

(12) **Österreichische Patentanmeldung**

(21) Anmeldenummer: A 2018/2010
(22) Anmeldetag: 06.12.2010
(43) Veröffentlicht am: 15.11.2011

(51) Int. Cl. : **G06F 17/17** (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(30) Priorität:
28.04.2010 AT A 707/2010 beansprucht.

(73) Patentanmelder:
AIT AUSTRIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY GMBH
A-1220 WIEN (AT)

(54) **VERFAHREN ZUR APPROXIMATION DER KINEMATIK EINER HYBRIDISIERUNGSREAKTION**

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Approximation der Kinetik einer Hybridisierungsreaktion einer Probe von DNA, RNA, Proteinen oder synthetischen Nukleinsäuren wie PNA oder LNA basierend auf einer Anzahl von Messdatensätzen umfassend jeweils einen Messwert (I), der proportional zur Konzentration der an einem Fängermolekül anhaftenden zu messenden Moleküle ist, sowie die zugehörige Messzeit (t). Erfindungsgemäß ist vorgesehen, dass die ermittelten Messdatensätze mittels eines

Fitting-Verfahrens an eine Kurve der Form

$$I(t) = A \frac{k_a}{k_b - k_a} (e^{-k_a t} - e^{-k_b t})$$

angepasst werden, wobei die Fitting-Parameter A , k_a und k_b im Zuge des Fitting-Verfahrens an die Messdatensätze angepasst werden.

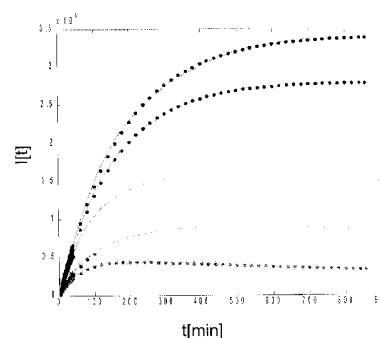


Fig. 1

Zusammenfassung:

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Approximation der Kinetik einer Hybridisierungsreaktion einer Probe von DNA, RNA, Proteinen oder synthetischen Nukleinsäuren wie PNA oder LNA basierend auf einer Anzahl von Messdatensätzen umfassend jeweils einen Messwert (I), der proportional zur Konzentration der an einem Fängermolekül anhaftenden zu messenden Moleküle ist, sowie die zugehörige Messzeit (t). Erfindungsgemäß ist vorgesehen, dass die ermittelten Messdatensätze mittels eines Fitting-Verfahrens an eine Kurve der Form $I(t) = A \frac{k_a}{k_b - k_a} (e^{-k_a t} - e^{-k_b t})$ angepasst werden, wobei die Fitting-Parameter A , k_a und k_b im Zuge des Fitting-Verfahrens an die Messdatensätze angepasst werden.

(Fig. 1)

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Approximation der Kinetik einer Hybridisierungsreaktion einer Probe von DNA und/oder RNA, Proteinen sowie synthetische Nukleinsäuren wie z.B. LNA und PNA.

Die Erfindung wird im Bereich der automatisierten Analyse von Hybridisierungsreaktionen von DNA, RNA, PNA, LNA und/oder Proteinen gewerblich eingesetzt.

Hintergrund der Erfindung ist die Aufzeichnung von Hybridisierungskurven zur Bestimmung der Reaktionskinetik von Hybridisierungsreaktionen. Im Stand der Technik ist eine Reihe von Verfahren zur Ermittlung von Hybridisierungsreaktionen bekannt, die allesamt auf Endpunktmessungen beruhen. Aufgrund der Endpunktmessungen können lediglich sehr wenige Aussagen über den tatsächlichen Verlauf der Hybridisierungsreaktion getroffen werden. Dabei besteht insbesondere das Problem der Charakterisierung der unterschiedlichen auftretenden Phänomene bei der Hybridisierungsreaktion ausschließlich auf Basis der durch die Endpunktmessungen bekannten Messwerte.

Die aus dem Stand der Technik bekannten Modelle weisen den erheblichen Nachteil auf, dass eine Beschreibung des tatsächlichen Reaktionsverlaufs nur äußerst ungenau wiedergegeben werden kann. Weitere Modelle verfügen über eine größere Vorhersagegenauigkeit für vereinfachte Problemstellungen und können nicht für allgemeine Hybridisierungsreaktionen verwendet werden. Die Abweichungen bei Messungen, bei denen die Modellannahmen nicht eingehalten werden, sind mitunter enorm, die erzielten Ergebnisse sind somit von eher geringer Aussagekraft.

