Nach einmaligem Auftauen mussten die Proben verbraucht werden, da mehrfaches Einfrieren und Auftauen zur Inaktivierung der Telomerase führt.

Da sich neben der Telomerase auch andere wasserlösliche Proteine im gewonnenen Überstand befanden, konnte die Konzentration der Telomerase nicht genau bestimmt werden. Um aber bei den nachfolgenden Aktivitätsmessungen eine Relation zwischen der eingesetzten Proteinmenge und den erhaltenen Signalen herstellen zu können, wurde die Gesamtproteinmenge im Überstand bestimmt. Diese betrug

durchschnittlich 40-60 µg/µl und wurde photometrisch durch die Bradford-Methode (Bradford, 1976) mit Hilfe eines Kits der Firma Bio-Rad bestimmt.

2.5.5 TRAP Assay

Die zur Zeit anerkannte Methode, die Aktivität der Telomerase zu messen, bietet der TRAP-Test (telomeric repeat amplification protocol) der Firma Oncor (USA), der auf Arbeiten von Kim und Wright beruht (Kim et al., 1994); (Wright et al., 1995). Durch Einsatz von Radionukleotiden und eines PCR-Schrittes ist eine sensitive Methode entstanden. Zur Verifizierung der Ergebnisse der Messungen an den optischen Sensoren wurde auf diese Methode zurückgegriffen.

Die radioaktiv-markierten Nukleotide wurden von Amersham bezogen.

Die quantitative Auswertung des TRAP-Tests erfolgte durch den Vergleich der verschiedenen Intensitäten einzelner Gelbahnen mit der 0-Probe anhand von TINA 2.08 image software (Raytest, Straubenhardt, USA).

2.5.6 Messungen der Telomeraseaktivität auf der Oberfläche

Die Messungen auf der Oberfläche der optischen Sensoren erfolgte bei einer Fließgeschwindigkeit von 30 µl/min. Die Temperaturführung war abhängig von dem jeweiligen Messgerät. So betrug die Reaktionstemperatur bei allen Versuchen am Gitterkoppler 25°C, während an der optischen Faser die Versuche bei 30°C durchgeführt wurden.

Die Messungen am Gitterkoppler verliefen nach folgendem Schema: Im ersten Schritt wurde das telomerasehaltige Zellextrakt kontinuierlich über die Sensoroberfläche geleitet. Damit wurde erreicht, dass alle Bindungsstellen auf der Oberfläche besetzt wurden. Nach Erreichen des Bindungsgleichgewichtes wurde das Reaktionsgemisch, das nur aus Reaktionspuffer und dem Zellextrakt bestand (10^5 Zellen/ml) durch 100 µM der Nukleotide dATP, dGTP und dTTP ergänzt. Damit wurde die enzymatische Strangverlängerung initiiert.

Diese wurde dann durch Ersetzen des Reaktionsgemisches durch Reaktionspuffer gestoppt. Anschließend wurde die Oberfläche durch Zugabe von Proteinase K von

Proteinkomponenten des Zellextraktes gereinigt. Auf der Oberfläche bleibt nur der immobilisierte, verlängerte Strang.

Die faseroptischen Messungen begannen gleich mit der Zugabe des gesamten Reaktionsgemisches, da die isolierte Anlagerung des ungelabelten Enzyms nicht beobachtet werden konnte. Durch Zugabe von 100 nM FITC-gelabelten dUTPs in den Reaktionsmix sollte die Strangverlängerung durch die Telomerase durch Einbau der markierten Nukleotide direkt beobachtet werden.

Analog zu den Versuchen am Gitterkoppler erfolgte das Stoppen der Synthesereaktion und das Reinigen der Sensoroberfläche von Protein.

Ein weiterer Nachweis für die Aktivität erfolgte durch die anschließende Hybridisierung mit einem FITC-markierten Oligomer.

2.5.7 Induzierung der NIH 3T3-Zellen durch das Kanzerogen N-Nitroso-N-Methylharnstoff

Nach dem Aufbau eines geeigneten Testsystems sollte dessen Effizienz auch an anderen Zell-Linien getestet werden. Dabei spielte die Auswahl der Zellen eine wichtige Rolle.

Bei der Wahl der Zell-Linie, sollten mehrere Punkte beachtet werden:

Einerseits sollte keine Telomeraseaktivität oder nur in geringem Maße vorhanden sein, andererseits sollte aber durch die Zugabe kanzerogener Substanzen ein Anstieg der Telomeraseaktivität nachweisbar sein. Zusätzlich sollte die Induktion der Telomeraseaktivität durch die Testsubstanz in einem vertretbaren Zeitraum erfolgen.

Es wurden folgende Zellen ausgewählt und getestet:

- NIH 3T3 Zellen sind eine permanente Fibroblastenzell-Linie, aus der American Type Culture Collection (ATCC, Nr.: CRL-1658, Manassas, USA)

Bei dieser Zell-Linie handelt es sich um permanente Fibroblastenzellen, die aus dem embryonalen Gewebe der Spezies Maus (*Swiss albino mouse*) gewonnen wurden. Sie werden überwiegend bei der Studie von Transformationsvorgängen und von Transfektionen durch DNA-Viren (Copeland et al., 1979) verwendet.

Da sie die Voraussetzung mitbringen, ein gutes Proliferationsverhalten aber keine Telomeraseaktivität vorzuweisen, eignen sie sich für Versuche, bei denen die Kanzerogenität von Substanzen durch Anstieg der Telomeraseaktivität nachgewiesen werden soll.

Die Kultivierung der Zellen verlief nach einem Protokoll der Firma Celltrend (Luckenwalde, Deutschland). Die Zellen wurden zunächst in 96-Well-Microtiterplatten (Firma Costar, USA) kultiviert. Als Medium wurde RPMI 1640 der Firma Invitrogen-Cooperation (USA) verwendet, versetzt mit 10% fötalem Kälberserum. Bei Erreichen einer Zellzahl von 50.000 Zellen/ml wurden die Zellen trypsiniert und anschliessend mit CHAPS-Lysepuffer lysiert. Nach mehrmaligem Zentrifugieren bei 1250 rpm und Waschen der Pellets mit PBS wurden das gewonnene Zellextrakt schockgefroren und auf Trockeneis gelagert bis es für die Aktivitätsmessungen aufgetaut wurde.

Die Induktion wurde durch ein chemisches Kanzerogen eingeleitet. Kanzerogene werden aufgrund ihrer chemischen und biologischen Wirkung grundsätzlich in zwei Gruppen unterschieden: DNA-reaktive, genotoxische Substanzen und epigenetische, nicht-genotoxische Substanzen. Die erste Gruppe interagiert mit zellulären Makromolekülen, insbesondere der DNA, und ist mutagen wirksam. Dazu gehören u.a. Nitrosamide, Nitrosoharnstoffe und polycyclische Kohlenwasserstoffe. Stoffe der zweiten Gruppe sind krebserregende Substanzen, für die eine DNA-Reaktion nicht nachweisbar ist. Sie besitzen andere biologische Wirkungen für ihre Kanzerogenität wie z.B. Cytotoxizität und chronische Entzündungsreaktionen. Darunter fallen Stoffe wie Nitrilotriazetat, chlorierte Kohlenwasserstoffe oder auch Hormone wie Östradiol und Festkörper wie Asbest.

Es wurde das direkte Kanzerogen N-Nitroso-N-Methylharnstoff (Abbildung 2.17) ausgewählt.

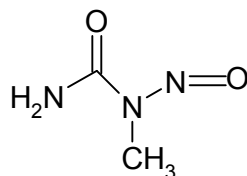


Abbildung 2.17 Struktur des Kanzerogens N-Nitroso-N-Methylharnstoff

Diese Substanz gehört zu den direkten, ultimativen Kanzerogenen, die in wässriger Lösung in reaktive Methyl-Kationen zerfallen und mit der DNA interagieren. Dies führt zu einer strukturellen und funktionellen Veränderung der DNA durch die Methylierung von DNA-Basen, wie Guanin, Cytosin und Adenin. Dieser Vorgang wird als DNA-Addukt-Bildung bezeichnet, die zur Hemmung der DNA-Synthese, Zelltod und vor allem zu Mutagenese und maligner Transformation führt (Frimme, 1986).

Die Induzierung der Zellen erfolgte, indem diese Substanz (200 ng/ml) dem Kulturmedium (RPMI + 10%FCS) beigefügt wurde. Diese Ansätze wurden 12 h im Brutschrank bei 37°C/5% CO₂ inkubiert und dann ebenfalls lysiert.

3. Ergebnisse

3.1 Aktivitätsmessung von Restriktionsendonukleasen im Microarray am Beispiel von *EcoRI*

Für Bindungsexperimente werden heute überwiegend Mikroarrays eingesetzt. Mit einem Fluidik-Scanner können auch enzymatische Reaktionen im Mikroarrayformat untersucht werden.

3.1.1 Qualitative Analyse

Bei der Zugabe der FITC-markierten Oligomere erwies es sich als Vorteil, die unterschiedlichen Oligonukleotide nacheinander auf die Oberfläche zu geben. Dadurch konnte die Hybridisierung direkt in den einzelnen Spots beobachtet werden. In Abbildung 3.1 werden die einzelnen Schritte der Versuchsdurchführung beschrieben, wie sie in jedem Spot des Arrays ablaufen, sofern der komplementäre Strang mit der Erkennungssequenz vorliegt.

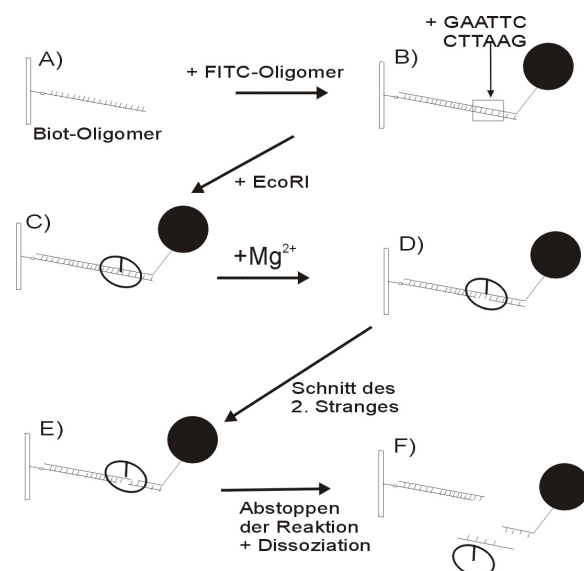


Abbildung 3.1 Messung der *EcoRI*-Kinetik auf der Chipoberfläche im DNA-Scanner
A) Immobilisierung des biotinylierten Oligomers auf der Streptavidin-modifizierten Oberfläche
B) Hybridisierung des FITC-markierten komplementären Gegenstrangs
C) Bindung von *EcoRI*
D) Reaktionsbeginn des enzymatischen Verdaus durch Zugabe des Kofaktors Mg^{2+}
E) Sequentielles Schneiden des DNA-Stranges durch *EcoRI*
F) Dissoziation der geschnittenen und markierten Oligomere und des Enzyms

Nach der Immobilisierung (A) des ersten DNA-Stranges über Biotin-Avidin-Kopplung wird der FITC-markierte Gegenstrang auf die Oberfläche gegeben und es bildet sich der Doppelstrang (B). An diesen bindet sich das Enzym (C), wobei in dieser Phase der Kofaktor nicht in der Lösung präsent ist. Daher wird der Verdau noch nicht begonnen. Die enzymatische Reaktion wird eingeleitet durch Zugabe des Kofaktors Mg^{2+} (D). Die beiden Stränge werden enzymatisch geschnitten (E). Durch das Schneiden und die gleichzeitige Dissoziation der markierten geschnittenen Stränge nimmt die Intensität der Fluoreszenz ab (F).

Abbildung 3.2 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Hybridisierungsreaktion und der nachfolgenden enzymatischen Reaktion an immobilisierten DNA-Substraten auf der Chipoberfläche. Dabei werden die Ergebnisse verschiedener Spots miteinander verglichen, die sich in der immobilisierten Komponente unterscheiden.

In Abbildung 3.2a, wird der Versuchsablauf in einem Spot dargestellt, in dem die DNA 1_{immob} immobilisiert wurde, die aufgrund ihrer Sequenz von *EcoRI* geschnitten werden kann. Dann wird das markierte Oligonukleotid hinzugegeben. Nach Entfernen der nicht-gebundenen markierten Oligomere verdeutlicht der Vergleich der Signalintensitäten vor und nach der Hybridisierung die erfolgreich verlaufende Bindung der einzelnen Stränge (Pfeil). Die nicht-komplementäre DNA 3_{FITC} bindet nicht an das immobilisierte Oligomer. Im Anschluss daran wurde das Enzym auf die Oberfläche gegeben. Der Start der enzymatischen Reaktion erfolgte durch Zugabe des Kofaktors Mg^{2+} . Durch den Verdau der immobilisierten DNA wird der markierte Strang von der Oberfläche entfernt und die Intensität des Signals nimmt ab (Zoom).

In Abb. 3.2b wird der Reaktionsverlauf in einem Spot dargestellt, in dem die DNA 3_{immob} immobilisiert vorliegt, die nicht von dem Enzym geschnitten wird. DNA 3_{FITC} bindet an dem immobilisierten Oligomer, was durch den Anstieg des Signalniveaus zu erkennen ist (Pfeil). Die DNA 1_{FITC} bindet nicht. Dabei zeigt dieses Ergebnis deutlich, dass nicht-komplementäre DNA-Stränge keinerlei unspezifische Bindung eingehen. Nach Zugabe des Kofaktors Mg^{2+} bleibt die Fluoreszenzintensität konstant, da das immobilisierte Hybrid DNA 3_{immob} :DNA 3_{FITC} durch *EcoRI* aufgrund des Fehlens der spezifischen Schnittsequenz (Zoom) nicht geschnitten werden kann.

Abschließend wird in Abb. 3.2c der Reaktionsverlauf am immobilisierten FITC-Konjugat dargestellt, das aus FITC und Biotin besteht. Die in diesem Spot ablaufende Reaktion dient als Kontrollmessung, um unspezifische Wechselwirkungen der Oligomere auszuschließen. Es werden weder unspezifische

Bindungsvorgänge zwischen den markierten DNA-Strängen und dem Konjugat noch eine enzymatische Reaktion (Zoom) beobachtet.

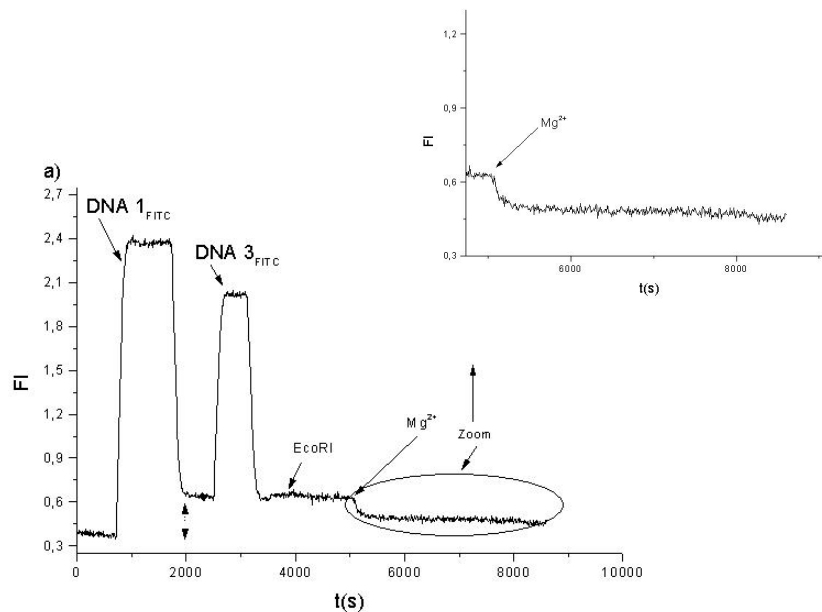


Abbildung 3.2a) *EcoRI*-Kinetik-Messkurven in unterschiedlichen Spots im Mikroarray. DNA1_{FITC} hybridisiert an der komplementären DNA 1_{immob}, was zu einem Anstieg des Signalniveaus führt (Pfeil). DNA 3_{FITC} hybridisiert nicht an der immobilisierten DNA. Nach Zugabe des Enzyms wird die enzymatische Reaktion durch den Kofaktor Mg²⁺ gestartet. Durch den Verdau der DNA wird der markierte Strang von der Oberfläche entfernt und führt zu einer Abnahme der Signalhöhe (Zoom).

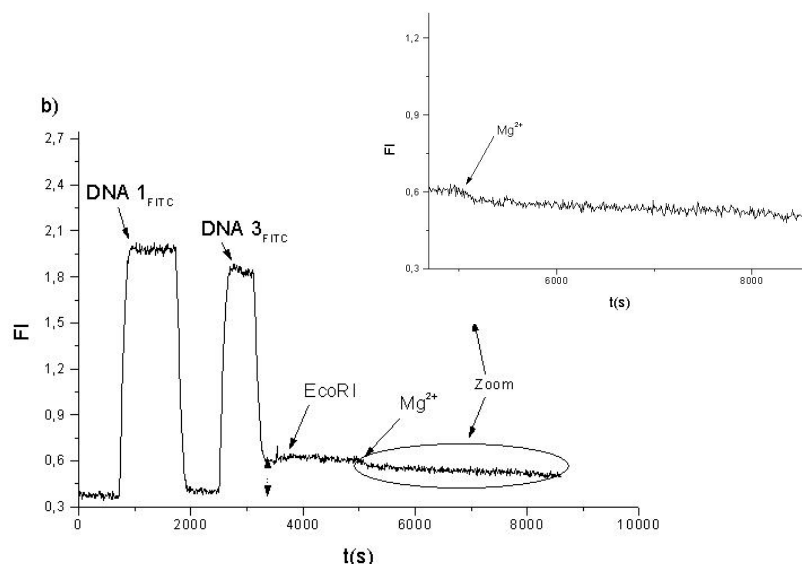


Abbildung 3.2b) *EcoRI*-Kinetik-Messkurven in unterschiedlichen Spots im Mikroarray. DNA1_{FITC} hybridisiert nicht an die DNA 3_{immob}. Bei der DNA 3_{FITC} wird durch den Anstieg des Signalniveaus nach der Zugabe der markierten DNA die Hybridisierung beobachtet (Pfeil). Die enzymatische Reaktion, gestartet durch den Kofaktor Mg²⁺, führt nicht zu einem Abfall des Signals. Das Hybrid DNA 3_{immob}:DNA 3_{FITC} wird nicht von *EcoRI* verdaut, da die Schnittsequenz nicht vorhanden ist.

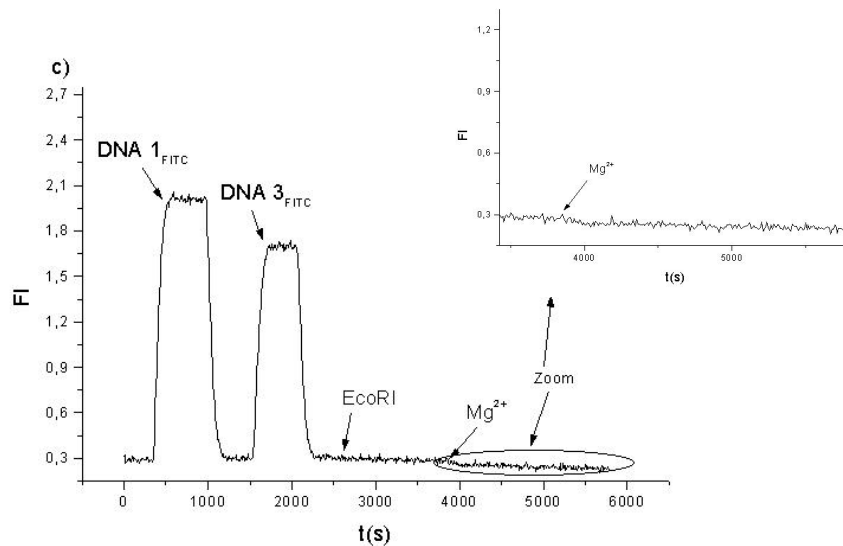


Abbildung 3.2c) *EcoRI*-Kinetik-Messkurven in unterschiedlichen Spots im Mikroarray. In diesem Spot ist das FITC-Konjugat (FITC+Biotin) auf der Oberfläche gekoppelt. Es wird keine Hybridisierungsreaktion zwischen den beiden markierten Oligomeren und dem immobilisierten Konjugat beobachtet. Daneben ist auch keine enzymatische Reaktion zu beobachten (Zoom).