Der Stand der Technik weist somit den Nachteil auf, dass eine allgemeine Beschreibung der Reaktionskinetik einer Hybridisierungsreaktion von DNA, RNA usw. nicht mit hinreichender Genauigkeit beschrieben werden kann.

Somit besteht die objektive Aufgabe, ein Verfahren zu schaffen, mit dem eine zuverlässige Voraussage über den Ablauf einer Hybridisierungsreaktion von DNA, RNA, Proteinen, sowie von synthetischen Nukleinsäuren wie LNA und PNA getroffen werden kann. Insbesondere besteht die Aufgabe, dass während einer laufenden Hybridisierungsreaktion eine Vorhersage über den weiteren Reaktionsverlauf getroffen werden kann. Weiters sollen durch die Reduktion von notwendigen Messdaten durch geeignete mathematisch-physikalische Extra- und Interpolation weniger Messwerte zur Bestimmung der Approximationskurve erforderlich sein.

Die Erfindung löst die Aufgabe bei einemeingangs genannten Verfahren zur Approximation der Kinetik mit dem Kennzeichen des Patentanspruchs 1. Dabei ist erfindungsgemäß vorgesehen, dass die ermittelten Messdatensätze mittels eines Fitting-Verfahrens an eine Kurve der Form $I(t) = A \frac{k_a}{k_b - k_a} (e^{-k_a t} - e^{-k_b t})$ angepasst werden, wobei die Fitting-Parameter A, k_a und k_b im Zuge des Fitting-Verfahrens an die Messdatensätze angepasst werden. Dies erlaubt eine besonders vorteilhafte Approximation von Hybridisierungskurven sowie einen geringen Ressourcenverbrauch bei deren Bestimmung.

Vorteilhafte Ausgestaltungen und Weiterbildungen der Erfindung sind in den Unteransprüchen beschrieben.

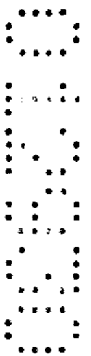
Ein besonderer Aspekt der Erfindung sieht vor, dass nach der Bestimmung einer Anzahl von Messdatensätzen jeweils das Fitting-Verfahren durchgeführt wird und basierend auf den bisher ermittelten Ergebnissen jeweils eine verbesserte Kurve erstellt wird.

Durch dieses Vorgehen wird erreicht, dass jeweils die aktuellste Prognose zur Verfügung steht und die Prognose ständig verbessert und an den tatsächlichen Reaktionsverlauf angepasst wird.

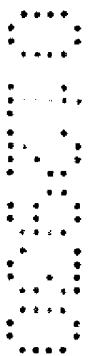
Besonders vorteilhaft ist eine Weiterbildung der Erfindung, bei der die Hybridisierungsrate näherungsweise als Fitting-Parameter k_a ermittelt bzw. diesem gleichgesetzt wird und/oder dass die Denaturierungsrate näherungsweise als Fitting-Parameter k_b ermittelt bzw. diesem gleichgesetzt wird.

Aus dem Kurvenverlauf kann auf einfache Weise die Hybridisierungsrate oder die Denaturierungsrate ermittelt und zur Verfügung gestellt werden. Dies kann insbesondere deshalb leicht abgeleitet werden, da die als Fitting-Parameter verwendeten Größen unmittelbare physikalische Bedeutung, nämlich einer Hybridisierungsrate bzw. einer Denaturierungsrate, haben.

Ferner kann die Erfindung dahingehend weitergebildet werden, dass für die Durchführung für das Fitting-Verfahrens der Fitting-Parameter k_b bzw. die Denaturierungsrate näherungsweise auf Null gesetzt wird. Ein derartiges Vorgehen kann insbesondere dann wirksam eingesetzt werden, wenn eine Denaturierung nicht oder in verschwindendem Ausmaß stattfindet. Zudem kann diese Vereinfachung bei sehr kurzen Reaktionszeiträumen verwendet werden, da die Denaturierung typischerweise längere Zeitkonstanten aufweist.