Das Array, das den Ergebnissen in den Abbildungen 3.2a-c zugrunde liegt, wurde mit dem Nanoplotter hergestellt. Zum Vergleich der Effektivität der unterschiedlichen Plottetechniken und deren Einfluss auf den Verlauf der *EcoRI*-Kinetiken auf dem Chip wurden mit dem Kontaktprinthead ebenfalls die Chips für die Messungen hergestellt. Das geplottete Array und die Anordnung der unterschiedlichen Oligomere entsprachen den vorherigen Versuchen.

Abbildung 3.3 vergleicht den Reaktionsverlauf aus 2 Spots, in denen DNA 1_{immob} und DNA 3_{immob} auf der Chipoberfläche immobilisiert vorlagen. Dabei werden zu denen in Abbildungen 3.2a-c identische Messsignale beobachtet. Die DNA 1_{FITC}, die von *EcoRI* verdaut werden kann, hybridisiert mit seinem Komplementär DNA 1_{immob}, während keinerlei Bindungssignal bei der Zugabe der DNA 3_{FITC} in diesem Spot beobachtet wird (□). In diesem Spot wird nach Zugabe des Kofaktors Mg²⁺ die durch den enzymatischen Verdau der DNA hervorgerufene Intensitätsabnahme deutlich sichtbar (Zoom). In dem Spot, in dem DNA 3_{immob} vorliegt, wird nur der Bindungsvorgang von DNA 3_{FITC} beobachtet, die im Anschluss an die Hybridisierung nach Zugabe von Mg²⁺ nicht geschnitten wird (o).

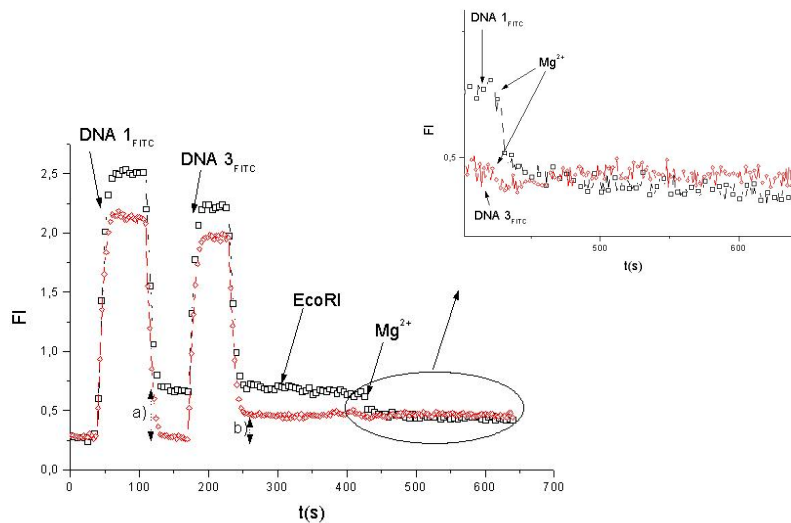


Abbildung 3.3 EcoRI-Kinetik-Messkurven in unterschiedlichen Spots im Mikroarray. Im Zoom wird der Verlauf der Messkurven an DNA 1_{immob}:DNA 1_{FITC} (□) und DNA 3_{immob}:DNA 3_{FITC}(o) gegenübergestellt und die enzymatische Reaktion dargestellt.

- a) Bindung von DNA 1_{FITC} im Spot, in dem DNA 1_{immob} vorliegt und enzymatischer Verdau der immobilisierten DNA 1, welche die Schnittsequenz von EcoRI trägt (□)
- b) Bindung von DNA 3_{FITC} im Spot, in dem DNA 3_{immob} vorliegt, die aufgrund der Sequenz nicht von EcoRI geschnitten wird (o).

Die Auswertung der einzelnen Messkurven ergibt, dass unabhängig von der Printmethode identische Ergebnisse erzielt werden. Darüberhinaus werden unspezifische Wechselwirkungen nicht-komplementärer Oligomere in den verschiedenen Spots nicht beobachtet, wie auch Staraktivität der Restriktionsendonuklease unbeobachtet bleibt. Unter dem Begriff der Staraktivität versteht man die Aktivität einer Restriktionsendonuklease an einer DNA mit einer veränderten Base im Schnittbereich.

In den Abbildungen 3.2 und 3.3 werden exemplarische ausgewählte Messkurven dargestellt, um das in 3.1 beschriebene Schema mit den experimentell gewonnenen Daten zu verifizieren. Der Vorteil von Mikroarrays liegt neben der hohen Anzahl von simultan durchgeführten Parallelmessungen auch in der schnellen Datenerfassung und –auswertung. Neben der graphischen Auswertung ermöglichen Bildaufnahmen der Arrays zu verschiedenen Zeitpunkten auch, den Reaktionsverlauf zu beobachten und die einzelnen Spots zu identifizieren.

Abbildung 3.4A zeigt ein Mikroarray im 6x11-Format zu dem Zeitpunkt, an dem alle FITC-markierten Oligomere auf der Oberfläche in den einzelnen Spots hybridisiert

sind und das unmarkierte Enzym an den doppelsträngigen immobilisierten Oligonukleotiden gebunden vorliegt. Den nächsten Reaktionsschritt stellt die Zugabe des Kofaktors Mg^{2+} dar, der den Start der enzymatischen Reaktion beschreibt (3.4B).

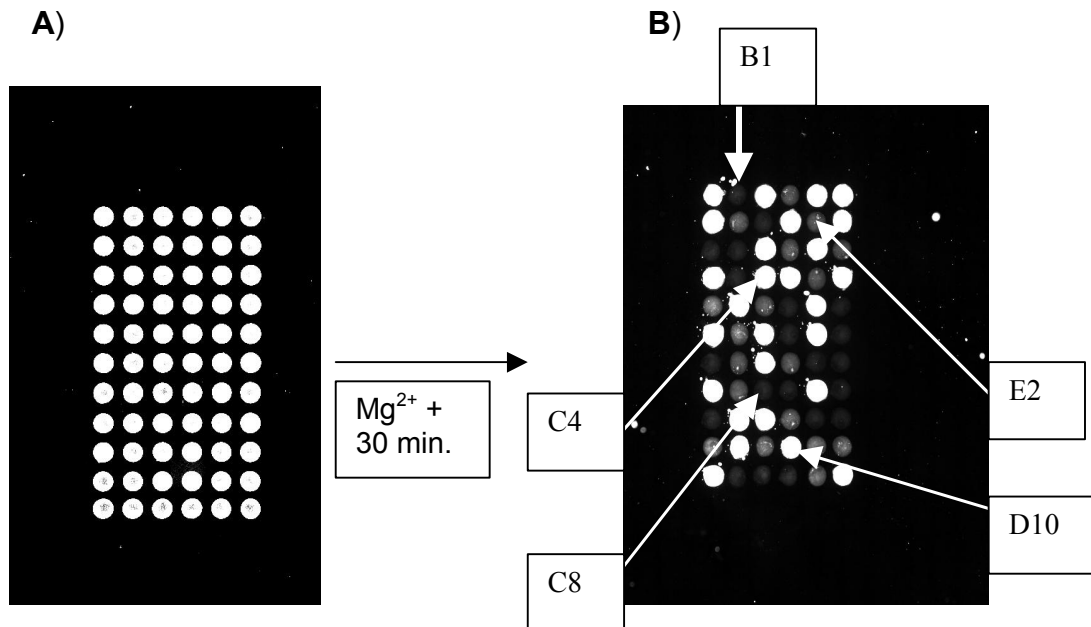


Abbildung 3.4 Bilddarstellung eines 6x11-Arrays mit FITC-markierten Oligomeren, die am jeweiligen immobilisierten komplementären Oligomer gebunden haben.

- A) Darstellung des Arrays nach Beendigung der Hybridisierung aller markierten Oligomere in den einzelnen Spots und Bindung des unmarkierten Enzyms an die DNA.
- B) Darstellung des Arrays nach Ablauf der enzymatischen Reaktion. Die Signalintensität ist in den Spots konstant geblieben, in denen DNA 3 vorlag (z.B. **Spot C4, Spot D10**), die nicht die *EcoRI*-Binde- und Schnittsequenz enthält, während die DNA 1 (**Spot B1**) und DNA 2 (**Spot C8, Spot E2**) eindeutig geschnitten wurden und durch das Entfernen der markierten Stränge die Intensität reduziert wurde.

Deutlich wird in den beiden Abbildungen sichtbar, wie die Signalintensitäten sich nach Start der enzymatischen Reaktion verändert haben. Dabei lässt sich das Muster und die Position der getropften Oligonukleotide erkennen, die eine Identifizierung dieser erlaubt. Die Spots mit der immobilisierten DNA 1 und DNA 2 unterscheiden sich in ihren Intensitäten deutlich von den Spots mit der immobilisierten DNA 3 und dem FITC-Konjugat. Bei den erst genannten ist nach enzymatischem Verdau keine markierte DNA zu erkennen, während bei den letzten keine DNA verdaut wurde und zur Abnahme der Intensitäten geführt hätte. Eine quantitative Auswertung der Daten erhält man durch die Analyse der dynamischen Messungen, die in Abbildung 3.5 aus mehreren Spots zusammengefasst sind.

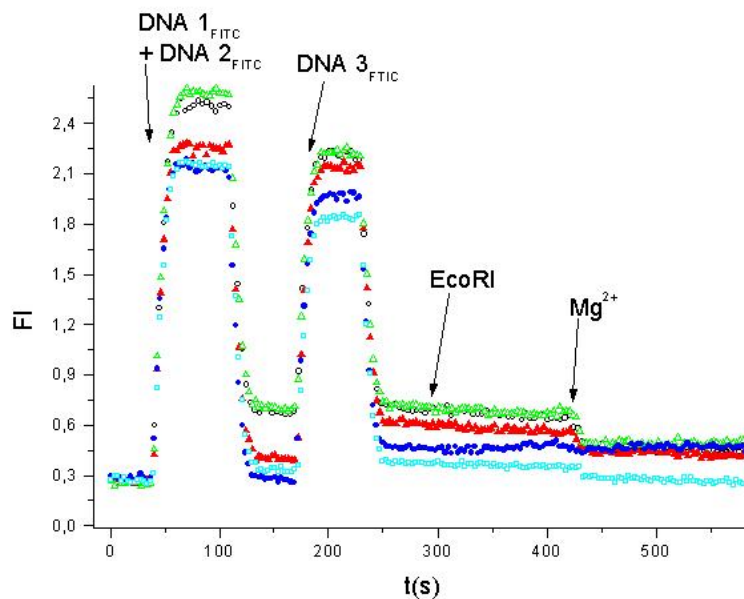


Abbildung 3.5 Vergleich der enzymatischen Kinetik von *EcoRI* in verschiedenen Spots im Mikroarray
 - *EcoRI*-Reaktion an DNA 1_{FITC} (Δ) in dem **Spot B1** und DNA 2_{FITC} (O, \blacktriangle) im **Spot E2** und **C8**
 - *EcoRI*-Reaktion an DNA 3_{FITC} in den Spots **D10** und **C4** (\bullet , \square)

In dem Spot B1 bindet die jeweilige komplementäre DNA, in diesem Fall DNA 1_{FITC} und in Spots E2 und C8 die DNA 2_{FITC}. In diesen Spots werden die Sequenzen im Verlauf des Experimentes durch das Enzym geschnitten, was in Abbildung 3.5 durch die starke Abnahme der Fluoreszenzintensität nach Zugabe des Kofaktors bestätigt wird. Analog dazu sieht man das Ende der Reaktion ebenfalls in der Bilddarstellung des Arrays in Abbildung 3.4b. Die Negativkontrolle, das Hybrid DNA 3_{immob} – DNA 3_{FITC}, wird nicht geschnitten. Man beobachtet sowohl in Abbildung 3.4b keinen Intensitätsverlust und in Abbildung 3.5 keinen negativ exponentiellen Kurvenverlauf. Auffallend bei den Bilddarstellungen des Arrays sind die Spots unterschiedlicher Intensitäten, in denen die DNA durch das Enzym geschnitten wurde. Erwartungsgemäß sollten die Ergebnisse gleichermaßen ausfallen. Bei genauerer Betrachtung zeigen sich teilweise deutliche Unterschiede im Ausmaß des Schneidens, da in einigen Spots die Signalintensität nach dem Schnitt gleich Null ist, während bei einigen Spots die Intensität in geringeren Maßen abgenommen hat. Eine Erklärung liefert die Analyse der dynamischen Daten aus Abbildung 3.5. So erkennt man im Spot E2, dass sowohl DNA 2_{FITC} sowie DNA 3_{FITC} gebunden haben, obwohl in diesem Spot nur das Komplementär von DNA 2 getropft wurde. Ähnliches

ist auch im Spot D10 zu beobachten, in dem DNA 3_{immob} vorlag und Bindung von DNA 2_{FITC} in geringerem Maße neben der DNA 3_{FITC} beobachtet wurde. In beiden Spots schneidet das Enzym den Anteil der doppelsträngigen DNA mit der Schnittsequenz, während DNA 3 nicht geschnitten wird. Da diese Spots in direkter Nähe zu DNA 3 bzw. im zweiten Fall zu DNA 2 liegen, wie aus Abbildung 3.4 deutlich wird, ist es bei dem Auftragen der zu immobilisierenden DNAs zu Verunreinigungen innerhalb der Spots gekommen.

3.1.2 Quantitative Analyse

Neben der qualitativen Analyse lassen sich die Messdaten auch quantitativ auswerten. Dazu müssen die dynamischen Messdaten über nicht-lineare Regression gefittet werden, um die kinetische Konstante, k_{cat} , des Enzyms zu ermitteln. Dieser mathematische Vorgang wird in dem Abschnitt der Kurve durchgeführt, der nach dem Start der Reaktion durch den Kofaktor entsteht. In Abbildung 3.6 sind alle Kurvenverläufe einer Messung im 6x11-Array dargestellt, die anschließend ausgewertet werden.

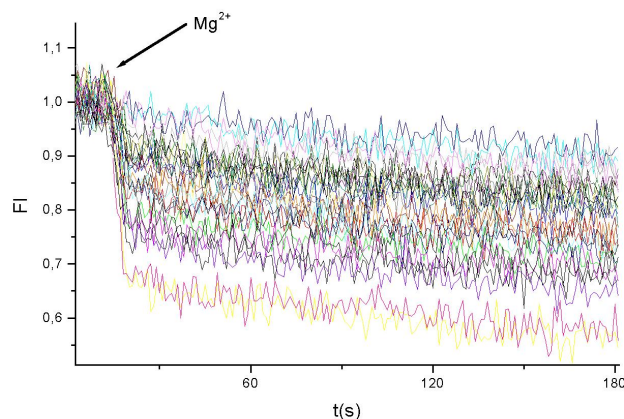


Abbildung 3.6 Messkurven der Reaktion von *EcoRI* im 6x11-Array nach Zugabe des Kofaktors Mg²⁺. Der Zeitpunkt der Zugabe des Kofaktors (Pfeil) beschreibt den Startpunkt der enzymatischen Reaktion. Die Fluoreszenzintensität nimmt in den Spots ab, in denen die DNA die Schnittsequenz für *EcoRI* besitzt. Dies resultiert aus dem Schneiden der DNA auf der Chipoberfläche und dem gleichzeitigen Entfernen der markierten DNA-Stränge. In den Spots, in denen die DNA diese Sequenz nicht aufweist, bleibt die DNA ungeschnitten auf der Oberfläche und es wird kein Intensitätsabfall beobachtet.

Abbildung 3.6 zeigt das Ergebnis eines enzymatischen Verdauens von unterschiedlichen DNA-Sequenzen im 6x11-Microarray. Deutlich ist zu erkennen,

dass die Intensität nach der Zugabe des Kofaktors abfällt. Dabei zeigt der Vergleich der Messkurven die Unterschiede zwischen den Spots, in denen die DNA verdaut wurde und den Spots, in denen das Enzym nicht mit der DNA reagierte.

In Abbildung 3.7 wird an einer der Kurven exemplarisch das Ergebnis der Kurvenanpassung dargestellt. Daraus lässt sich die kinetische Reaktionskonstante des Enzyms ermitteln. Dieser Vorgang wird an allen Messkurven aus der Abbildung 3.6 parallel durchgeführt und ausgewertet.

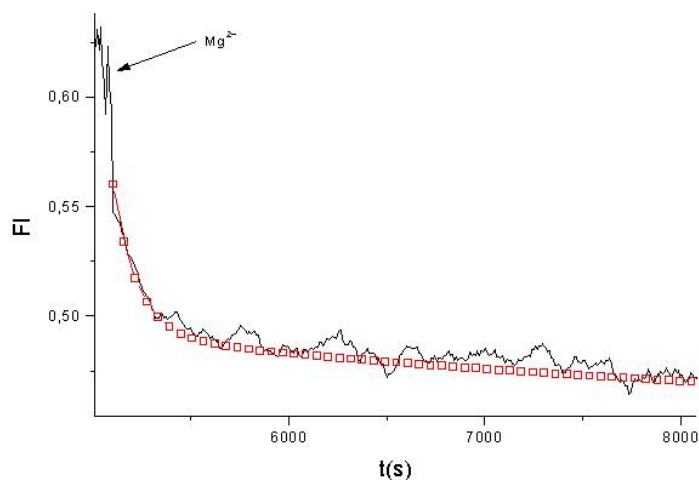


Abbildung 3.7 Kinetische Messung der *EcoRI*-Reaktion. Abnahme der Fluoreszenz-Intensität nach Zugabe von Mg^{2+} aufgrund des Schneidens der DNA auf der Oberfläche durch *EcoRI*. Damit ist das Entfernen der markierten DNA-Stränge von der Oberfläche verbunden. Darstellung des Kurvenverlaufes (-) und des biexponentiellen Fits (\square) zur Bestimmung der kinetischen Konstanten.