Eine vorteilhafte Weiterbildung der Erfindung sieht vor, dass der Probenträger als Microarray ausgestaltet ist, und die Helligkeitsmessungen durch Aufnahme eines Digitalbildes des Microarrays durchgeführt wird. Hierdurch kann eine große Anzahl von Hybridisierungsreaktionen gleichzeitig aufgenommen werden.



Eine weitere vorteilhafte Weiterbildung der Erfindung sieht vor, dass jedem Rasterpunkt des Microarrays vorab ein oder mehrere Pixel des Digitalbilds zugeordnet werden und aus den Intensitätswerten der jeweiligen Pixel die jeweiligen Intensitäten (I) der in den Rasterpunkten des Microarrays befindlichen Proben bestimmt werden und dass für jeden Rasterpunkt des Microarrays laufend separate Messungen und Fitting-Verfahrensschritte durchgeführt werden und gegebenenfalls für jeden Rasterpunkt des Microarrays separat die Hybridisierungsrate und die Denaturierungsrate ermittelt werden.

Durch die numerische Effizienz des erfindungsgemäßen Verfahrens kann die parallele Bestimmung der Kurven ohne weiteres für eine große Anzahl von Rasterpunkten des Microarrays durchgeführt werden.

Vorteilhafterweise kann vorgesehen sein, dass die Probe in einen Probenträger verbracht wird, wobei an einer der Begrenzungsflächen des Probenträgers Fängermoleküle angeordnet sind, die eine vorgegebene Art von Molekülen binden, wobei die Anzahl der an den Fängermolekülen befindlichen Moleküle, z.B. von DNA, RNA, PNA, LNA oder Proteine als Messwert I bestimmt werden.

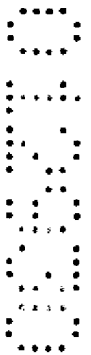
Dieses Vorgehen verbessert die Handhabung bei der Durchführung der Messung.

Eine bevorzugte Weiterbildung der Erfindung sieht vor, dass als Messwert die von der Probe reflektierte und/oder, insbesondere durch Lumineszenz, vorzugsweise Fluoreszenz, abgestrahlte Lichtintensität herangezogen wird und/oder als Messwert die elektrische Leitfähigkeit, die Magnetisierbarkeit, die Impedanz bei einer vorgegebenen Frequenz, insbesondere zwischen 1 Hz und 10^7 Hz, oder die Änderung des Brechungsindex herangezogen wird und/oder als Messwert I die Gewichtszunahme bedingt durch das Anhaften der Moleküle an den Fängermolekülen herangezogen wird.

Hierdurch werden einfache und genaue Möglichkeiten zur Bestimmung der dem Verfahren zugrundeliegenden Messwerte dargestellt.

Zudem kann vorgesehen sein, dass der Probenträger an zumindest einer Seite von einem Microarray begrenzt ist, und die Bestimmung des Messwerts durch Aufnahme eines Digitalbildes des Microarrays durchgeführt wird.

Mit einem derartigen Vorgehen kann eine Vielzahl unterschiedlicher Messungen, z. B. eine Messung unterschiedlicher Proben mit denselben Fängermolekülen oder eine Messung derselben Probe mit unterschiedlichen Fängermolekülen einfach und effizient durchgeführt werden.



Weiters ist es vorteilhaft, dass jedem Rasterpunkt des Microarrays vorab ein oder mehrere Pixel des Digitalbilds zugeordnet werden und aus den Lichtintensitätswerten der jeweiligen Pixel die jeweiligen Messwerte I der in den Rasterpunkten des Microarrays befindlichen Proben bestimmt werden und dass für jeden Rasterpunkt des Microarrays laufend separate Messungen und Fitting-Verfahrensschritte durchgeführt werden.

Hierdurch wird zusätzlich die Aufnahme einer Vielzahl von Messwerten erleichtert und effizient durchgeführt.

Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung sieht vor, dass zur Bestimmung der Fitting-Parameter A , k_a , k_b ein Gauß-Newton-Verfahren verwendet wird.

Mit diesem Vorgehen wird eine der Schmelzkurve besonders gut angepasste Kurvenform und hervorragende Prognosen erzielt.

Weiters kann vorgesehen sein, dass der zeitlich letzte Messdatensatz herangezogen wird und sämtliche Messwerte der Messdatensätze durch den Messwert des zeitlich letzten Messdatensatzes dividiert werden.

Das verbessert die Vergleichbarkeit mehrerer Messungen.

Zur genauen Bestimmung der Konzentration einer Substanz in einer Probe kann vorgesehen sein, dass in einem ersten Schritt zur Kalibrierung eine Referenzprobe mit einer vorgegebenen Konzentration C_a^{ref} , C_b^{ref} von zu messenden Molekülen hergestellt wird und für diese eine Referenz-Hybridisierungsreaktion durchgeführt wird. Dabei werden aus den Fitting-Parameter A , k_a , k_b die Reaktionsgeschwindigkeiten k_a' , k_b' bestimmt, wobei $k_a = C_a^{ref} \cdot k_a'$ und $k_b = C_b^{ref} \cdot k_b'$ und weiters eine Messprobe mit einer zu bestimmenden Konzentration C_a^T , C_b^T einer Mess-Hybridisierungsreaktion unterzogen wird, und für die ermittelten Messdatensätze erneut weitere Fitting-Parameter A'' , k_a'' und k_b'' bestimmt werden und die zu bestimmenden Konzentrationen C_a^T , C_b^T gemäß

$$C_a^T = \frac{k_a''}{k_a'}$$

Und

$$C_b^T = \frac{k_b''}{k_b'}$$

bestimmt werden.

Die Erfindung wird anhand des im folgenden beschriebenen Ausführungsbeispiels ohne Einschränkungen der Allgemeinheit erläutert.

Fig. 1 zeigt den Verlauf einer ermittelten Kurve sowie die zugrunde liegenden Messwerte.

Fig. 2 zeigt den Verlauf einer prognostizierten Kurve bei einer Anzahl von bekannten Messwerten sowie die Übereinstimmung der prognostizierten Kurve mit den nach der Prognose aufgenommenen Messwerten.

Fig. 3 zeigt ein Beispiel für eine Korrelation zwischen dem bei diesem Verfahren gewonnenen Parameter und der gemessenen Schmelztemperatur.

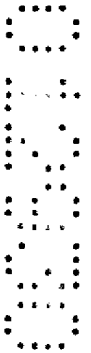
Fig. 4 zeigt einen Hybridisierungsverlauf für eine vorgegebene Referenzmessung bei einer initialen Konzentration von C_a^{ref} 0,5 nM und einer zu bestimmenden Konzentration, die vorab mit einem alternativen Verfahren auf 3,6 nM bestimmt worden ist. Durch Auswertung der experimentellen Werte, nach dem eben beschriebenen Verfahren, erhält man eine Konzentration von C_a^T 3,66 nM.

Die Messwerte, die im Zuge des erfindungsgemäßen Verfahrens weiterverarbeitet werden, werden typischerweise während einer Reaktion aufgezeichnet, bei der sich die Probe in einem Probenträger befindet. Die Probe enthält insbesondere Proteine, DNA, RNA, LNA und/oder PNA. An einer Begrenzungsfläche des Probenträgers ist eine Anzahl von Fängermolekülen angeordnet, die fest an der Begrenzungsfläche anhaften. Diese Fängermoleküle sind Moleküle, die komplementär zu den zu untersuchenden Molekülen aufgebaut sind, sodass die zu untersuchenden Moleküle leicht an den Fängermolekülen anhaften.

Zur Bestimmung der Reaktionskinetik wird die Probe auf einen Probenträger aufgebracht. Als Probe werden beispielsweise DNA- oder RNA- Moleküle, Proteine oder synthetische Nukleinsäuren wie PNA oder LNA herangezogen und auf den Probenträger aufgebracht, die einer Hybridisierungsreaktion unterliegen. Diese Reaktion kann je nach Art zwischen wenigen Minuten und wenigen Tagen dauern.

Zur gleichzeitigen Analyse von mehreren Proben mit derselben Analyseflüssigkeit können Microarrays verwendet werden. Nach dem Aufbringen der Probe auf dem Probenträger wird eine Analyseflüssigkeit mit Markermolekülen auf die Proben aufgebracht.