In Abbildung 3.7 wird graphisch die Auswertungsprozedur beschrieben, mit der die kinetischen Konstanten des Enzyms ermittelt werden. Der Vorgang, der durch den exponentiellen Abfall der Intensität beschrieben wird, ist der Abtransport der markierten geschnittenen DNA von der Oberfläche. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt hierbei ist die enzymatische Reaktion, so dass aus dem Kurvenverlauf direkt die Konstanten des Enzyms berechnet werden können. Die dafür notwendigen Formeln sind in Kapitel 2.3.5 beschrieben. Zur Beschleunigung der Auswertung wurden vorgegebene Funktionen des Softwarepakets „Origin 5.0“ der Firma Microcal. Software Inc (USA) verwendet. Die Übereinstimmung der Messdaten (-) mit dem Modell (\square) wird deutlich in Abbildung 3.7. Das mathematische Modell entspricht in diesem Fall einem negativ bi-

exponentiellen Kurvenverlauf und ergibt 2 Geschwindigkeitskonstanten, $k_{\text{cat } 1}$ und $k_{\text{cat } 2}$, für die Restriktionsendonuklease *EcoRI*. Dies zeigt die zwei separaten Katalysewege von *EcoRI* in der Oberflächenreaktion, die auf die unterschiedlichen Bewegungsfreiheiten der beiden DNA-Stränge zurückzuführen sind (Bier et al., 2002). Die Auswertung ergab folgende Geschwindigkeitskonstanten für die jeweiligen Oligonukleotide:

- DNA1_{immob}/DNA1_{FITC} : $k_{\text{cat } 1}=35\pm 15 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ und $k_{\text{cat } 2}=5\pm 3 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$
- DNA2_{immob}/DNA2_{FITC} : $k_{\text{cat } 1}=25\pm 10 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ und $k_{\text{cat } 2}=8\pm 4 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$
- DNA3_{immob}/DNA3_{FITC} : keine Aktivität des Enzyms zu beobachten.

Eigene Einzelmessungen mittels faseroptischer Sensoren ergaben folgende Werte für *EcoRI*: $k_{\text{cat } 1}=11,2\pm 1,2 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ und $k_{\text{cat } 2}=1,79\pm 0,2 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$. Das verwendete Oligomer war ein 24mer mit einem GC-Anteil von 42% (Kleinjung, 1998).

3.2 Zusammenfassung

1. Es wurden DNA-Arrays mit 2 unterschiedlichen Printtechniken hergestellt, die beide eine simultane, parallele Analyse der enzymatischen Aktivität von *EcoRI* in Abhängigkeit der DNA-Sequenz erlauben. Es wurden einheitliche Ergebnisse erzielt und die Effektivität beider Techniken demonstriert.
2. Die Analyse der Hybridisierungsvorgänge schließt Fehlpaarungen aus. Der Reaktionsverlauf an den FITC-Konjugaten verdeutlicht, dass unspezifische Wechselwirkungen der markierten Oligonukleotide mit der Oberfläche und immobilisierten nicht-komplementären Oligonukleotiden ausgeschlossen werden. Der Vergleich der Reaktionsverläufe an der DNA mit und ohne Schnittstelle von *EcoRI* belegt, dass die Intensitätsabnahme ausschließlich auf den enzymatischen Verdau zurückzuführen ist.
3. Die enzymatische Aktivität wird an unterschiedlichen DNA-Sequenzen in den einzelnen Spots gemessen. Dabei wird auch der Einfluss eines höheren GC-Gehaltes in den Nachbarregionen der Schnittsequenz untersucht.
4. Die auf dem Biochip gemessenen Reaktionskonstanten wurden parallel in 66 Spots ermittelt und entsprachen den Reaktionskonstanten, die bei Einzelmessungen an optischen Sensoren, wie der Faseroptik, ermittelt wurden. Mit Hilfe der Bilddarstellung der Arrays konnte eine qualitative Auswertung anhand der unterschiedlichen Intensitäten erfolgen. Bei Spots, deren Bildauswertung keine klare Aussage ergab, führte die kinetische, quantitative Auswertung der einzelnen Spots zu eindeutigen Ergebnissen.

3.3 Diskussion

Die Aktivität einer Restriktionsendonuklease wurde bisher nur als Einzelmessung auf optischen Oberflächen dargestellt. Die hier vorgestellten Ergebnisse beschreiben die Kombination einer gängigen Messmethode mit der Mikroarray-Technik.

Dies eröffnet neue Möglichkeiten, um Mikroarrays in der Diagnostik und Analytik einzusetzen.

Trotz der geringen Abmessung zwischen den einzelnen Spots wurde die Aktivität des Enzyms nicht eingeschränkt wie der Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten, die im Mikroarray gemessen wurden, mit den Daten aus Einzelmessungen zeigt. In Tabelle 3.1 werden die unterschiedlichen Geschwindigkeitskonstanten in Abhängigkeit der Sequenz der immobilisierten DNA-Stränge dargestellt.

DNA-Sequenz (5'-----3' 3'-----5')	GC-Gehalt (%)	k_{cat1} ($\times 10^{-3} s^{-1}$)	k_{cat2} ($\times 10^{-3} s^{-1}$)
DNA1 _{immob} : CAAGAATTCTCA DNA1 _{FITC} : GTTCTTAAGAGT	33	35±15	5±3
DNA2 _{immob} : CCCGAATTCCCC DNA2 _{FITC} : GGGCTTAAGGGG	66	25±10	8±4
DNA3 _{immob} : CACCACTCTCAA DNA3 _{FITC} : GTGGTGAGAGTT	50	0 ^x	0 ^x
GCAGAAGTTCTTAAGAGTACAAAG CGTCTTCAAGAATTCTCATGTTTG (Bier et al. 2002)	42	11,2±1,2	1,79±0,2

^x Es wird kein Verdau der Oligonukleotide beobachtet, da die *EcoRI*-spezifische Bindungs- und Schneidesequenz nicht vorhanden ist.

Tabelle 3.1 Geschwindigkeitskonstanten k_{cat} des Enzyms *EcoRI* in Abhängigkeit der Sequenz und des GC-Gehaltes der immobilisierten DNA-Stränge

In Tabelle 3.1 werden die Geschwindigkeitskonstanten in Abhängigkeit von der Sequenz und vom GC-Gehalt dargestellt. Dabei konnte der in Lösung geltende Einfluss des GC-Anteils (Alves et al., 1984) auf die Geschwindigkeitskonstante für Reaktionen auf der Oberfläche nicht bestätigt werden.

Im Ergebnis der Experimente liegen konkrete Aussagen über die Enzyme zu ihrer kinetischen Charakterisierung und spezifischen Sequenzerkennung vor. Die gängige Methode im Mikroarray, Oligomere aufgrund ihrer Sequenz voneinander zu unterscheiden, ist in Hybridisierungsexperimenten mit markierten Sonden realisiert (Syvänen, 2001). Die Auswertung erfolgt anschließend über vergleichende Intensitätsmessung. Dabei besteht die Problematik, dass unspezifisch gebundene markierte Sonden falsch-positive Ergebnisse liefern. Durch die sequenz-spezifische Erkennung von Restriktionsendonukleasen werden solche Fehler unterbunden. Alle Oligomere, die Träger der Schnittsequenz von *EcoRI* sind, werden geschnitten und die markierte Sonde von der Oberfläche entfernt, während die DNA-Stränge ohne diese Sequenz keine Reaktion mit dem Enzym eingehen.

Diese Genauigkeit kann auch eingesetzt werden, um Einzelbasenmutationen, sogenannte SNPs (single nucleotide polymorphism), zu detektieren. Diese Mutationen in proteinkodierenden Sequenzen werden für einige Krankheitsbilder verantwortlich gemacht, was zu einem erhöhten Interesse bei deren Identifikation führt. Bei der Analyse des menschlichen Genoms wurden bis zu 2 Millionen SNPs in öffentlichen Datenbanken eingeordnet (Sachidanandam et al., 2001) und bis zu 4 Millionen SNPs in kommerziellen Datenbanken der Firma Celera Genomics (Venter et al., 2001). Die dadurch anfallende große Menge an erforderlichen Messungen, kann durch Einzelmessungen kaum bewältigt werden.

Die Mikroarray-Technik, bei der in einer Messung einer Vielzahl von DNA-Abschnitten auf SNPs getestet werden, spielt bei der Analyse dieser SNPs daher eine wichtige Rolle. Die Auswertung solcher Messungen verläuft durch Hybridisierung dieser DNA-Abschnitte mit der komplementären DNA des Wildtyps. Die Detektion der Mutante erfolgt dann über Vergleich der Hybridisierungseffizienz zwischen Wildtyp und Mutante. Der Unterschied besteht dabei nur in einer Basenabweichung, die oft nicht ausreicht, um Unterschiede in dem Hybridisierungsvorgang zu entdecken. Bei der Entwicklung neuartiger SNP-Assays werden auch andere biochemische Techniken eingesetzt wie z.B. Primer-Verlängerungs- (Fan et al., 2000) und Oligonukleotid-Ligations-Technik (Gerry et al., 1999). Mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen könnte die Identifizierung von SNPs eindeutiger verlaufen, da die Abweichung einer Base z.B. in der Schnittstelle von *EcoRI* den Verdau der Mutante verhindert. Die Unterscheidung zwischen Mutante und Wildtyp wäre sensitiver und genauer und bedarf nicht der Amplifikation der SNPs durch PCR

(Sylvänen, 2001). Ein Kit für die SNP-Analytik durch Anwendung von Exonukleasen wird bereits kommerziell vertrieben (Invader AssayTM, Third Wave Technologies, USA), (Lyamichev et al., 1999). Dieser Assay wird u.a. eingesetzt, um die Veranlagung für Störungen im humanen Blutgerinnungssystem zu detektieren, welche auf Einzelbasenmutation (z. B. das Faktor V-Leiden) zurückzuführen ist (Ledford et al., 2000).

Dies beweist, dass neben den natürlich vorkommenden Restriktionsenzymen wie *EcoRI* und *Hind III* auch neuartige Enzyme durch biochemische Methoden mit hochselektiven Sequenz- und Struktur-Spezifitäten entwickelt werden können, die es ermöglichen, eine zunehmend größere Anzahl von SNPs im Genom eindeutig zu identifizieren.

3.4 Aktivitätsmessung von Klenow⁻-Fragment auf optischen Oberflächen

Es wurden DNA-Enzym-Wechselwirkungen auf Oberflächen überwiegend am Beispiel von Restriktionsenzymen gezeigt. Im Zeitalter der zunehmenden Automatisierung von molekularbiologischen Methoden sollen diese in verstärktem Maße auf der Oberfläche verankert werden. Dabei sind auch DNA-synthetisierende Enzyme wie DNA-Polymerasen von großem Interesse. Diese Anwendung ermöglicht die Generierung von langen DNA-Strängen direkt auf der Oberfläche. Dabei kann zum einen die Syntheseleistung des Enzyms direkt analysiert werden und zum anderen kann doppelsträngige DNA direkt in den Spots erzeugt werden. Dabei werden aufwendige chemische und photochemische Verfahren umgangen. Die enzymatische Synthese von Oligonukleotiden auf der Chipoberfläche bedeutet eine niedrigere Fehlerquote im Vergleich zu der chemischen Synthese. Der Nachweis solcher Verfahren erfolgt überwiegend optisch und ermöglicht einfachere und zeitlich weniger aufwendige Methoden.

3.4.1 Aktivitätsmessung am Gitterkoppler

Um Bindung und Syntheseleistung einer Polymerase wie dem Klenow⁻-Fragment auf der Oberfläche beobachten zu können, muss auf der Sensoroberfläche ein Template und ein Primer immobilisiert werden.

Während der Primer chemisch auf die Oberfläche gekoppelt wird, erfolgt die Bindung des Template-Stranges über Hybridisierung an dem komplementären Primer. Der Template-Strang besteht aus einem Oligo-dA₅₀, der als Vorlage für die enzymatische Strangsynthese dient. Der Abschnitt des Template-Stranges über den die Hybridisierung an den Primer erfolgt, besteht aus einem 23-mer mit einer heterogenen Sequenz wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben.

Die biologische Modifizierung und Präparierung der silanisierten Oberfläche der Gitterkopplerchips und der Versuchsablauf sind in der Abbildung 3.8 dargestellt.

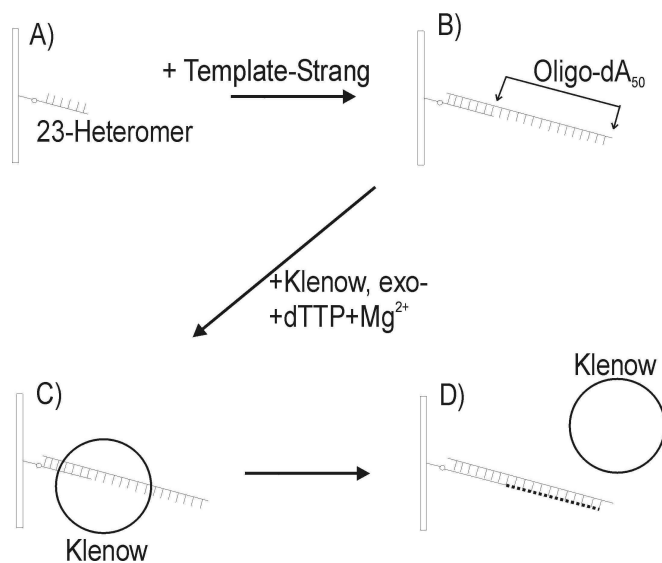


Abbildung 3.8 Schematische Darstellung der Aktivitätsmessung des Klenow⁻-Fragmentes und Aufbau des Primer/Template-Hybrids auf der Oberfläche des optischen Sensors. An den auf der Sensoroberfläche immobilisierten Primer (A) wird durch Hybridisierung der Templatestrang (B) gebunden. Durch Zugabe des Klenow⁻-Fragmentes (C) wird die Strangverlängerung gestartet (gestrichelte Linie). Nach Beendigung der Strangsynthese dissoziiert das Enzym (D).

Durch die Wechselwirkung mit der Streptavidin-modifizierten Oberfläche erfolgte die Immobilisierung des Biotin-markierten Primers (A). Der Aufbau des biologischen Systems wurde vervollständigt durch die Hybridisierung des Primers mit dem Template-Strang (B).

Das Klenow⁻-Fragment wurde zusammen mit den Nucleotiden auf die Oberfläche gegeben (C) und die enzymatische Reaktion direkt gestartet. Gestoppt wurde die Reaktion durch Umschalten auf Laufpuffer und das Enzym dissoziiert von der Oberfläche (D), zurück bleibt nur die immobilisierte und synthetisierte DNA.

In Abbildung 3.9 wird die Messung auf der Oberfläche des Gitterkoppler-Chips gezeigt.

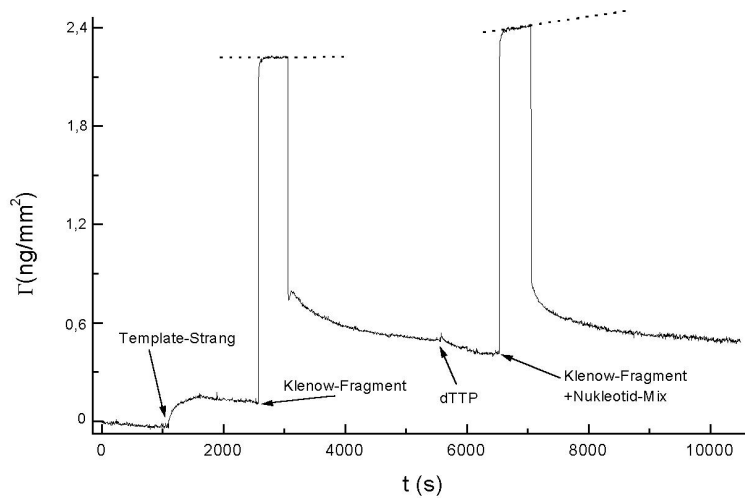


Abbildung 3.9 Messung der Aktivität des Klenow⁻-Fragmentes am immobilisierten Primer/Template-Hybrid auf silanisierter Oberfläche im Gitterkoppler. Nach der Hybridisierung des Template-Stranges wird nur das Klenow⁻-Fragment dazugegeben und dessen Bindung beobachtet. Nach Zugabe des dTTP wird ein stärkerer Kurvenabfall beobachtet, der die schnellere Dissoziation des Enzyms dargestellt. Nach Zugabe von Klenow⁻ und Nukleotiden wird Strangverlängerung beobachtet (gestrichelte Linie).

Dabei kann sowohl die Hybridisierung des Template-Stranges als auch die enzymatische Aktivität beobachtet werden. Mit Hilfe des Anlagerungssignals des Templates wird die Menge an immobilisiertem Doppelstrang berechnet. Die Oberflächenbeladung durch den Template-Strang beträgt $\Gamma = 0,1 \text{ ng/mm}^2$. Die Zugabe von Klenow⁻-Fragment ohne Nukleotide zeigt deutlich, dass dieses Enzym an die DNA bindet. Die Plateau-Phase des Signals zeigt das Ausbleiben von enzymatischer Aktivität. Die anschließende Dissoziation erfolgte mit einer Rate von $k_D = 1,3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.

Durch Zugabe des Nukleotids Desoxythymidintriphosphat, dTTP, während der Dissoziationsphase wird ein stärkerer Abfall des Signals deutlich und die Dissoziationsrate erhöht sich auf $k_D = 2,3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Im weiteren Verlauf beobachtete man nach Zugabe des Enzyms und der Nukleotide einen linearen Anstieg des Signals, der auf den Einbau der Nukleotide durch das Klenow⁻-Fragment zurückzuführen ist.

Die quantitative Auswertung dieser Experimente ergab, dass das Verhältnis von immobilisiertem Primer/Template-Hybrid zu Klenow⁻-Fragment 0,2 betrug. Das bedeutet, dass an jedem 5. immobilisierten Binder ein Enzym gebunden hat. Auf der

und somit die Menge des gebundenen Enzyms $1,3 \text{ fmol/mm}^2$. Anhand dieser Daten und der ermittelten Steigung ergibt sich eine Turn-Over-Rate für das Klenow-Fragment auf der Oberfläche von 3,4 Nukleotiden/min.

3.4.2 Aktivitätsmessung am BIAcore 2000

3.4.2.1 Modifizierung der Chipoberfläche

Die Modifizierung der Sensoroberfläche, in diesem Fall der Oberfläche des CM5-Chips der Firma BiaCore, ist in einzelne Schritte untergliedert. Der erste Schritt, die Kopplung von Streptavidin, ist in Abbildung 3.10 in Form eines Sensorgrams dargestellt.

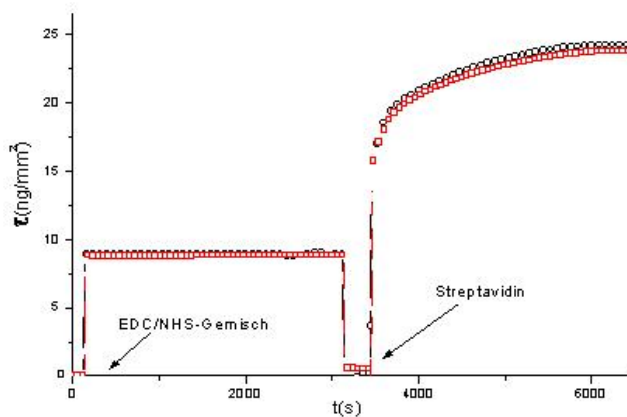


Abbildung 3.10 Chemische Modifizierung der Oberfläche eines Chips im BIAcore 2000. Zugabe von EDC/NHS-Gemisch zur Aktivierung der Oberfläche gefolgt von Streptavidin (250 $\mu\text{g/ml}$) in Fließzelle 1 (o) und Fließzelle 2 (\square)

Anschließend koppelte man den Biotin-markierten Primer auf die präparierte Oberfläche (Abbildung 3.11a). Der Template-Strang wurde über Hybridisierung an dem Primer auf der Oberfläche immobilisiert (Abbildung 3.11b). Damit war die Modifizierung der Oberfläche beendet und die Messung der enzymatischen Aktivität konnte erfolgen.