Die Proben reagieren mit der Analyseflüssigkeit, wobei die zu untersuchenden Moleküle entweder vorab oder nach dem Anhaften an den Fängermolekülen mit Markermolekülen versetzt werden. Im Bereich der Probe befindet sich somit eine der Anzahl von



Markermolekülen, die der Anzahl der von diesen markierten Molekülen entspricht; die zu untersuchenden Moleküle haften an den Fängermolekülen an.

Um die Anzahl der an den Fängermolekülen anhaftenden zu untersuchenden Moleküle feststellen zu können, wird die Probe mit Licht bestimmter Wellenlänge bestrahlt, worauf diese nachleuchtet (phosphoresziert) bzw. bei einer anderen Wellenlänge Licht aussendet (fluoresziert).

Wird die Probe mit Licht bestrahlt, fluoreszieren die Markermoleküle und die von den Markermolekülen ausgesendete Lichtintensität ist annähernd proportional zur Anzahl der markierten Moleküle. Somit kann im Prinzip die Lichtintensität als Messwert I und auch die Konzentration zumindest eines der Bestandteile der Probe ermittelt werden und gemeinsam mit dem Aufnahmezeitpunkt t der Probe abgespeichert werden.

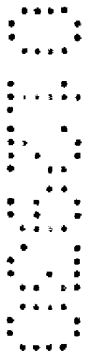
Wird die Probe mit Licht, insbesondere Licht im Wellenlängenbereich zwischen 500nm und 700 nm bestrahlt, fluoreszieren die Markermoleküle und die von den Markermolekülen reflektierte Lichtintensität ist annähernd proportional zur Anzahl der markierten Moleküle. Die Intensität wird mittels eines Photodetektors ermittelt und liegt in quantisierter Form vor. Dabei ist es nicht erforderlich, den Wert zu kalibrieren, ein dimensionsloser quantisierter Messwert I ist für das im folgenden geführte Verfahren ausreichend.

Durch Kalibrierung oder Eichung kann ein Zusammenhang zwischen dem Messwert I und der Konzentration der markierten Moleküle ermittelt werden, sodass mit der Bestimmung des Messwerts I stets auch eine Bestimmung der Konzentration der markierten Moleküle einhergeht.

Im folgenden Ausführungsbeispiel werden die Lichtintensitäten der einzelnen Proben in Abständen von etwa 5 Minuten aufgenommen und abgespeichert. Die explizite Aufzeichnung der Zeitpunkte kann dadurch vereinfacht werden, dass das Zeitintervall zwischen der Aufzeichnung der einzelnen Messwerte I vorab festgelegt ist und aus der Reihenfolge der Messwerte I implizit abgeleitet werden kann. Es steht somit eine Anzahl von Messdatensätzen zur Verfügung, für die sowohl, entweder explizit oder implizit, ein Aufnahmezeitpunkt t als auch der Messwert I vorliegen.

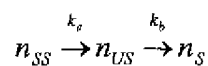
Im Zuge des Fitting-Verfahrens wird eine Ausgleichskurve gesucht, die diese Messdatensätze mit besonders geringer Fehlerrate approximiert. Es wird dabei eine

grundsätzliche Kurvenform der Formel $I(t) = A \frac{k_a}{k_b - k_a} (e^{-k_a t} - e^{-k_b t})$ gewählt und die



Fitting-Parameter A , k_a , und k_b im Zuge des Fitting-Verfahrens an die Messdatensätze angepasst. Der gewählten Kurvenform liegen die folgenden Erwägungen zugrunde:

Die Konzentration bzw. der Messwert I verläuft bei Hybridisierungsreaktionen nicht notwendigerweise monoton steigend. Falls konkurrierende Hybridisierungsreaktionen vorliegen, ist es möglich, dass ein Reaktionsprodukt n_s mit hoher Reaktionsrate jedoch mit geringer Bindungsenergie aus dem Ausgangsprodukt n_{ss} entsteht, das während des Hybridisierungsprozesses durch ein weiteres Endprodukt mit größerer Bindungsenergie ersetzt wird. Für ein Modell, das die Ersetzung eines Endprodukts n_{us} durch ein weiteres Endprodukt n_s durch konkurrierende Hybridisierung beschreiben soll, können unterschiedliche Hybridisierungsraten k_a und k_b eingeführt werden, um eine Reaktion der folgenden Form zu beschreiben:



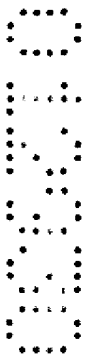
Demgemäß kann der zeitliche Verlauf der Konzentration und damit auch des Messwerts I von n_{us} durch die folgende Formel angegeben werden:

$$I(t) = A \frac{k_a}{k_b - k_a} (e^{-k_a t} - e^{-k_b t}),$$

wobei $I(t)$ Kurve der Konzentration des Endprodukts n_{us} mit hoher Reaktionsrate aber geringer Bindungsenergie bezeichnet. Im Falle einer nicht-konkurrierenden Hybridisierung kann k_b ohne Einschränkung der Allgemeinheit auf null gesetzt werden. Der Parameter A ist generell vom Messwert I , somit auch von der Konzentration des Ausgangsprodukts, der Hybridisierungsreaktion abhängig.

Als Messwert I können anstelle der Lichtintensität der Fluoreszenz auch elektrische, mechanische, chemische oder magnetische Eigenschaften der Markermoleküle gemessen werden, die sich bei einer Bindung mit den zu messenden Molekülen ändern. So ändern sich beispielsweise die elektrische Leitfähigkeit sowie die Magnetisierbarkeit der Moleküle abhängig von der Menge der an den Fängermolekülen anhaftenden Moleküle. Weiters kann alternativ die Impedanz der Fängermodule bei einer vorgegebenen Frequenz, insbesondere zwischen 1 Hz und 10^7 Hz. herangezogen werden, um die Anzahl der an den Fängermolekülen anhaftenden Moleküle zu bestimmen.

Eine weitere Möglichkeit, die Anzahl der an den Fängermolekülen anhaftenden Moleküle zu bestimmen, liegt darin, das Gewicht bzw. die Masse der Gesamtheit der Fängermoleküle sowie der daran anhaftenden Moleküle zu bestimmen. Dies kann beispielsweise durch Piezo-Kristalle erfolgen, wobei deren Resonanzfrequenz sich abhängig von der Masse der Fängermoleküle ändert. Alternativ dazu kann auch das Gewicht der Fängermoleküle und der an ihnen anhaftenden Moleküle bestimmt werden



und die am Piezo-Kristall anliegenden Gleichspannung ermittelt werden, die proportional der Masse der Fängermoleküle sowie der daran anhaftenden Moleküle ist.

Fig. 1 zeigt ein Fitting bei einer Hybridisierungsreaktion, bei der sämtliche Messwerte I bekannt sind. Der Fig. 1 liegt eine Hybridisierungsreaktion einer Probe von RNA-Molekülen zugrunde.

Die Kurve I kann mittels eines Fitting-Verfahrens, beispielsweise eines Gauß-Newton-Verfahrens (Björck, A. (1996). Numerical methods for least squares problems. SIAM, Philadelphia. ISBN 0-89871-360-9), ermittelt werden. Wie aus der Fig. 1 ersichtlich, sind die Abweichungen von den einzelnen Messwerten sehr gering. Die Qualität des beschriebenen Algorithmus wird anhand unterschiedlicher kinetischer Kurven dargestellt. Die Sterne markieren die Messpunkte, die Linien den aus der Modellierung stammenden Kurvenverlauf. Es wurden sämtliche Messpunkte für die Modellierung verwendet. Auch das Verhalten von kompetitiven Verdrängungsreaktionen wird gut beschrieben.

Fig. 2 zeigt ein Fitting bei einer Hybridisierungsreaktion, wobei lediglich die mit einem Stern markierten Messdatensätze zur Bestimmung der Kurve I herangezogen wurden. Die zugrunde liegende Hybridisierungsreaktion ist identisch mit der in Fig. 1 dargestellten Hybridisierungsreaktion.

Der weitere Verlauf der Kurve stellt somit eine Prognose dar. Die durchgezogenen Linien sind nach der Erstellung der Prognose aufgezeichnet worden und zeigen die Qualität der Prognose, die im Stand der Technik noch nicht zu erreichen war. Durch die genaue Beschreibung des Hybridisierungsprozesses und die hohe Reproduzierbarkeit von online Verfahren ist eine entsprechende Verkürzung der Hybridisierungszeit ohne Qualitätsverlust gegenüber bestehenden Systemen möglich.