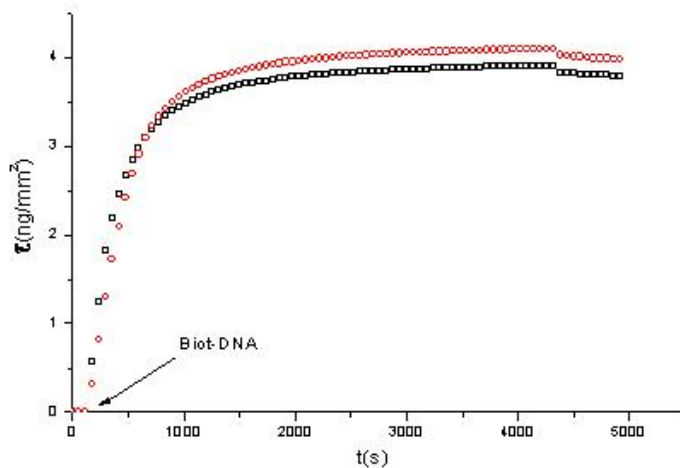


Abbildung 3.11a Anlagerung des biotinylierten Primers auf der streptavidinmodifizierten Oberfläche des BioCore-Chips

- Anlagerung der biotinylierten DNA in Fließzelle 1 (o)
- Anlagerung der biotinylierten DNA in Fließzelle 2 (□)

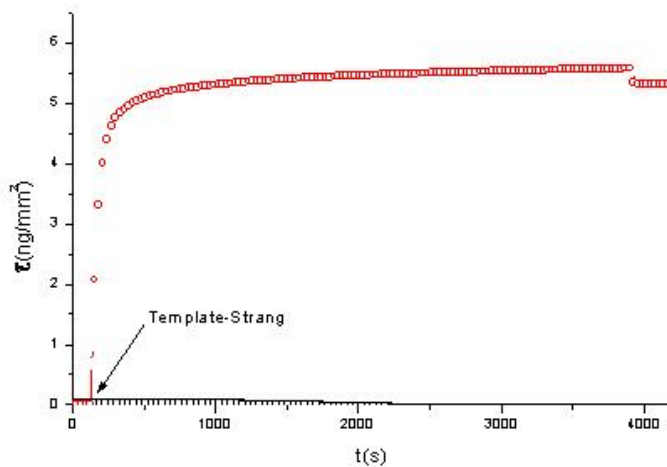


Abbildung 3.11b Hybridisierung des Template-Stranges.

Zugabe des Template-Stranges in Fließzelle 1(o). In Fließzelle 2 (□) verweist der Verlauf der Messkurve, dass keine Hybridisierung abläuft und nur der immobilisierte Primer zu Beginn der enzymatischen Reaktion vorliegt.

In Abbildung 3.11b hybridisiert der Template-Strang, ein 73mer bestehend aus einem 23-Heteromer und einem 50-Oligo-Monomer, an dem immobilisierten Primer in Fließzelle 1. Die Hybridisierung erfolgt über das 23mer, das komplementär zu dem immobilisierten Primer ist. Abbildung 3.11b zeigt, dass in Fließzelle 2 kein Hybridisierungsvorgang beobachtet wird, da der Template-Strang nicht

hinzugegeben wird. Darüberhinaus ist auch keine Verschleppung des Template-Stranges aus der Fließzelle 1(o) in die benachbarte Fließzelle 2 (□) beobachtet. Zur besseren Auswertung der Daten und Evaluierung der Oberflächenmodifizierung der Chips werden die einzelnen Belegungsdichten der bereits erwähnten Schritte in der folgenden Tabelle 3.3 zusammenfassend dargestellt.

Bindungskomponente (Molekulargewicht. g/mol)	Änderung der Einheiten „Response units“ (RU)	absolute Belegungsdichte Γ (ng/mm ²)	spezifische Belegungsdichte (fmol/mm ²)
Anlagerung von Streptavidin (64.000)	23600	23,6	370
Biotinylierte Primer (8029)	Fc1= 3900 Fc2= 3700	Fc1= 3,9 Fc2= 3,7	Fc1= 485 Fc2= 460
Hybridisierung des Template-Stranges (23928)	5300	5,3	220

Tabelle 3.2 Auswertung der Modifizierung der Oberfläche des CM5-Chips von BiaCore 2000. Vergleich der Menge der gebundenen Moleküle in Fließzelle 1 und 2

3.4.2.2 Auswertung der Aktivitätsmessung

Der Versuchsablauf für die Messung am BIAcore 2000 unterscheidet sich in der Zugabeprozedur des Enzyms auf die Oberfläche zu dem in Abbildung 3.8 dargestellten Ablauf am Gitterkoppler. Bei den Messungen am BIAcore 2000 wird das Enzym über den gesamten Messzeitraum über die Oberfläche gegeben und nicht nur zum Start der Strangsynthese, wie in Abb. 3.8 dargestellt.

Zuerst wird dabei das Enzym zusammen mit einem Nukleotid, Desoxyguanosintriphosphat, dGTP, zugegeben, das nicht zu der Sequenz des Template-Stranges komplementär ist. Dadurch wird die Bindung des Enzyms an das Primer/Template-Konstrukt ermöglicht, ohne simultan die Strang-Synthese einzuleiten. Nach erfolgter Bindung wird dGTP durch dTTP ersetzt und somit die Synthese des Stranges durch das Enzym gestartet.

In Abbildung 3.12 wird das Ergebnis dieses Versuchsablaufes dargestellt.

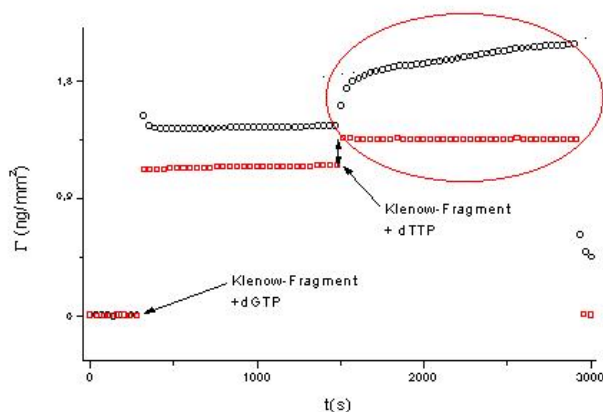


Abbildung 3.12 Messung der Bindung des Klenow-Fragmentes auf der biotinylierten Oberfläche im BIAcore 2000 und der enzymatischen Strangverlängerung (Zoom). Indexsprung der Basislinie durch Austausch des Nukleotids dGTP durch dTTP (Pfeil).

- Messung der Aktivität am immobilisierten Primer/Template-Hybrid (Messzelle 1, o)
- Messung der Aktivität am immobilisierten Primer (Messzelle 2, □)

In diesem Plot sind die Messdaten der Fließzellen 1 und 2 dargestellt. Die Probenlösung wurde gleichzeitig durch Fließzelle 1 und Fließzelle 2 geführt. Dies ermöglicht den direkten Vergleich der Messung mit der Negativkontrolle in Fließzelle 2. Dabei wird sowohl der Indexsprung deutlich, der durch das Enzym verursacht wird, als auch der Bindungsvorgang, nachdem das Enzym zusammen mit dGTP auf die Oberfläche zugegeben wurde. Den Start der Reaktion stellt der Austausch von dGTP

durch dTTP dar. Dabei wird ein weiterer Indexsprung (Pfeil) in beiden Fließzellen sichtbar, der auf das höhere Molekulargewicht des Nukleotids dTTP gegenüber dem Nukleotid dGTP zurückzuführen ist, das zu Beginn des Versuchs eingesetzt wird. Direkt im Anschluss daran steigt die Messkurve in Fließzelle 1 (o) stetig an, während das Signal in Fließzelle 2 (□) auf einem konstanten Niveau bleibt. Durch Umschalten auf Laufpuffer wird die Reaktion gestoppt, nachdem das Signal in Zelle 1 ein stabiles Niveau erreichte. Das Enzym dissoziiert in beiden Zellen von der Oberfläche. Dabei bleibt das Signal in Zelle 1 auf einem höherem Niveau gegenüber dem Ausgangsniveau. In Zelle 2 fällt das Signal zurück auf den Anfangswert.

Der Verlauf der Messkurven nach Start der enzymatischen Reaktion wird in Abbildung 3.13 vergrößert dargestellt.

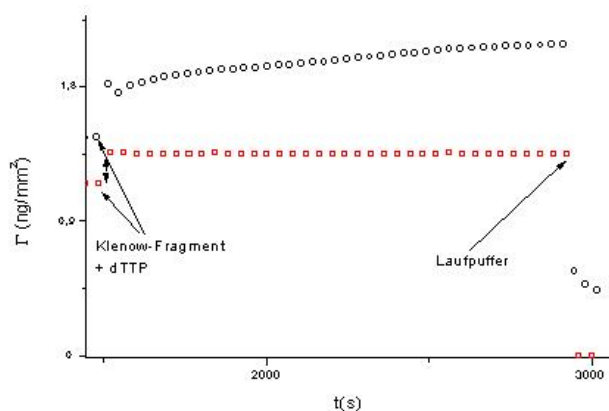


Abbildung 3.13 Aktivitätsmessung des Klenow-Fragmentes auf der Oberfläche am BiaCore 2000. Vergleich der Aktivitäten an immobilisierten Primer/Template-Hybrid (o) und an immobilisierten Primer (□). Start der enzymatischen Reaktion nach Zugabe von dTTP und Beendigung der Reaktion und Dissoziation des Enzyms von der Oberfläche nach Umschalten auf Laufpuffer.

In Abbildung 3.13 wird nur die enzymatische Reaktion auf der Oberfläche betrachtet. Dabei wird der Reaktionsverlauf am immobilisierten Primer/Template-Hybrid verglichen mit dem Verlauf am immobilisierten Primer. Dieser Vergleich soll die Enzymaktivität bestätigen. Hierbei wird deutlich, dass erwartungsgemäß keine Aktivität zu erkennen ist, wenn nur der Primer vorliegt, da das Enzym keine Vorlage zur Synthese eines DNA-Stranges hat. Im Gegensatz dazu wird bei Vorlage des Template-Stranges der komplementäre Strang enzymatisch synthetisiert. Dies wird deutlich durch den Anstieg des Signals.

Nach der Dissoziation des Enzyms unterscheiden sich die beiden Messkurven in ihren Signalniveaus deutlich. Diese Differenz entspricht dem synthetisierten Strang und gibt Auskunft über das Maß der enzymatischen Aktivität.

Der Signalunterschied in der ersten Fließzelle entspricht einer Oberflächenbeladung von $0,45 \text{ ng/mm}^2$. Rechnet man dies um auf die Menge der eingebauten Nukleotide in den immobilisierten Strang, so wurde dieser um 43 Nukleotide verlängert. Die zu verlängernde Sequenz des Template-Stranges entsprach 50 Nukleotiden. Dies bedeutet, dass 86% des Templates von dem Enzym umgesetzt wurden.

Die Steigungen der Messsignale nach Start der Synthese durch Zugabe der Nukleotide wurde ausgewertet. Die Berechnung der spezifischen Syntheserate erfolgte mit Hilfe des mathematischen Ansatzes, der in Kapitel 2.4.6.2 erörtert wurde. Bei den Messungen am Gitterkoppler wurden $1,3 \text{ fmol/mm}^2$ des Enzyms am Primer/Template-Hybrid gebunden. Es wurden spezifische Syntheseraten von $3,4 \pm 0,2$ Nukleotide/min ermittelt. Die Kontrollmessungen am Referenzgerät BIACore 2000 ergaben spezifische Syntheseraten von $5,6 \pm 0,4$ Nukleotide/min bei einer Menge von $4,2 \text{ fmol/mm}^2$ gebundenem Enzym und bestätigten die Zuverlässigkeit der entwickelten Methode zu Bestimmung der enzymatischen Aktivität auf der Oberfläche.

3.5 Zusammenfassung

1. Die enzymatische Synthese von DNA-Oligomeren durch das Klenow-Fragment an immobilisierten Primern wird durch verschiedene optische Messgeräte detektiert. Die Strangsynthese wird in Echtzeit beobachtet und durch lineare Regression wird die spezifische Syntheserate bestimmt.
2. Die Trennung des Bindungs- und Synthesevorgangs erfolgt durch die Zugabe des komplementären Nukleotides. Die Bindung wird initiiert durch eine Reaktionslösung, bestehend aus Enzym und einem nicht-komplementären Nukleotid. Dies sorgt für einen Bindungskomplex zwischen Enzym und immobilisierter DNA. Der Austausch der Nukleotide bei fortdauernder Zugabe des Enzyms initiiert die enzymatische Strangverlängerung des Primers entlang der Matrize.
3. Die quantitative Auswertung ergibt, dass die Messungen am BIACore die Ergebnisse der Versuche am Gitterkoppler bestätigen und die Verlässlichkeit der Methode beweisen.
4. Der direkte Vergleich der Messungen mit Negativkontrollen, bei denen nur der Primer immobilisiert vorlag, belegt eindeutig, dass die Erhöhung des Meßsignals auf die Synthese des DNA-Stranges durch das Enzym zurückzuführen ist. Dabei werden annähernd 90% des DNA-Stranges auf der Oberfläche synthetisiert.
5. Die Syntheseraten des Enzyms in Lösung liegen um den Faktor 25 höher als die auf der Oberfläche gemessenen Daten. Dies ist vermutlich auf die eingeschränkten Freiheitsgrade der Oligonukleotide durch die Immobilisierung zurückzuführen.

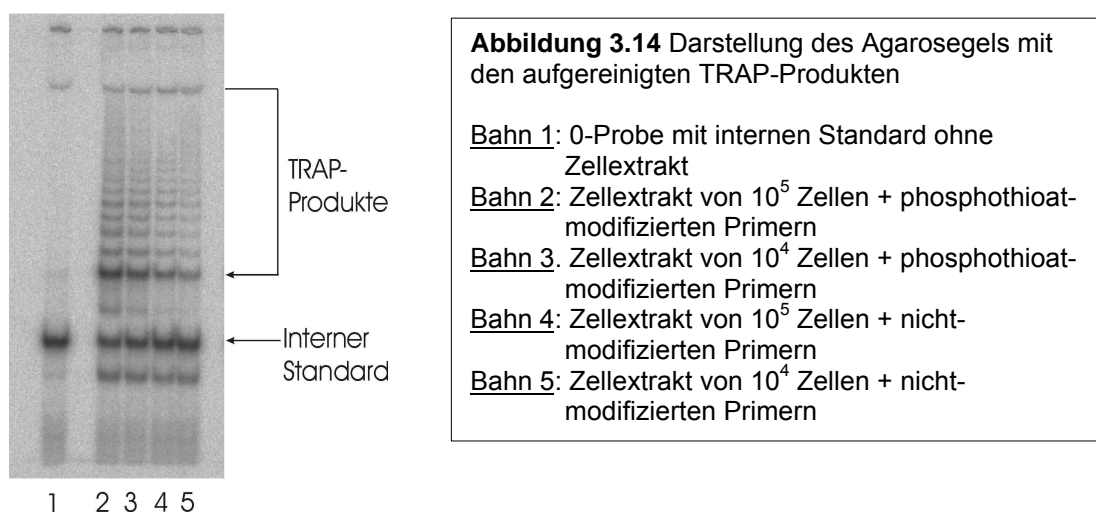
3.6 Telomerase

Die Ergebnisse im Kapitel 3.3 haben gezeigt, dass die enzymatische DNA-Synthese am immobilisierten Substrat auf Oberflächen erfolgreich durchgeführt wurde. Das am Modellenzym Klenow⁻-Fragment entwickelte Verfahren wird angewandt, um die Aktivität der Telomerase in Zellen zu bestimmen. Dabei soll ein sensorischer Assay entwickelt werden, der sich zur Frühdiagnose von Krebserkrankungen eignen könnte. Die Grundlage für eine erfolgreiche Sensorentwicklung bildete die Suche nach dem geeigneten Primer, um die Telomeraseaktivität sichtbar auf der Oberfläche durchführen zu können.

Die Arbeiten zur Sensorentwicklung teilen sich in zwei Abschnitte: 1. labelfreie Messungen mittels oberflächensensitiver Evaneszentfeld-Sensoren auf Basis des optischen Gitterkopplers und 2. Fluoreszenz-Messungen mit faseroptischen Sensoren, die ebenso im Evaneszentfeld-Modus eingesetzt wurden.

3.6.1 Aktivitätsmessung der Telomerase in Lösung

Bei der Wahl des geeigneten Primers für die Bestimmung der Aktivität der Telomerase ging man von den Ergebnisse von Majumdar und Matthes aus (Majumdar et al., 1989), (Matthes et al., 1999). Letzterer hatte einen aktivitätsteigernden Effekt von phosphothioat-modifizierten Oligomeren beobachtet. In Abbildung 3.14 werden die Telomeraseprodukte in Lösung nach der Aufreinigung im Gel dargestellt.



In dieser Abbildung wird der Einfluss des phosphothioat-modifizierten Rückgrates der Oligomere mit dem des Standard-Primers aus dem TRAPeze-Kit der Firma Onkogen verglichen. Dabei erkennt man in Bahn 1 nur eine Bande. Hierbei handelt es sich um die 0-Probe, die nur den internen Standard enthält. Er dient als Nachweis, dass der PCR-Schritt ordnungsgemäß abläuft.

In den Bahnen 2 bis 5 werden Zellextrakte der HL60-Zellen aufgetragen. Die aufgetragenen Proben unterscheiden sich in der Zellzahl. Dabei ist neben dem internen Standard, das typische regelmäßige Bandenmuster der durch die Telomerase verlängerten Telomere zu sehen. Die Differenz der jeweiligen Fragmente beträgt 6 Basen (GGTTAG). Die Anzahl und die Intensität der Banden geben Auskunft über die Aktivität des Enzyms. In den Bahnen 2 und 3 ist die Aktivität der Telomerase an einem phosphothioatmodifizierten Primer zu sehen. Die Intensitätsdifferenzen bei diesen beiden Bahnen resultiert aus der unterschiedlichen Zellzahl. Analog dazu sind die Ergebnisse in den Bahnen 4 und 5, wo ein nicht-modifizierter Primer verwendet wurde. Dabei werden Unterschiede in der Intensität der Banden zwischen 2/3 und 4/5 sichtbar.

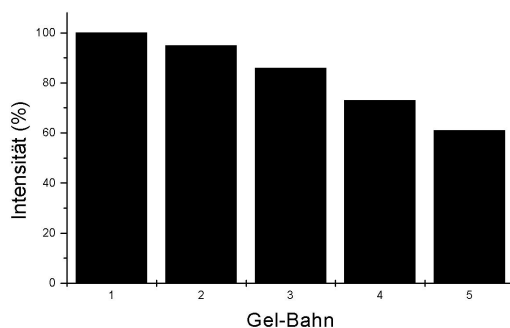


Abbildung 3.15 Intensitätsverteilung der TRAP-Produkte im Agarosegel aus Abbildung 5.1. In den Bahnen 2 und 3 wird die Aktivität der Telomerase am phosphothioatmodifizierten Primer und in den Bahnen 4 und 5 am nicht-modifizierten Primer gemessen. Die Intensität des internen Standards (Bahn 1) dient als Bezugspunkt für die übrigen Ergebnisse. Die Aktivitätssteigerung der Telomerase durch die Phosphothioatmodifizierung wird deutlich bei dem Vergleich der Bahnen 2 und 4 (10^5 Zellen) und den Bahnen 3 und 5 (10^4 Zellen). Die Intensitätsunterschiede der Bahnen 2 und 4 und 3 und 5 liegen jeweils um die 30 %.

Die Auswertung der Bandenintensitäten, beschrieben in Abbildung 3.15, ergab eine um 30% erhöhte Aktivität der Telomerase in Bahn 2 gegenüber der Aktivität in Bahn 4.

3.6.2 Labelfreie Messungen

Bei den Messungen in Lösung wurden radioaktiv-markierte Nukleotide verwendet.

Labelfreie Messungen wurden am Gitterkoppler durchgeführt. Aufgrund der in Abbildung 3.14 und 3.15 beschriebenen Ergebnissen wurde der phosphothioat-modifizierte Primer für die Aktivitätsmessung der Telomerase verwendet, um den aktivitätssteigernden Effekt des Primers auf das Enzym effektiv auszunutzen.

Die biologische Präparierung der Chip-Oberflächen spielt eine zentrale Rolle in der Oberflächenmessung.

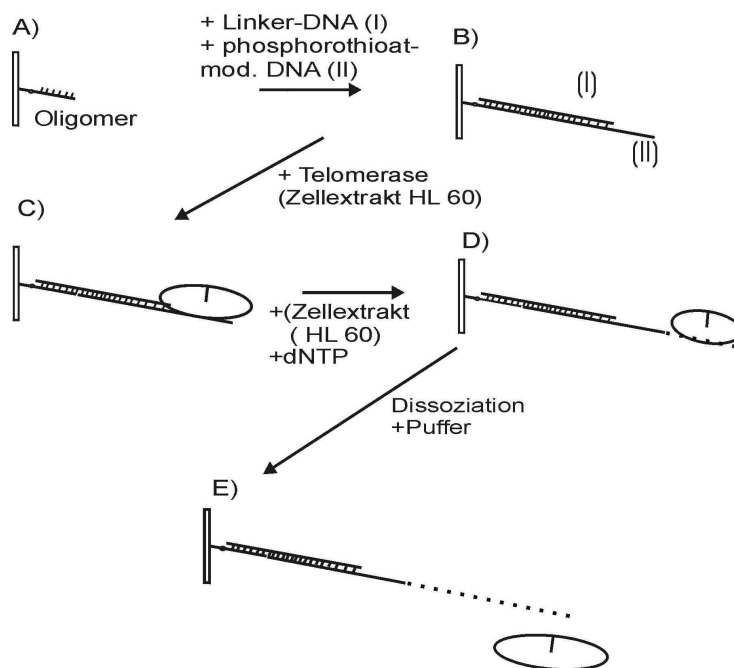


Abbildung 3.16 Aufbau der Oberfläche für labelfreie Telomerase-Messungen und Durchführung der Telomerase-Messung. Nach Immobilisierung des ersten Oligomers (A) wird die Linker-DNA und der PS-modifizierte Primer zugegeben (B). Durch Zugabe des telomerasehaltigen Zellextraktes der HL60 Zellen wird die Telomerase an den Primer gebunden (C). Die Reaktion wird durch Zugabe von Nukleotiden (dNTP) gestartet. Der Primer wird verlängert (gestrichelte Linie, D). Die Reaktion wird gestoppt durch Umschalten auf Laufpuffer. Dadurch dissoziiert das Enzym von der Oberfläche (E).

In Abbildung 3.16 werden die einzelnen Schritte zur Durchführung der Aktivitätsmessung verdeutlicht. Nach kovalenter Kopplung des ersten Oligomers (A) wird durch Zugabe der Linker-DNA und der phosphothioat-modifizierten DNA ein DNA/DNA-Hybrid auf der Oberfläche gebildet (B). Im nächsten Schritt wird ein Zellextrakt über die Oberfläche gegeben (C), um die Oberfläche mit Telomerase zu beladen. Dann wird durch Zugabe des Nukleotid-Mixes die Synthesereaktion

gestartet (D) und der Primer verlängert. Nach Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von Puffer dissoziiert das Enzym von dem verlängerten Primer (D). Auf der Oberfläche bleiben nur das Hybrid der DNA mit dem durch die Telomerase verlängerten phosphothioat-modifizierten Primer zurück.

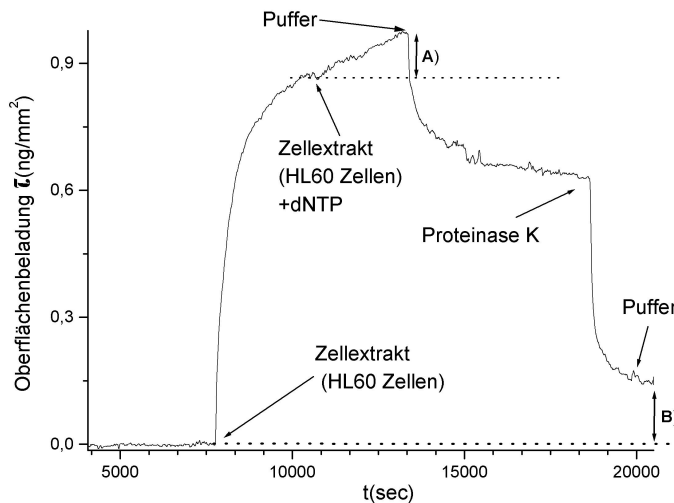


Abbildung 3.17 Aktivitätsmessung der Telomerase an immobilisierten phosphothioat-modifizierten Primern auf dem Gitterkoppler. Nach der Zugabe des Zellextraktes wird ein Bindungsvorgang beobachtet. Die Strangverlängerung wird durch Zugabe der dNTP gestartet. Durch Umschalten auf Laufpuffer wird die Reaktion gestoppt und das Enzym dissoziiert von der Oberfläche. Proteinase K entfernt von der Oberfläche Zellpartikel und es bleibt der verlängerte Strang auf der Oberfläche zurück. Der Abstand (B) entspricht der Menge an verlängertem Strang auf der Oberfläche durch das Enzym (Abstand A).

In Abbildung 3.17 wird die Aktivitätsmessung der Telomerase in Echtzeit am immobilisierten Primer dargestellt. Im ersten Schritt wird nur das Zellextrakt auf die Oberfläche gegeben und ein Bindungsvorgang beobachtet. Dabei binden sowohl das Enzym als auch Teile des Zellextraktes. Dies verhindert die Bestimmung der gebundenen Menge an Telomerase. Nach Erreichen einer Plateauphase, die den Abschluss der Bindung zeigt, werden zu dem Zellextrakt dNTPs zugegeben. Dies markiert den Startpunkt der enzymatischen Strangverlängerung. Der nachfolgende lineare Anstieg des Messsignals zeigt den Einbau der Nukleotide in den DNA-Strang. Die Reaktion wird abgestoppt durch das Umschalten auf Laufpuffer. Das Enzym dissoziiert von der Oberfläche. Die Höhe des linearen Abschnittes (A) zeigt die Menge der eingebauten Nukleotide an. Nach der Dissoziation des Enzyms wird die Oberfläche mit Proteinase K von Zellpartikeln und Zellinhaltsstoffen gereinigt, so dass nur der verlängerte Primer auf der Oberfläche zurückbleibt. Die Differenz zwischen dem Anfangs- und dem Endsignal (B) wird durch den verlängerten Primer

verursacht. Dabei entspricht diese Differenz (B) dem durch die Menge an eingebauten Nukleotiden erzeugten Messsignal (A).

Zwecks weiterer Verifizierung dieses Ergebnisses wird der identische Versuch an einem nicht-modifizierten Primer durchgeführt, der ebenfalls auf der Oberfläche immobilisiert wird. Die Sequenz dieses Primers entspricht der des im TRAP-Assay eingesetzten Oligomers.

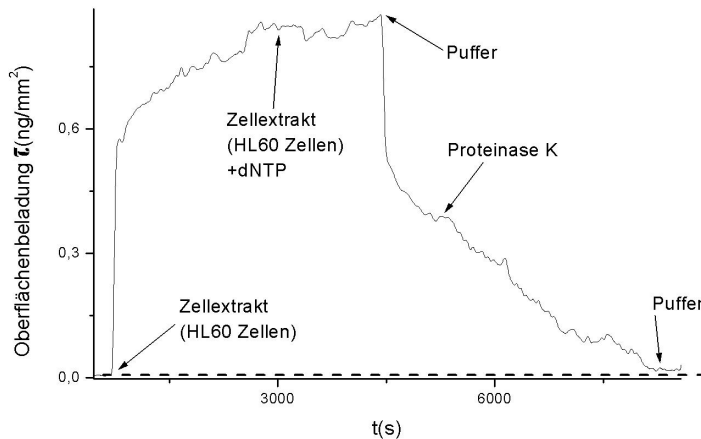


Abbildung 3.18 Aktivitätsmessung der Telomerase am unmodifizierten immobilisierten Primer. Nach der Zugabe von Zellextrakt wird die Bindung von Telomerase und Zellkomponenten beobachtet. Nach Erreichen einer Plateauphase, dem Ende der Bindung wird die enzymatische Strangverlängerung durch Zugabe der dNTP gestartet. Die Reaktion wird abgestoppt durch Umschalten auf Laufpuffer und das Enzym dissoziiert. Mit Proteinase K werden alle gebundenen Enzyme und Zellkomponenten von der Oberfläche entfernt und zurück bleibt der Primer. Das Signal geht auf das ursprüngliche Anfangs-Niveau (gestrichelte Linie) zurück. Es wurde keine Aktivität gemessen.

In Abbildung 3.18 wird der Reaktionsverlauf der Telomerase an einem immobilisierten nicht-modifizierten Primer auf der Oberfläche gezeigt. Zuerst wird der Bindungsvorgang beobachtet. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass neben dem Enzym auch Zellkomponenten auf der Oberfläche binden. Der Vergleich der Abbildungen 3.17 und 3.18 zeigt, dass ein Signal der Zellkomponenten ca. 70% des Bindungssignals mit dem phosphothioat-modifizierten Primer beträgt.

Die enzymatische Reaktion wird durch die Zugabe der Nukleotide, dNTPs, gestartet. Im Gegensatz zu Abbildung 3.17 wird hier kein linearer Anstieg des Messsignals beobachtet, der auf eine sichtbare Strangverlängerung hinweisen würde. Nach Umschalten auf Laufpuffer und Reinigen der Oberfläche mit Proteinase K wird keine Differenz zwischen dem Anfangs- und dem Endmesssignal beobachtet. Es gibt somit keine Hinweise auf eine Verlängerung des Primers durch die Telomerase.

Bei allen Messungen wird Zellextrakt eingesetzt. Es ist daher denkbar, dass auch andere DNA-synthetisierende Enzyme auf der Oberfläche aktiv sein könnten. Die Reaktionsbedingungen auf der Oberfläche sind allerdings durch den einzelsträngigen Primer so gewählt, dass Template-abhängige Polymerasen keine Synthese durchführen sollten. Terminale Transferasen verlängern auch DNA-Stränge durch Anhängen von poly-dA-Sequenzen. Damit dies ausgeschlossen werden konnte, wurde nur die Nukleotide dATP (Desoxyadenosintri-phosphat) und dCTP (Desoxycytosintri-phosphat) hinzugegeben (Abb. 3.19.b).

Auch der inhibitorische Einfluss von PNA (Peptide Nucleic Acid), (Norton et al., 1996) auf die Telomerase wird sichtbar (Abb. 3.19.c). Dazu wird Zellextrakt von HL60 Zellen mit PNA einige Zeit vor Messbeginn inkubiert. Anschließend wird an immobilisierten modifizierten Primern die Telomeraseaktivität getestet. Es wird der Ausschnitt der Kurvenverläufe nach dem Start der enzymatischen Reaktion, d.h. nach der Zugabe der Nukleotide, gezeigt.

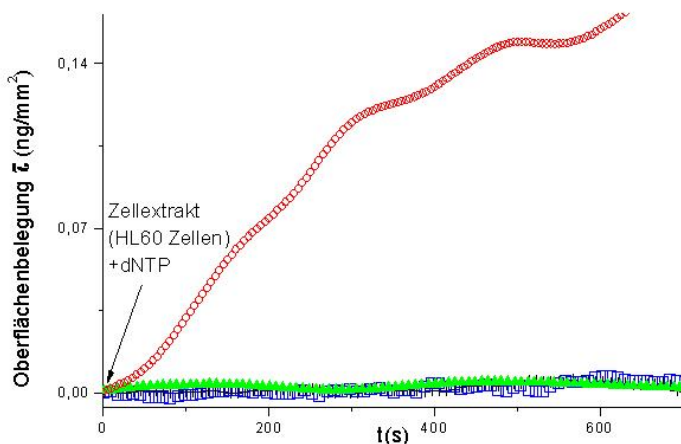


Abbildung 3.19 Vergleich der Aktivitätsmessung der Telomerase mit Kontrollmessungen auf der Oberfläche.

- a)** Telomeraseaktivität am immobilisierten PS-mod. Primer mit dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (○)
- b)** Telomeraseaktivität am immobilisierten PS-mod. Primer unter Zugabe von verändertem Nukleotid-Mix(dCTP, dATP) (□)
- c)** Telomeraseaktivität am immobilisierten PS-mod. Primer unter Zugabe von PNA im Reaktions-Mix (+)
- d)** Telomeraseaktivität am immobilisierten DNA Primer unter Zugabe von Nukleotid-Mix (▲)

Der Startpunkt markiert den Beginn der enzymatischen Strangverlängerung. Es werden die Daten der Kontrollexperimente mit denen der Messungen (○) verglichen und die positiven Ergebnisse verifiziert. Bei dem Ansatz (□) wurden nur die

Nukleotide dATP und dCTP zugegeben. Es wurde keine Aktivität beobachtet. Somit wurde die Aktivität von Transferasen ausgeschlossen, die andernfalls einen Anstieg des Signals durch ihre Aktivität erzeugt hätten.

Der Einsatz der PNA (+) bestätigt, dass die Strangverlängerung auf die Aktivität der Telomerase zurückzuführen ist, da kein Anstieg des Signals bei diesem Ansatz zu beobachten ist. Die Immobilisierung des Primers, der auch im TRAP-Assay verwendet wird, zeigt ebenfalls keine messbare Aktivität (▲) im direkten Vergleich mit der gemessenen Aktivität am phosphothioat-modifizierten Primer (o). Das unterstreicht den aktivitätssteigernden Effekt der chemischen Modifizierung des Primerrückgrats.

Die Auswertung der Experimente auf der Sensoroberfläche ergaben eine Turn-Over-Rate für die Telomerase von 1 Nukleotid/min. Der Wert, der in Lösung mit dem TRAP-Assay bestimmt wurde, betrug 2 Nukleotide/min. Der Grund für die niedrigere Rate bei den Oberflächenmessungen liegt in der Reaktionstemperatur. Gründe für diese unterschiedlichen Werte sind in Oberflächeneffekten und in unterschiedlichen Reaktionstemperaturen zu suchen.

In Abbildung 3.20 ist der Einfluss der Temperatur auf die Telomeraseaktivität dargestellt.

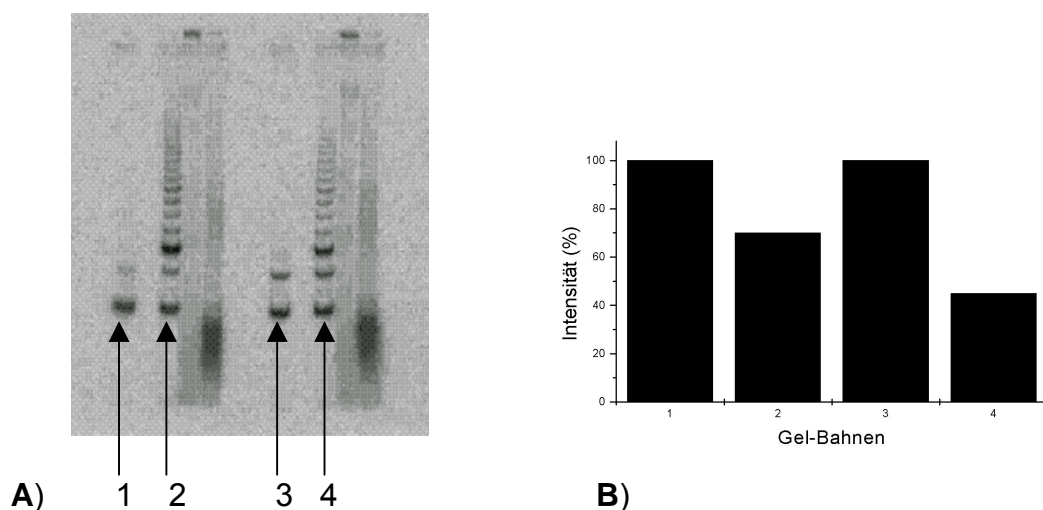


Abbildung 3.20 Vergleich der Telomeraseaktivität im Gel (A) von 10^3 Zellen im TRAP-Assay bei unterschiedlichen Reaktionstemperaturen. Der Intensitätsunterschied der Banden (B) in den Bahnen 2 und 4 liegt bei 30%:

Bahn 1-2 (Reaktionstemp. 30°C, 30 min)

Bahn 1: Chaps-Lyse-Puffer, interner Standard

Bahn 2: TRAP-TS-Puffer

Bahn 3-4 (Reaktionstemp. 21°C, 30 min)

Bahn 3: Chaps-Lyse-Puffer, interner Standard

Bahn 4: TRAP-TS-Primer

In Abbildung 3.20A werden die Aktivitäten der Telomerase bei 30°C und bei 21°C miteinander verglichen. In Bahn 1 und 3 ist der interne Standard zu erkennen. In den Bahnen 2 und 4 wird die Telomeraseaktivität gezeigt am TS-Primer, dem nicht-modifizierten Primer, der standardmäßig im TRAP-Assay verwendet wird. Der Vergleich der Intensitäten in den unterschiedlichen Gelbahnen in Abbildung 3.20B zeigt, dass die Reduzierung der Reaktionstemperatur von 30°C auf 21°C zu einer Aktivitätsminderung des Enzyms von 30% führt.

Die Aktivität der Telomerase wurde auf der Oberfläche eines optischen Sensors direkt beobachtet, ohne zusätzliche Marker oder Amplifizierungsschritte verwenden zu müssen. Dabei ist der angewandte Biosensor so spezifisch, dass die Messungen im Zellextrakt ohne Aufreinigung der Proben durchgeführt werden konnten. Der Vergleich der Aktivitätsmessungen mit den unterschiedlichen Kontrollmessungen verdeutlicht die Effizienz des Messsystems. Das Ergebnis der Aktivitätsmessung am nicht-modifizierten Primer zeigt die Grenzen der Sensitivität des Gitterkopplers. Der optische Sensor detektiert diese Aktivität nicht auf der Oberfläche, während in Lösung die Verlängerung dieses Primers durch die Telomerase gezeigt wird und die Funktionsfähigkeit dieses Primers unterstreicht (Abbildung 3.14). Durch Verwendung von Fluoreszenz-Markern soll die Nachweisgrenze des optischen Sensors noch weiter nach unten verschoben werden. Die Anwendung dieser Marker und die Verwendung geeigneter Messsysteme werden in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben.

3.6.3 Fluoreszenz-Messungen mit faseroptischen Sensoren

Die Messung der Telomeraseaktivität mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden und Nukleotiden sollte die Sensitivität dieses sensorischen Ansatzes erhöhen. Dazu wurde die in Abschnitt 2.1.3 beschriebene faseroptische Sensorkonfiguration verwendet.

Die verwendeten Oligonukleotide werden in Abschnitt 2.5.2 dargestellt.

In Anlehnung an das Versuchsprinzip der labelfreien Messung soll die Aktivität der Telomerase über den Einbau von FITC-markierten dUTPs detektiert werden. Das Schema, das diesen Versuchen zugrunde liegt, zeigt Abbildung 3.21.

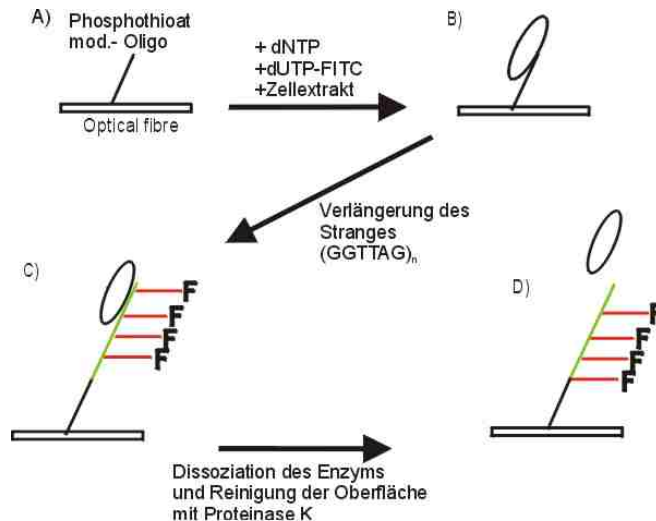


Abbildung 3.21 Schematische Darstellung des Einbaus von gelabelten Nucleotiden(dUTP-FITC) neben den ungelabelten Nucleotiden(dATP, dGTP, dTTP). Nach Immobilisierung des PS-modifizierten Primers (A) wird der Reaktionsmix, bestehend aus Zellextrakt der HL60 Zellen, den unmarkierten Nucleotiden und den markierten dUTPs auf die Oberfläche gegeben (B). Die Strangsynthese wird durchgeführt (C). Durch Umschalten auf Laufpuffer wird die Reaktion beendet, das Enzym dissoziiert und die Sensoroberfläche wird durch Proteinase K gereinigt und die enzymatische Aktivität wird detektiert durch die eingebauten markierten Nucleotide (D).

Zusätzlich zu unter 3.5.2 beschriebenem Versuchsablauf wurde dem Reaktionsmix FITC-dUTPs zugefügt. Dies führt zur Bindung des Enzyms am Primer (B) und zum gleichzeitigen Start der Strangverlängerung (C). Die Reaktion wird durch Umschalten von Reaktionsmix auf Laufpuffer abgestoppt. Zusätzlich wird die Sensoroberfläche mit Proteinase K von Zellkomponenten und Protein gereinigt. Da der Sensor nur Fluoreszenz detektiert, können die einzelnen Schritte nicht verfolgt werden. Auf der Oberfläche sollte nur der verlängerte Strang mit eingebauten markierten Nucleotiden zurückbleiben (D). Dieser wird durch die Differenz der Fluoreszenzintensität vor und nach der Messung detektiert.

In Abbildung 3.22 wird das Ergebniss dieses Versuchs gezeigt.

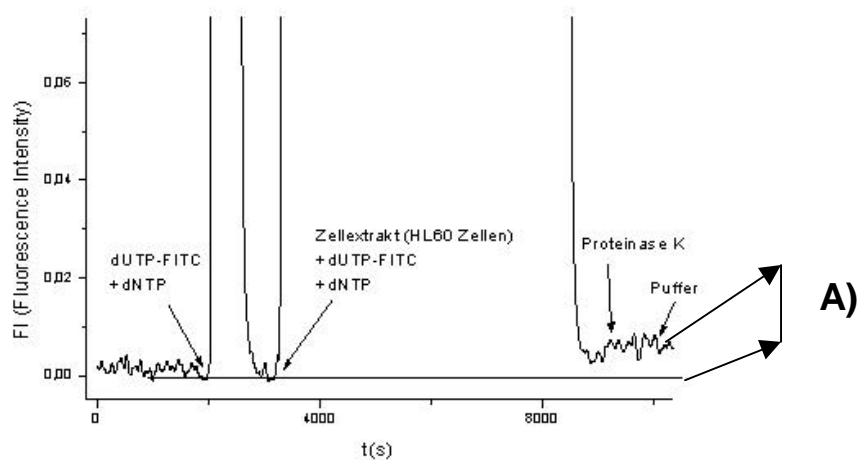


Abbildung 3.22 Messung der Telomeraseaktivität auf der faseroptischen Sensoroberfläche. Zuerst wird Nukleotid-Mix (dNTP, dUTP-FITC) auf die Oberfläche gegeben. Anschließend startet die Reaktion durch Zugabe von Zellextrakt, dNTP und dUTP-FITC. Durch Umschalten auf Laufpuffer wird die Reaktion gestoppt und der Reaktionsmix von der Oberfläche gespült. Die Oberfläche wird gereinigt durch Proteinase K. Die eingebauten markierten Nukleotide ergeben die Differenz der Fluoreszenzintensität vor und nach der Reaktion (A).

In Abbildung 3.22 wird die Aktivität der Telomerase durch den Einbau markierter Nukleotide in den immobilisierten Primer gezeigt. Die Zugabe der Nukleotide vorweg ohne telomerasehaltiges Zellextrakt soll unspezifische Wechselwirkungen der Oberfläche und des Primers überprüfen. Nach dem Umschalten auf Laufpuffer wird dieser Reaktionsmix von der Oberfläche gespült und keinerlei Wechselwirkungen der Nukleotide mit dem optischen Sensor beobachtet. Im Anschluss daran startet die enzymatische Strangverlängerung durch Zugabe des Zellextraktes und des Nukleotidmixes (dUTP-FITC, dNTP). Der Anstieg der Fluoreszenz nach Ende der enzymatischen Reaktion und Reinigung der Oberfläche durch Proteinase K resultiert aus den eingebauten markierten Nukleotiden durch die Telomerase.

Diese Differenz liegt nur geringfügig über dem Signal-Rausch-Verhältnis. Das bedeutet, dass nur wenige FITC-dUTPs von der Telomerase eingebaut werden oder keine Strangverlängerung stattgefunden hat. Daher wird ein weiterer Ansatz gewählt, um die Aktivität der Telomerase eindeutig nachzuweisen. Der Nachweis erfolgt über eine FITC-markierte DNA-Sonde, die komplementär gegenüber dem neusynthetisierten Strang ist. Die Hybridisierung dieser linearen Sonde erfordert linearisierte Telomere. Telomere bilden aber aufgrund des hohen Guanin-Anteils

Tertiärstrukturen, sogenannte G-Quartette (Koeppel et al., 2001). Mit der Erhöhung der Reaktionstemperatur von 30°C auf 48°C wird deren Linearisierung erreicht. Der Versuchsablauf ist in Abbildung 3.23 gezeigt.

Auf eine Reinigung der Oberfläche durch Proteinase K kann hier und bei den nachfolgenden Messungen verzichtet werden. Im Gegensatz zu den Messungen im labelfreien System wird hier nur das FITC-markierte Molekül detektiert, so dass die Bindung von Enzym und Zellkomponenten keinen sichtbaren Einfluss auf das Messsignal hat.

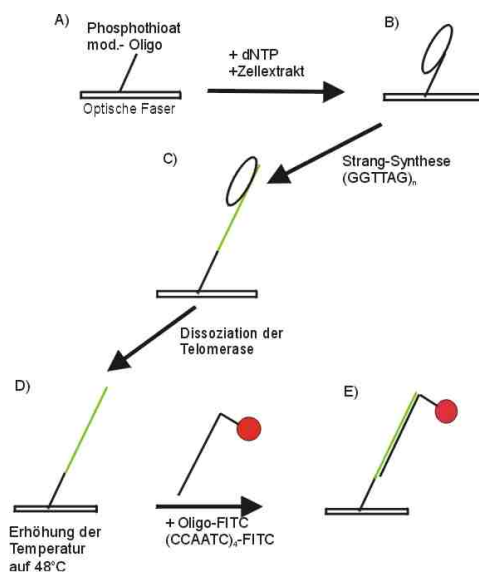


Abbildung 3.23 Darstellung des Ansatzes für den Nachweis der Telomeraseaktivität auf der Faser-Sensoroberfläche. Der PS-modifizierte Primer wird auf der Oberfläche immobilisiert (A). Die Reaktion wird gestartet durch Zugabe des Zellextraktes der HL60 Zellen und der Nukleotide (B). Nach Beendigung der Reaktion durch Zugabe von Laufpuffer dissoziiert das Enzym (C). Die Reaktionstemperatur wird erhöht auf 48°C (D) und die Strangverlängerung durch die FITC-markierte Sonde nachgewiesen (E).

Nach Immobilisierung des phosphothioat-modifizierten Primers (A) in Abbildung 3.23 wird das Reaktionsgemisch, bestehend aus dNTP und dem telomerasehaltigen Zellextrakt, auf die Oberfläche gegeben. Dies führt zur Bindung des Enzyms (B) und zur Strangverlängerung des Primers durch die Telomerase (C). Der Versuch wird beendet durch Umschalten auf den Laufpuffer. Dies führt auch zur Dissoziation der Telomerase (D). Anschließend wird die Reaktionstemperatur auf 48°C erhöht (D) und die komplementäre FITC-markierte DNA-Sonde auf die Oberfläche gegeben. Durch Hybridisierung der Sonde mit dem verlängerten Primer wird nachgewiesen, dass die Telomerase aktiv war(E).

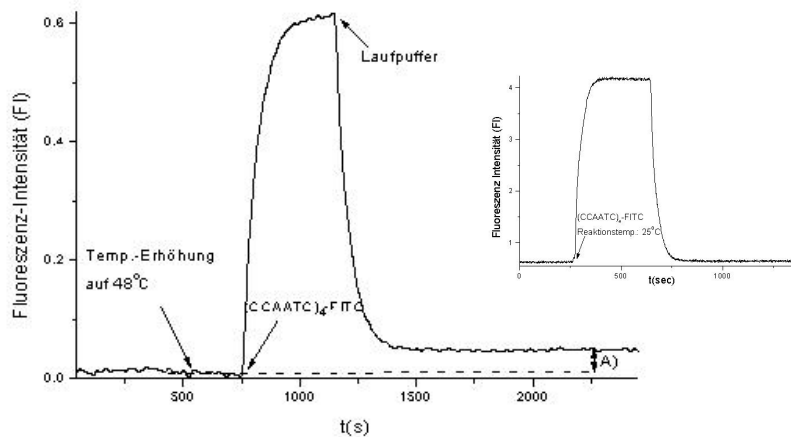


Abbildung 3.24 Messung der Telomeraseaktivität auf der faseroptischen Sensoroberfläche. Die FITC-markierte Sonde, $(\text{CCAATC})_4\text{-FITC}$, wird bei 48°C Reaktionstemperatur auf die Oberfläche gegeben, nachdem die enzymatische Reaktion mit Zellextrakt, dNTP und dUTP-FITC bei 30°C auf der Oberfläche abgelaufen ist. Nach Zugabe der Sonde wird eine erhöhte Fluoreszenzintensität beobachtet (A), die Sonde hat an die neusynthetisierten Telomere gebunden. Im Inset wird gezeigt, dass die Sonde bei 25°C keine unspezifische Wechselwirkung mit dem immobilisierten Oligomer eingeht.

Die Abbildung 3.24 zeigt die Hybridisierung des verlängerten Primers auf der Oberfläche mit der FITC-markierten Sonde. Dabei ist zu bemerken, dass die Hybridisierung nach dem Ablauf der enzymatischen Reaktion erst erfolgt. Diese Reaktion besteht darin, dass neben dem Zellextrakt der HL60-Zellen auch dNTPs und dUTP-FITC dazugegeben wird, analog der Beschreibung bei Abbildung 3.20. Nach Beendigung durch Umschalten auf Laufpuffer wird die Reaktionstemperatur auf 48°C erhöht und die Sonde zugegeben. Im Anschluss daran wird eine erhöhte Fluoreszenzintensität detektiert (A). Dieser Anstieg ist auf die Menge an hybridisierter FITC-DNA zurückzuführen und liefert den Nachweis für die erfolgte Verlängerung des immobilisierten Primers durch die Telomerase. Zugleich demonstriert dieses Ergebnis die erfolgreiche Linearisierung der G-Quartette durch die erhöhte Reaktionstemperatur. Außerdem wurde gezeigt, dass FITC-dUTP nur in geringen Mengen eingebaut wird. Im Inset der Abbildung 3.23 wird gezeigt, dass keine unspezifischen Wechselwirkungen zwischen der Sonde und dem immobilisierten Oligomer auftreten.

Auf diesem Ergebnis aufbauend wird die Versuchsdurchführung optimiert. Die neuen Ergebnisse werden in Abbildung 3.25 gezeigt.

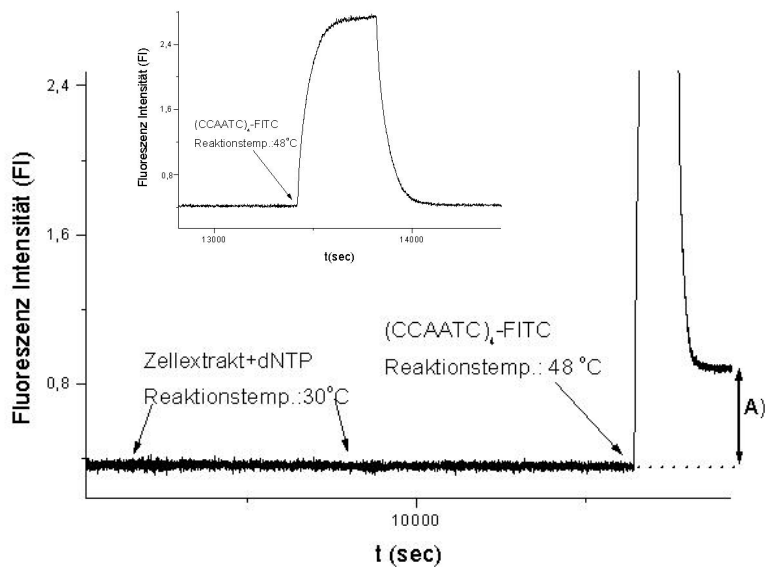


Abbildung 3.25 Messung der Telomeraseaktivität auf der faseroptischen Sensoroberfläche. Die enzymatische Reaktion läuft nur mit unmarkierten dNTPs bei 30°C ab. Nach dem Ende der Reaktion wird die Reaktionstemperatur auf 48°C erhöht und die FITC-markierte DNA-Sonde zugegeben. Nachdem die überschüssige Sonde von der Oberfläche entfernt wird, ist ein Hybridisierungssignal sichtbar (A). Im Inset wird in einem Kontrollexperiment gezeigt, dass unspezifische Wechselwirkung der markierten Sonde mit der Oberfläche und dem Primer nicht auftreten. Dazu wird vor der enzymatischen Reaktion die markierte Sonde auf die Oberfläche gegeben. Es wird kein Bindungssignal beobachtet.

In Abbildung 3.25 wird die Aktivität der Telomerase über die Hybridisierung der markierten Sonde mit dem verlängerten Primer gezeigt. Dieser Ansatz unterscheidet sich von den vorherigen Experimenten durch das Weglassen der markierten Nukleotide. Die enzymatische Reaktion verläuft nur mit den unmarkierten Nukleotiden. Danach wird die Temperatur des Systems auf die 48°C erhöht und die Sonde hinzugegeben. Es wird ein höheres Hybridisierungssignal zwischen Sonde und Primer beobachtet als in Abbildung 3.24. Im Inset der Abbildung 3.25 ist das Ergebnis eines Kontrollexperimentes gezeigt: Die markierte Sonde wurde auf die Oberfläche mit dem immobilisierten Primer gegeben, bevor die Telomerase den Primer verlängert. Da hierbei kein Hybridisierungssignal zu beobachten ist, werden unspezifische Wechselwirkungen der Sonde mit der Oberfläche und dem Primer als Ursache für den Anstieg der Fluoreszenzintensität ausgeschlossen. Die Hybridisierung ist ein Nachweis für die enzymatische Primerverlängerung und somit für die Aktivität der Telomerase.

Vergleicht man die Ergebnisse der Abbildungen 3.24 und Abb. 3.25, ergeben sich deutliche Unterschiede in der Höhe des Anstieges der Fluoreszenz nach erfolgter Hybridisierung. Bei Abbildung 3.24 wird ein Intensitätsanstieg von $0,03 \pm 0,005$ FI gemessen, während in Abbildung 3.25 der Anstieg $0,43 \pm 0,005$ FI betrug. Die Reduktion der Syntheseleistung der Telomerase um den Faktor 10 tritt bei der Anwesenheit der markierten Nukleotide im Reaktionsmix auf. Diese besitzen eine inhibitorische Wirkung auf das Enzym. Ähnliche Erkenntnisse wurden bereits im Zusammenhang mit anderen Polymerasen gefunden und bestätigen, dass markierte Nukleotide aufgrund sterischer Effekte nicht nur kein optimales Substrat für Polymerasen darstellen (Lannert et al., 2001), sondern auch noch inhibitorisch wirken.

3.6.4 Messen der Telomeraseaktivität in NIH 3T3-Zellen

Mit Hilfe der HL60 Zellen, die als Modell-Zell-Linie dienen, wurde somit ein geeignetes Assay-System entwickelt, das die Telomeraseaktivität ohne Amplifizierungsschritt im Zellextrakt detektiert. Das entwickelte System wird nun eingesetzt, um andere Zellen auf ihre Telomeraseaktivität zu überprüfen. Ziel ist es, den Einfluss kanzerogener Substanzen auf die Telomeraseaktivität dieser Zellen zu beobachten. Im Zuge der Validierung des Testsystems wird eine bekannte Kombination von Zell-Linie und Kanzerogen verwendet. In bereits veröffentlichten Protokollen wurde ein induktiver Effekt von N-Nitroso-N-Methylharnstoff beschrieben (Shiner et al., 1988), (Varon et al., 1997), (Rhim et al., 1997), (Boley et al., 2000). In diesen Arbeiten wurde die Telomerase bereits auf ihre Eigenschaft als Tumormarker untersucht, indem durch das Testkanzerogen Tumore in den Zellen erzeugt wurden. Die Detektion dieses Effektes durch das neu-entwickelte sensorische System war Hintergrund dieses Abschnittes.

Die Zell-Linie NIH 3T3 weist eine sehr geringe Telomeraseaktivität auf. Die Inkubation mit kanzerogen wirkenden Chemikalien wie N-Nitroso-N-Methylharnstoff führt zu einer deutlichen Erhöhung der Telomeraseaktivität. Dieser Vorgang wird als Induktion bezeichnet und dient dazu, das kanzerogene Potential neuer Substanzen zu klassifizieren.

Die Analyse der Telomeraseaktivität erfordert eine hohe Sensitivität. Durch die Verwendung von Fluorophoren hat der faseroptische Ansatz eine höhere Sensitivität gegenüber dem Ansatz am Gitterkoppler. Daher erfolgt die Detektion der Telomeraseaktivität durch Hybridisierung mit der markierten Sonde. Die Ergebnisse der Induktion bei den Zellen NIH 3T3 sind in Abbildung 3.26 dargestellt.

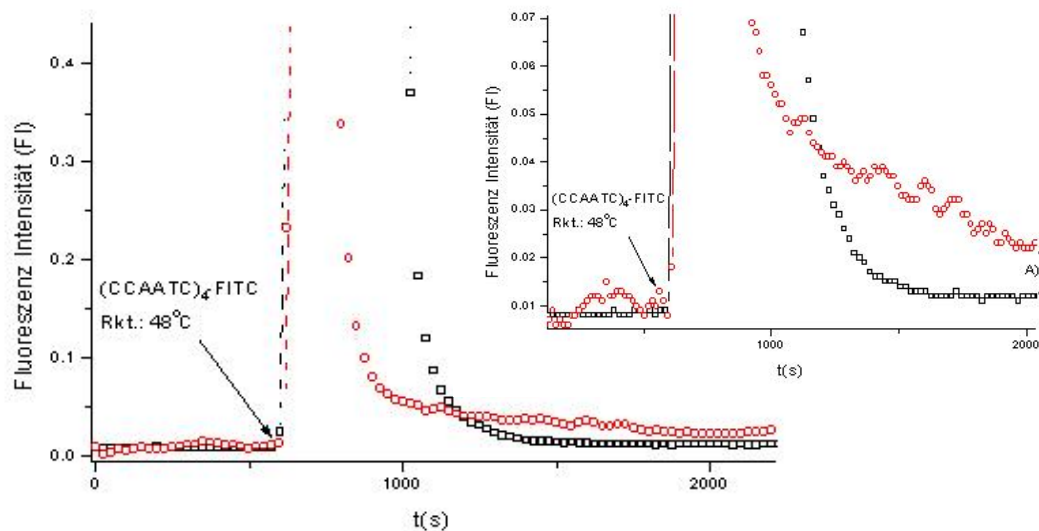


Abbildung 3.26 Messung der Telomeraseaktivität in NIH 3T3-Zellen vor und nach der Induktion durch N-Nitroso-N-methylharnstoff induzierte NIH 3T3-Zellen. Nach Zugabe der FITC-markierten Sonde wird in den nicht-induzierten NIH 3T3-Zellen keine Hybridisierung beobachtet (□). In den induzierten Zellen wird die Aktivität der Telomerase durch ein Hybridisierungssignal nachgewiesen (o). Im Inset ist der Vergleich der Messsignale in größerem Maßstab dargestellt. Die Differenz zwischen den beiden Signalverläufen (A) zeigt den Grad der Induktion und den Anstieg der Telomeraseaktivität durch das Kanzerogen.

In Abbildung 3.26 wird die Induktion von NIH 3T3 Zellen durch das Kanzerogen N-Nitroso-N-Methylharnstoff gezeigt (□). Dazu wurden zuerst die nicht-induzierten Zellen auf Telomeraseaktivität getestet. Dies erfolgte durch die Hybridisierungsversuche mit der markierten Sonde. Im Falle dieser Zellen wurde nur sehr geringe Aktivität detektiert. Der Anstieg der Fluoreszenzintensität betrug $0,007 \pm 0,005$ FI. Nach der Induktion der Zellen wurde ein deutlich höherer Anstieg des Messsignals beobachtet (o). Das gemessene Signal betrug $0,015 \pm 0,005$ FI und liegt um Faktor 2 höher als bei den nicht-induzierten Zellen. Dabei wird deutlich, dass

für eine zuverlässige Aussage über die kanzerogene Wirkung von Stoffen vergleichende Messungen zwischen induzierten und nicht-induzierten Zellen essentiell sind, da die Absolutwerte nur geringfügig über dem Signal-Rausch-Verhältnis liegen. Darüberhinaus kann auch in nicht-induzierten Zellen eine Telomeraseaktivität bereits gemessen werden, die bei der Analyse auf kanzerogene Wirkung von Substanzen berücksichtigt werden muss.

3.7 Zusammenfassung

1. Die Aktivität der Telomerase an immobilisierten Primern wurde ohne weitere Amplifizierungsschritte, wie z.B. PCR, beobachtet und im Zellextrakt direkt gemessen. Dabei waren sowohl labelfreie wie auch Ansätze mit Fluoreszenz-Label erfolgreich.
2. Bei dem labelfreien Ansatz wurde eine Turn-Over-Rate der Telomerase von 1 Nukleotide/min ermittelt. In Lösung wurde eine Rate von 2 Nukleotide/min berechnet. Diese Unterschiede in der enzymatischen Reaktionsrate resultieren zum einen durch Oberflächeneffekte sowie zum anderen aus der niedrigen Reaktionstemperatur bei den Messungen auf der Oberfläche.
3. Bei den Ansätzen mit Fluoreszenz-Label wurden FITC-markierte Nukleotide, FITC-dUTPs, von dem Enzym nur in geringem Maße eingebaut. Der Nachweis der Telomerase-Aktivität erfolgte dann über Hybridisierung eines FITC-markierten 24mers, dessen Sequenz komplementär gegenüber dem verlängerten Primer ist. Die Hybridisierung wird durch die Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 48°C ermöglicht, um die Tertiärstrukturen, G-Quartette, des verlängerten Primers zu linearisieren. Das Vorhandensein dieser Strukturen dient als zusätzlicher Beweis für die Strangverlängerung durch die Telomerase auf der Oberfläche.
4. Die Anwesenheit markierter Nukleotide reduziert die Aktivität der Telomerase aufgrund der kovalent gekoppelten Fluorophore. Die FITC-dUTPs werden nicht nur kaum eingebaut, sondern scheinen auch inhibitorisch zu wirken (Lannert et al., 2001); (Schmidt et al., 2002).
5. Durch Substanzen mit kanzerogener Wirkung wird die Telomeraseaktivität in den Zellen NIH 3T3 erhöht, deren Telomeraseaktivität im nicht-induzierten Zustand niedrig ist. Die Induktion erfolgte durch das Kanzerogen N-Nitroso-N-Methylharnstoff und erhöhte die Telomeraseaktivität um den Faktor 2.

3.8 Diskussion

Die Analyse von Polymerasen auf Oberflächen von optischen Sensoren eröffnet neue Wege, diese Enzyme zu charakterisieren. Neben der Aufklärung ihrer Reaktionsmechanismen, können durch die Messung in Echtzeit sowohl die Reaktionsraten als auch Einflüsse von Wirkstoffen auf den Synthesevorgang von DNA beobachtet und bestimmt werden. Dazu müssen die Besonderheiten solcher Messungen auf Oberflächen an immobilisierten DNA-Strängen gegenüber Messungen in Lösung berücksichtigt werden. Anhand des bereits charakterisierten Modellenzym Klenow⁻-Fragment wurde ein analytisches Verfahren entwickelt, das den Einbau von Nukleotiden in einem immobilisierten DNA-Strang direkt verfolgt und auswertet.

In Tabelle 3.3 werden die ermittelten Daten mit Literaturwerten verglichen.

Messaufbau	Enzym	Anzahl der eingebauten Nukleotide/Zeit (Nukleotide/min)	Reaktions-Temperatur (°C)
Gitterkoppler	Klenow ⁻	3,4	25
BIACore 2000	Klenow ⁻	5,6	37
BIACore 2000 (Nilsson et al., 1995)	Wildtyp	15	37
Lösung (Poleskey et al., 1992)	Wildtyp	144	37

Tabelle 3.3 Vergleich der experimentellen Daten mit Literaturwerten

Die experimentell erhaltenen Werte liegen im Vergleich mit Literaturwerten eher im unteren Bereich, wobei dies auch in der Immobilisierung der DNA begründet liegt, die dazu führt, dass die Raten in Lösung und auf der Oberfläche um Faktor 50 divergieren. Beim Vergleich der Raten, die mit derselben Methode gemessen

wurden, liegen die Daten um Faktor 5 auseinander, wobei allerdings die Syntheseraten des Wildtyps mit den kinetischen Daten eines rekombinanten Enzyms verglichen werden.

Dabei wird in Kapitel 3.3 ein wesentlicher Vorteil dieser Methode gegenüber der Methode von Nilsson gezeigt. Durch die Trennung des Bindungsprozesses des Enzyms an die DNA und den Start der enzymatischen Reaktion wird die Menge des gebundenen und damit direkt in die DNA-Synthese involvierten Enzyms ermittelt, einem wichtigen Parameter, um die spezifische Synthese-Rate zu berechnen. Diese Möglichkeit der präziseren Quantifizierung der Synthese-Rate durch das neue Verfahren demonstriert den innovativen Charakter dieser Vorgehensweise zur enzymatischen Aktivitätsbestimmung.

Eine reale Anwendung des entwickelten Verfahrens stellt die Untersuchung des Enzyms Telomerase dar. Die HL60-Zellen haben nachweislich eine sehr hohe Telomeraseaktivität und dienen als Referenz für die Entwicklung des optischen Assays. Dabei fließen die im Umgang mit dem Klenow⁺ gemachten Kenntnisse in dieses Verfahren mit ein.

Die Verwendung verschiedener optischer Messmethoden ermöglicht die Detektion der Telomeraseaktivität und die Entwicklung einer effektiven Analytik. Der Aufbau des Sensorelements ist so gewählt, dass die Einbausignale der Telomerase selbst gemessen werden. In den herkömmlichen Assays wird durch Einsatz einer zusätzlichen DNA-Polymerase im Rahmen einer PCR das Signal der Telomerase erneut verstärkt und somit messbar. Dieser 2. Schritt wird beim optischen Sensor überflüssig.

Die Strangverlängerung auf der Oberfläche wird in Echtzeit an einem gering modifizierten System beobachtet. Darüberhinaus ermöglicht dieses Messsystem Kontrollen, die unspezifische Wechselwirkungen als Ursache für die Signale ausschließen.

Die parallel verlaufende Detektion der Telomeraseaktivität auf Oberflächen mittels Fluorophoren führt zu einer Analytik, die reproduzierbare Ergebnisse ermöglicht. Die notwendige Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 48°C, um die Tertiärstrukturen, die sog. G-Quartette, des verlängerten Primers zu linearisieren, dient als zusätzlicher Beweis für die Strangverlängerung durch die Telomerase auf der Oberfläche. Der Nachweis der Telomeraseaktivität über Hybridisierung einer FITC-markierten Sonde

präsentiert einen empfindlichen, spezifischen Oberflächensensor für die Telomeraseaktivität.

Diese Fähigkeiten dieser Sensorik ermöglichen kostengünstigere, leichter zu handhabende Analysen der Telomeraseaktivität mit einem geringeren zeitlichem Aufwand. Die im Labor verwendete, derzeit gängige Methode für das Erfassen dieser Messgröße ist der TRAP-Assay. Der Vergleich der beiden Assays ergibt folgendes Bild in Tabelle 3.4:

	TRAP-Assay	Optischer Biosensor
Chemikalien, Marker	radioaktive Marker	markierungsfreies System, FITC-Markierungen
Analysezeit	1,5 Tage	2-4 h
Geräteaufwand	Temp-cycler, Gel-elektrophorese, komplexes Auslesegerät der radioaktiven Label im Gel	Gitterkopler, Faseroptik, beinhaltet auch die Auswertung
Sensitivität	10^3 Zellen	10^5 Zellen

Tabelle 3.4 Vergleich des TRAP-Assay mit dem optischen Assays

Die Tabelle 3.4 beschreibt deutlich die Vorteile, die der neue Ansatz beinhaltet. Dabei sticht heraus, dass die Vermeidung von radioaktiven Markern eine große Kostenreduktion bedeutet, da auch die gesamte Infrastruktur für Arbeiten mit radioaktiven Markern außer Acht gelassen werden kann. Die Analysezeit wird um ein Wesentliches verkürzt, wobei am Gitterkopler durch die direkte Messung die Analysezeit eher im unteren Bereich liegt. Beiden optischen Sensoren ist die Tatsache gemeinsam, dass sie, im Gegensatz zum TRAP-Verfahren, sowohl die Messungen wie die Analyse in einem Gerät durchführen. Die Auswertung der Reaktion erfordert auch keine aufwendigen Arbeitsschritte wie z.B. die Herstellung von Agarosegelen.

Durch die Kombination mit der PCR liegt die Nachweisgrenze beim TRAP deutlich um Faktor 100-1000 unter dem der optischen Sensoren. Dieser Punkt erweist sich nicht als Nachteil, da im medizinischen Bereich eher ausreichend große Mengen an Patientenproben verfügbar sind.

Die Fähigkeit dieser neuen Sensorik liegt nicht nur im Erfassen der vorhandenen Telomeraseaktivität in Zellen und somit in der Identifizierung von bekannten Tumorzellen wie den HL60 Zellen. Die Transformation von Nicht-Tumor-Zellen, wie der Zell-Linie NIH 3T3, d. h. die Transformation von telomerase-negativen in telomerase-positiven Zellen, wird durch kanzerogene Wirkstoffe wie N-Nitroso-N-Methylharnstoff aktiv ohne metabolische Aktivierung induziert.

Dieser Prozess wird durch den entwickelten Ansatz detektiert, der tumorfreie Zellen von tumorösen Zellen unterscheidet. Das Verfahren beweist somit sein Potential, den Anstieg der Telomeraseaktivität bereits in einem frühen Stadium zu detektieren. Vor dem Hintergrund der Verbindung zwischen Telomeraseaktivität und Tumorentwicklung in Zellen, zeigt sich hier ein erfolgversprechender Assay, der in der Früherkennung von Tumoren eingesetzt werden kann.

4. Ausblick

Die Arbeit zeigt eine Anwendung von optischen Sensoren, die es erlaubt, die Wechselwirkung von DNA und Proteinen noch genauer zu charakterisieren als, es durch Bindungsstudien bereits möglich ist. Die Analyse der Funktion eines Proteins durch herkömmliche biochemische und molekularbiologische Techniken umfasst mehrere Arbeitsschritte wie z.B. Aufreingen und Aufkonzentrieren des Analyten, Signalgenerierung durch Amplifizierungsschritte wie der PCR und Auswertung durch Aufreinigen des Reaktionsmixes im Gel. Die in dieser Arbeit entwickelte und optimierte Methodik der Aktivitätsmessung von Proteinen ermöglicht eine Form der *in-vitro* Diagnose, die weniger aufwendig und kostengünstiger sein kann. Zudem bieten sich hier Möglichkeiten für eine weitere Miniaturisierung der Verfahren und die Übertragung der Einzelmessung in Hochdurchsatz-Systeme. Ein höherer Durchsatz und Parallelisierung kann in der Entwicklung von Protein-Biochip-Technologien münden, die Proteine und damit die funktionellen Äquivalente der Gene untersuchen. Ein bedeutendes Problem bei der technologischen Entwicklung von Proteinbiochips stellt die Kopplung der Proteine auf die Oberfläche des Trägermaterials dar, bei der die Proteine in ihrer Funktion nicht beeinträchtigt werden sollen. Daher müssen die unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften der Proteine berücksichtigt werden im Gegensatz zu der Kopplung von Nukleinsäuren bei den DNA-Biochips. Bei nukleinsäuremodifizierenden Enzymen lässt sich dieses Problem leichter lösen, indem die Kopplung der Proteine über die Bindung an immobilisierter DNA erfolgt. Dadurch wird die Funktionalität der Enzyme nicht wesentlich beeinträchtigt, was durch die direkt anschließenden Aktivitätstests am Rezeptormolekül, das gleichzeitig auch als Substrat dient, bestätigt wird. Der weitere Vorteil dieser Messanordnung liegt darin, dass annähernd reale Reaktionsbedingungen auf den Oberflächen erzeugt werden, die reproduzierbare Ergebnisse der Enzymaktivität mit hoher Aussagekraft liefern. Der Beweis dafür sind die Aktivitätsmessungen der Telomerase, die direkt im Zellextrakt erfolgen und Auskunft geben über den Grad der Induktion von Zellen. Darauf aufbauend kann eine *in-vitro* Analytik zur Früherkennung von Tumoren in Zellen oder zur Einschätzung des kanzerogenen Potentials von Substanzen weiterentwickelt werden. Die Kombination des Detektionsverfahren und der Messung der Telomeraseaktivität ergeben einen neuartigen Tumormarker, der in der Entwicklung von individualisierten Chemotherapien eine zentrale Rolle spielen

wird. Dabei kann die Wirkung von Zytostatika auf Tumore verschiedener Patienten analysiert und die Therapie individuell den Bedürfnissen jedes Einzelnen angepasst werden, was zu einer effektiveren, schnelleren Behandlung führen kann.

Die dargestellten Untersuchungen zeigen das Potential neuer Oberflächenverfahren zur Analyse von Proteinaktivitätsmessung, die u.a. durch Echtzeitmessungen und geringen Bedarf an Aufarbeitung der Proben eine effiziente, konkurrenzfähige Alternative zu den konventionellen biochemischen Verfahren darstellt. Die vorgestellten *in-vitro* Messverfahren bieten auch den Vorteil der Verfügbarkeit von Test- und Validierungssystemen für weitere Schritte, z.B. in der Medikamentenentwicklung oder bei der Charakterisierung von Mutationen sowohl auf Seiten der Enzyme als auch auf Seiten der DNA. Diese Form der Festphasen-Sensoren besitzen bezüglich der Entwicklung diagnostischer und prognostischer Verfahren ein großes Potential.

5. Literatur

- > Alves, J., Pingoud, A., Haupt, W., Langowski, J., Peters, F., Maass, G., Wolff, C. (1984). "The influence of sequences adjacent to the recognition site on the cleavage of oligodeoxynucleotides by the EcoRI endonuclease." Eur. J. Biochem. **140**: 83-92.
- > Alves, J., C. Urbanke, et al. (1989). "Fluorescence stopped-flow kinetics of the cleavage of synthetic oligodeoxynucleotides by the EcoRI restriction endonuclease." Biochemistry **28**: 7879-7888.
- > Ames, B., Lee, F., Durston, W. (1973). "An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens." Proc.Natl.Acad.Sci.USA **70**: 782-786.
- > Andersen, J. S. and M. Mann (2000). "Functional genomics by mass spectrometry." FEBS Lett **480**(1): 25-31.
- > Arenkov, P., Kukhtin, A., Gemmell, A., Voloshchuk, S., Chupeeva, V., Mirzabekov, A. (2000). "Protein microchips: use for immunoassay and enzymatic reactions." Anal. Biochem. **278**: 123-131.
- > Autexier, C. (1999). "Telomerase as a possible target for anticancer therapy." Chem Biol **6**(11): R299-303.
- > Beattie, T. L., W. Zhou, et al. (1998). "Reconstitution of human telomerase activity in vitro." Curr Biol **8**(3): 177-80.
- > Bier, F. F., F. Kleinjung, et al. (2002). "Determination of the turnover number of the restriction endonuclease EcoRI using evanescent wave technology." Anal Bioanal Chem **372**(2): 308-13.
- > Bier, F. F., F. Kleinjung, et al. (1997). "Real-time measurement of nucleic-acid hybridization using evanescent-wave sensors: steps toward the genosensor." Sensors and Actuators B **38-39**: 78-82.
- > Blackburn, E. H. (1991). "Structures and functions of telomeres." Nature **350**: 569-573.
- > Blackburn, E. H. (2000). "Telomere states and cell fates." Nature **408**: 53-56.

- > Boley, S. E., T. P. McManus, et al. (2000). "Malignant transformation of human fibroblast cell strain MSU-1.1 by N- methyl-N-nitrosourea: evidence of elimination of p53 by homologous recombination." Cancer Res **60**(15): 4105-11.
- > Bradford, M. H. (1976). "A rapid and sensitive method for quantitation of microgramm quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal. Biochem. **205**: 22-26.
- > Buszewski, B., Jezierska, M., Welniak, M., Berek, D. (1998). "Survey and Trends in the preparation of chemically bonded silica phases for liquid chromatographic analysis." J. High resol. Chromatogr. **21**: 267-281.
- > Cech, T. R. (2000). "Life at the End of the Chromosome: Telomeres and Telomerase." Angew. Chem. Int. Ed. **39**: 34-43.
- > Chalmers, M. J. and S. J. Gaskell (2000). "Advances in mass spectrometry for proteome analysis." Curr Opin Biotechnol **11**(4): 384-90.
- > Choo, Y., Klug, A. (1994). "Toward a code for the interaction of zinc fingers with DNA:selection of randomized fingers displayed on phage." Proc.Natl.Acad.Sci.USA **91**: 11163-11167.
- > Christensen, C. B. V. (2002). "Arrays in biological and chemical analysis." Talanta **56**: 289-299.
- > Copeland, N. G. and G. M. Cooper (1979). "Transfection by exogenous and endogenous murine retrovirus DNAs." Cell **16**(2): 347-56.
- > Corey, D. R. (2002). "Telomerase inhibition, oligonucleotides, and clinical trials." Oncogene **21**: 631-637.
- > Cornish, V. W., Lin, H. (2002). "Screening- und Selektionsmethoden für die Analyse von Proteinfunktionen in großem Maßstab." Angew. Chem. **114**: 4580-4606.
- > Counter, C. M., Hirte, H.W., Bachetti,S., Harley, C.B. (1994). "Telomerase activity in human ovarian carcinoma." Proc. Natl Acad.Sci. USA **91**: 2900-2904.
- > Cwirla, S. E., Balasubramanian, P., Duffin, D.J., Wagstrom, C.R., Gates, C.M., Singer,S.C., Davies, A.M., Tansik, R.L., Mattheakis, L.C., Boytos, C.M., Schatz, P.J., Baccanari, Wrighton, N.C., Barrett, R.W., Dower, W.J. (1997). "Peptide Agonist of the Thrombopoietin Receptor as Potent as the Natural Cytokine." Science **276**: 1696-1699.
- > Döring, M. (1991). Flüssigkeiten mikrofein dosieren. München, Carl Hauser Verlag.

- > Elenbaas, B., L. Spirio, et al. (2001). "Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells." Genes Dev **15**(1): 50-65.
- > Emili, A. Q., Cagney, G. (2000). "Large-scale functional analysis using peptide or protein arrays." Nat. Biotechnol. **18**: 393-397.
- > Fan, J. B., X. Chen, et al. (2000). "Parallel genotyping of human SNPs using generic high-density oligonucleotide tag arrays." Genome Res **10**(6): 853-60.
- > Feng, J., W. D. Funk, et al. (1995). "The RNA component of human telomerase." Science **269**: 1236-41.
- > Fernandez Romero, J. M., M. Stiene, et al. (1998). "Application of screen-printed electrodes as transducers in affinity flow-through sensor systems." Biosens Bioelectron **13**(10): 1107-15.
- > Frimme, M. (1986). Pharmakologie und Toxikologie, Lehrbuch für Veterinärmediziner und Naturwissenschaftler. Gießen, Schattauer. Stuttgart, New York.
- > Gaudernack, G. (2001). Telomerase vaccines: Targeting a "universal" cancer antigen. Europ. J. of cancer.
- > Ge, H. (2000). "UPA, a universal protein array system for quantitative detection of protein-protein, protein-DNA, protein-RNA and protein-ligand interactions." Nucleic Acids Res **28**(2): e3.
- > Gerry, N. P., N. E. Witowski, et al. (1999). "Universal DNA microarray method for multiplex detection of low abundance point mutations." J Mol Biol **292**(2): 251-62.
- > Giver, L., Gershenson, A., Freskgard, P.-O., Arnold, F.H. (1998). "Directed evolution of a thermostable esterase." Proc.Natl.Acad.Sci.USA **95**: 12089-12813.
- > Godovac-Zimmermann, J. and L. R. Brown (2001). "Perspectives for mass spectrometry and functional proteomics." Mass Spectrom Rev **20**(1): 1-57.
- > Granger, M. P., W. E. Wright, et al. (2002). "Telomerase in cancer and aging." Crit Rev Oncol Hematol **41**(1): 29-40.
- > Grayhack, E. J., Phizicky, E.M. (2001). "Genomic analysis of biochemical function." Curr. Opin. Chem. Biol. **5**: 34-39.
- > Greider, C. W. (1996). "Telomere length regulation." Annu Rev Biochem **65**: 337-365.
- > Greider, C. W. (1998). "Telomeres and senescence: the history, the experiment, the future." Curr Biol **8**: R178-R181.

- > Griffith, E. C., E. J. Licitra, et al. (2000). "Yeast three-hybrid system for detecting ligand-receptor interactions." Methods Enzymol **328**: 89-103.
- > Hackett, J. A. and c. W. Greider (2002). "Balancing instability: dual roles for telomerase and telomere dysfunction in tumorigenesis." Oncogene **21**: 619-626.
- > Hahn, W. C., Stewart, S.A., Brooks, M.W., York, S.G., Eatopn, E., Kurachi, A., Beijersbergen, R.L., Knoll, J.H.M., Meyerson, M., weinberg, R.A. (1999). "Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells." Nature Medicine **5**(10): 1164-1170.
- > Hamilton, S. E., Simmons, C.G., Kathiriya, I.S., Corey, D.R. (1999). "Cellular delivery of peptide nucleic acids and inhibition of human telomerase." Chemistry & Biology **6**(June 1999): 343-351.
- > Harley, C. B. (1991). "Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb?" Mutat. Res **256**: 271-282.
- > Harley, C. B., Futcher, A.b., Greider, C.W. (1990). "Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts." Nature **345**: 458-460.
- > Harley, C. B., Villiponteau, B. (1995). "Telomeres and telomerase in aging and cancer." Curr. Opin. Genet. Dev. **5**: 249-255.
- > Helder, M. N., G. B. A. Wisman, et al. (2002). "Telomerase and telomeres: From basic biology to cancer treatment." Cancer Investigation **20**: 82-101.
- > Henzel, W. J., Billeci, T.M., Stults, J.T., Wong, S.C., Grimley, C., Watanabe, C. (1993). "Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases." Proc.Natl.Acad.Sci.USA **90**: 5011-5015.
- > Herbert, B.-S., Pitts, A.E., Baker, S.I., Hamilton, S.E., Wright, W.E., Shay, J.W., Corey, D.R. (1999). "Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death." PNAS **96**(7): 14276-14281.
- > Jamieson, A. C., Kim, S.-H., Wells, J.A. (1994). "In-vitro selection of zinc fingers with altered DNA-binding specificity." Biochemistry **33**: 5689-5695.
- > Kessel, C. R., Granick, S. (1991). "Formation and Characterization of highly ordered and well-anchored alkylsilane monolayer on mica by self-assembly." Langmuir **7**: 532-538.
- > Kim, N. W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., karley, M.D., West, P.L., Ho, G.M., Coviello, W.E., Wright, S.L., Weinrich, Shay, J.W. (1994). "Specific association of

- human telomerase activity with immortal cells and cancer." Science **266**: 2011-2015.
- > Kleinjung, F. (1998). Sensorik und Kinetik biochemischer Nukleinsäure-Wechselwirkungen an Oberflächen. Analytische Biochemie. Potsdam, Dissertation, Universität Potsdam.
 - > Kleinjung, F., F. F. Bier, et al. (1997). "Fibre-optic genosensor for specific determination of femtomolar DNA oligomers." Analytical Chimica Acta **350**: 51-58.
 - > Koepfel, F., Riou, J-F., Laoui, A., Mailliet, P., Arimondo, P.B., Labit, D., Petitgenet, O., Helene, C., Mergny, J.-L (2001). "Ethidium derivatives bind to G-quartets, inhibit telomerase and act as fluorescent probes for quadruplexes." Nucleic Acids Research **29**(5): 1087-1096.
 - > Kornberg, T., A. Lockwood, et al. (1974). "Replication of the Escherichia coli chromosome with a soluble enzyme system." Proc Natl Acad Sci U S A **71**(8): 3189-93.
 - > Kunz, R. E., Du, C., Edlinger, H., Pulker, H., Seifert, M. (1991). "Integrated optical sensors based on reactive low-voltage ion-plated films." Sens. Act. A **25-27**: 155-159.
 - > Kyo, S. and M. Inoue (2002). "Complex regulatory mechanisms of telomerase activity in normal and cancer cells: How can we apply them for cancer therapy?" Oncogene **21**: 688-697.
 - > Lannert, H., Salzer, M.J., (2001). VIIIth International Myeloma Workshop, 4-8 May, Banff, Alberta, Canada.
 - > Lavelle, F., J. F. Riou, et al. (2000). "Telomerase: a therapeutic target for the third millennium?" Crit Rev Oncol Hematol **34**(2): 111-26.
 - > Ledford, M., K. D. Friedman, et al. (2000). "A multi-site study for detection of the factor V (Leiden) mutation from genomic DNA using a homogeneous invader microtiter plate fluorescence resonance energy transfer (FRET) assay." J Mol Diagn **2**(2): 97-104.
 - > Lin, H., Cornish, V.W. (2002). "Screenings- und Selektionsmethoden für die Analyse von Proteinfunktionen in großem Maßstab." Angewandte Chemie **114**: 4580-4606.
 - > Lukosz, W., Tiefenthaler, K. (1983). "Embossing techniques for fabricating integrated optical components in hard inorganic waveguide materials." Opt.Lett. **8**: 537-539.

- > Lundblad, V. (2002). "Telomere maintenance without telomerase." Oncogene **21**: 522-531.
- > Lyamichev, V., A. L. Mast, et al. (1999). "Polymorphism identification and quantitative detection of genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotide probes." Nat Biotechnol **17**(3): 292-6.
- > MacBeath, G., Schreiber, L.M. (2000). "Printing Proteins as Microarrays for High-Throughput Function Determination." Science **289**: 1760-1763.
- > Majumdar, C., C. A. Stein, et al. (1989). "Stepwise mechanism of HIV reverse transcriptase: primer function of phosphorothioate oligodeoxynucleotide." Biochemistry **28**(3): 1340-6.
- > Matthes, E. and C. Lehmann (1999). "Telomerase protein rather than its RNA is the target of phosphorothioate-modified oligonucleotides." Nucleic Acids Research **27**(4): 1152-1158.
- > Meyerson, M., C. M. Counter, et al. (1997). "hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization." Cell **90**(4): 785-95.
- > Modrich, P. (1982). "Studies on sequence recognition by type II restriction and modification enzymes." CRC Crit Rev Biochem **13**(3): 287-323.
- > Mokbel, K. (2000). "The role of telomerase in breast cancer." Eur J Surg Oncol **26**(5): 509-14.
- > Morin, G. B. (1989). "The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats." Cell **59**(3): 521-9.
- > Müller, M. (2002). "Telomerase: Its clinical relevance in the diagnosis of bladder cancer." Oncogene **21**: 650-655.
- > Nakamura, T. M., G. B. Morin, et al. (1997). "Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human." Science **277**(5328): 955-9.
- > Nilsson, P., Persson, B., Uhlén, M., Nygren, P-A. (1995). "Real-Time Monitoring of DNA Manipulations Using Biosensor Technology." Analytical Biochemistry **224**: 400-408.
- > Norton, J. C., M. A. Piatyszek, et al. (1996). "Inhibition of human telomerase activity by peptide nucleic acids." Nat Biotechnol **14**(5): 615-9.
- > Ohsugi, I., Totutake, Y., Suzuki, N., Ide, T., Sugimoto, M. Furuichi, Y. (2000). "Telomere repeat DNA forms a large non-covalent complex with unique cohesive

- properties which is dissociated by Werner syndrome DNA helicase in the presence of replication protein A." Nucleic Acids Research **28**: 3642-3648.
- > Pedersen, H., Holder, S., Sutherlin, D.P., Schwitter, U., King, D.S., Schultz, P.G. (1998). "A method for directed evolution and functional cloning of enzymes." Proc.Natl.Acad.Sci.USA **95**: 10523-10528.
 - > Perkins, T. A., Wolf, D.A., Goodchild, J. (1996). "Fluorescence Resonance Energy Transfer Analysis of Ribozyme Kinetics reveals the mode of action of a facilitator oligonucleotide." Biochemistry **35**: 16370-16377.
 - > Pirrung, M. C. (2002). "Die Herstellung von DNA-Chips." Angew. Chem. **114**: 1326-1341.
 - > Polesky, A. H., M. E. Dahlberg, et al. (1992). "Side chains involved in catalysis of the polymerase reaction of DNA polymerase I from Escherichia coli." J Biol Chem **267**(12): 8417-28.
 - > Prescott, J. C., Blackburn, E.H. (1999). "Telomerase: Dr Jekyll or Mr Hide." Curr Opin in Genet & Develop **9**: 368-373.
 - > Raymond, E., D. Sun, et al. (1999). "A human breast cancer model for the study of telomerase inhibitors based on a new biotinylated-primer extension assay." Br J Cancer **80**(9): 1332-41.
 - > Rhim, J. S., S. Jin, et al. (1997). "Malignant transformation of human prostate epithelial cells by N- nitroso-N-methylurea." Cancer Res **57**(4): 576-80.
 - > Roberts, R. W. (1999). "Totally in vitro protein selection using mRNA-protein fusions and ribosome display." Curr. Opin. Chem. Biol. **3**: 268-273.
 - > Roche (1999). "Medizin Lexikon." **4.Auflage**.
 - > Rowe, C. A., Tender L.M., Feldstein, M.J., Golden, J.P., Scruggs, S.B., MacCraith, B.D., Cras, J.J., Ligler, F.S. (1999). "Array biosensor for simultaneous identification of bacterial, viral, and protein analytes." Anal. Chem. **71**: 3846-3852.
 - > Sachidanandam, R., D. Weissman, et al. (2001). "A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms." Nature **409**(6822): 928-33.
 - > Scheller, F. W., Schubert, F., Fedrowitz, J. (1997). Present state and frontiers in biosensorics. Basel, Schweiz, Birkhäuser.
 - > Scheller, F. W., U. Wollenberger, et al. (2001). "Research and development in biosensors." Curr Opin Biotechnol **12**(1): 35-40.

- > Scheper, T., Hitzmann, B., Stärk, E., Ulber, R., Faurie, R., Sosnitza, P., Reardon, K.F. (1999). "Bioanalytics: detailed insight into bioprocess." Analytica Chimica Acta **400**: 121-134.
- > Schmidt, P. M., C. Lehmann, et al. (2002). "Detection of activity of telomerase in tumor cells using fiber optical biosensors." Biosens Bioelectron **17**(11-12): 1081-87.
- > Schmidt, P. M., E. Matthes, et al. (2002). "Real-time determination of telomerase activity in cell extracts using an optical biosensor." Biol Chem **383**(10): 1659-66.
- > Schweitzer, B., Wiltshire, S., Lambert, J., O'Malley, S., Kukanskis, K., Zhu, Z., Kingsmore, S.F., Lizardi, P.M., Ward, D.C. (2000). "Immunoassay with rolling circle DNA amplifications: A versatile platform for ultrasensitive antigen detection." Proc.Natl.Acad.Sci.USA **97**: 10113-10119.
- > Senn, H.-J. D., P.; Glaus, A.; Jungi, W.F.; Pralle, H.B.; Sauer, R.; Schlag, P.M. (1998). "Checkliste Onkologie." Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York.
- > Sharma, S., E. Raymond, et al. (1997). "Preclinical and clinical strategies for development of telomerase and telomere inhibitors." Ann Oncol **8**(11): 1063-74.
- > Shay, J. W., Zou, Y., Hiyama, E., Wright, E.W. (2001). "Telomerase and cancer." Human Molecular Genetics **10**(7): 677-685.
- > Shevchenko, A., Jensen, O.N., Podtelejnikov, A.V., Sagliocco, F., Wilm, M., Vorm, O., Mortensen, P., Shevchenko, A., Boucherie, H., Mann, M. (1996). "Linking genome and proteome by mass spectrometry: Large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels." Proc.Natl.Acad.Sci.USA **93**: 14440-14445.
- > Shield, P., Harris, C.C. (1990). "Environmental causes of cancer." Medical Clinics of North America **74**: 263-277.
- > Shiner, A. C., R. F. Newbold, et al. (1988). "Morphological transformation of immortalized hamster dermal fibroblasts following treatment with simple alkylating carcinogens." Carcinogenesis **9**(9): 1701-9.
- > Sommerfeld, H. J., Meeker, A.K., Piatyszek, M.A., Bora, G.S., Shay, J.W., Coffey, D.S. (1996). "Telomerase activity: a prevalent marker of malignant human prostate tissue." Cancer Research **56**: 218-222.
- > Stahl, S., Uhlen, M. (1997). "Bacterial surface display: Trends and progress." Trends Biotechnol. **15**: 185-192.

- > Syvänen, A.-C. (2001). "Accessing genetic variation: Genotyping single polymorphism." Nature Review/Genetics **2**: 930-942.
- > Tawfik, D. S. and A. D. Griffiths (1998). "Man-made cell-like compartments for molecular evolution." Nat Biotechnol **16**(7): 652-6.
- > Thomas, M., Yang, L., Hornsby, P.J. (1999). "Formation of functional tissue from transplanted adrenocortical cells expressing telomerase reverse transcriptase." Nature Biotechnology **18**: 39-42.
- > Thorn, S. N., Daniels, R.G., Auditor, M.M., Hilvert, D. (1995). "Large rate accelerations in antibody catalysis by strategic use of haptenic charge." Nature **373**: 228-230.
- > Tiefenthaler, K. (1992). Integrated optical couplers as chemical waveguide sensors. Advances in Biosensors. A. P. F. Turner. London, JAI Press. **2**: 261-289.
- > Uetz, P., L. Giot, et al. (2000). "A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*." Nature **403**(6770): 623-7.
- > Varon, D., C. Jiang, et al. (1997). "Telomerase activity in the normal and neoplastic rat mammary gland." Cancer Res **57**(24): 5605-9.
- > Venter, J. C., M. D. Adams, et al. (2001). "The sequence of the human genome." Science **291**(5507): 1304-51.
- > Vidal, M. and P. Legrain (1999). "Yeast forward and reverse 'n'-hybrid systems." Nucleic Acids Res **27**(4): 919-29.
- > Villa, R. F., M., Lualdi, S., Versonese, S., Daidone, M.G., Zaffaroni, N. (2000). "Inhibition of telomerase activity by a cell-penetrating peptide nucleic acid construct in human melanoma cells." FEBS **473**: 241-248.
- > Walker, G. T., Frasier, M.S., Schramm, J., Little, M., Nadeau, J., Malinowski, D. (1992). "Strand displacement amplification-an isothermal, in vitro DNA amplification technique." Nucleic Acids Res **20**: 1691-1696.
- > Walter, G., Büssow, K., Cahill, D., Lueking, A., Lehrach, H. (2000). "Protein arrays for gene expression and molecular interaction screening." Curr. Opin. Microbiol. **3**: 298-302.
- > Walter, N. G. and G. Strunk (1994). "Strand displacement amplification as an in vitro model for rolling- circle replication: deletion formation and evolution during serial transfer." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(17): 7937-41.

- > Weinrich, S. L., R. Pruzan, et al. (1997). "Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT." Nat Genet **17**(4): 498-502.
- > Wang, J. (2000). "From DNA biosensors to gene chips." Nucleic Acids Res **28**(16): 3011-6.
- > Wright, W. E., J. W. Shay, et al. (1995). "Modifications of a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) result in increased reliability, linearity and sensitivity." Nucleic Acids Res **23**(18): 3794-5.
- > Wright, W. E., V. M. Tesmer, et al. (1997). "Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end." Genes Dev **11**(21): 2801-9.
- > Xia, G., Chen, L., Sera, T., Fa, Ma., Schultz, P.G., Romesberg, F.E. (2002). "Directed evolution of novel polymerase activities: Mutation of a DNA polymerase into an efficient RNA polymerase." Proc.Natl.Acad.Sci.USA **99**: 6597-6602.
- > Zakian, V. A. (1995). "Telomeres: beginning to understand the end." Science **270**: 1601-1607.
- > Zhu, H., Klemic, J.F., Chang, S., Bertone, P., Casamayor, A., Klemic, K.G., Smith, D., Gerstein, M., Reed, M., Snyder, M. (2000). "Analysis of yeast protein kinases using protein chips." Nat. Genet. **26**: 283-289.
- > Zhu, H., Snyder, M. (2001). "Protein arrays and microarrays." Curr. Opin. Chem. Biol. **5**: 40-45.
- > Ziauddin, J., Sabatini, D.M. (2001). "Microarrays of cells expressing defined cDNAs." Nature **411**: 107-110.