Es zeigt sich eine sehr komplexe Kinetik bei kompetitiver Hybridisierung unterschiedlicher Arten von Nukleinsäuren und Modellierung mit wenigen Messpunkten. Die Kreise markieren alle Messpunkte, die Linien den auf dem physikalischen Modell beruhenden Fit. Die Sterne markieren jene Messpunkte, die für die Modellierung verwendet wurden. Bereits mit 4 Messpunkten und dem Startpunkt können unterschiedliche Hybridisierungskinetiken mit großer Genauigkeit beschrieben werden. Das ist aufgrund der komplexen Modelle die einer exakten Behandlung dieses Diffusions-Transport-Reaktions Verhaltens zugrunde liegen überraschend. Wie unmittelbar ersichtlich kann durch wenige Messwerte mit diesem Model der gesamte Verlauf sehr gut beschrieben werden. Insbesondere ist vorteilhaft, dass bereits nach kurzer Zeit und wenigen Aufnahmen gute Ergebnisse und Prognosen erzielt werden bzw. die Messvorgänge drastisch verkürzt werden.

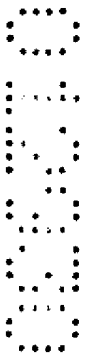
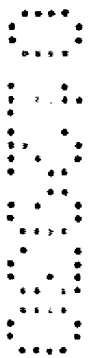


Fig. 3 zeigt ein Beispiel für eine Korrelation zwischen dem bei diesem Verfahren gewonnenen Parameter „a“ und der gemessenen Schmelztemperatur. Als Messwerte wurden die in Fig. 1 ermittelten Messwerte I herangezogen. Die kinetischen Parameter können bei charakterisierten Systemen nach sehr kurzer Zeit ermittelt werden, die Korrelation mit wichtigen physikalisch-technischen Parametern erlaubt die Verkürzung der Messung bei gleich bleibender oder erhöhter Messqualität gegenüber state-of-the-art (Endpunkt) Methoden. Es stellt somit eine Prognose von thermodynamischen Parametern aus kinetischen Parametern dar, die bereits im Verlauf der Hybridisierungsreaktion ermittelt werden können.



Zur besseren Vergleichbarkeit der ermittelten Messwerte I kann vorgesehen sein, dass eine Normierung der Messwerte stattfindet. Dabei ist es insbesondere vorteilhaft, die Messwerte I auf dem Messwert I des letzten Messdatensatzes zu beziehen, der sich nach langer Zeit auf einem vergleichbaren Wert einstellt. Somit können Kurvenverläufe unterschiedlicher Reaktionen mit unterschiedlichen Messverfahren verglichen werden.

Im folgenden Beispiel wird die konkrete Messung einer typischen Versuchsmessung im Detail beschrieben:

Allgemein gilt für die Intensität

$$I = I_{sp} + I_{bg} \quad (1)$$

I_{sp} ist die Intensität verursacht durch die spezifische Hybridisierung komplementärer Nukleinsäuren, I_{bg} wird vom Hintergrund und unspezifischen Effekten verursacht. Bei Hybridisierung oberflächengebundener Nukleinsäuren beeinflussen viele Faktoren die Intensität I_{bg} z.B. unspezifische Hybridisierung, Oberflächeneffekte, optische Artefakte und Prozessstreuungen (Peterson et al., 2002). Die Entwicklung im Design spezifischer Fängermoleküle ist immer noch nicht abgeschlossen (Gresham et al., 2010; Leparc et al., 2009). Weitere Verbesserungen erhofft man sich von Algorithmen zur genaueren Bestimmung des unspezifischen Hintergrundes (Furusawa et al., 2009; Hooyberghs et al., 2009; Kroll et al., 2009; Ono et al., 2008).

Beim Design von Fängermolekülen wird die Enthalpie ΔH^0 und die Entropie ΔS^0 mit der Schmelztemperatur über

$$T_m = \frac{\Delta H^0}{R \ln \left(\frac{C_t}{4} \right) + \Delta S^0} \quad (2)$$

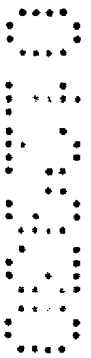
verknüpft. R ist die Gaskonstante, C_i die Konzentration in mol. Die Messdaten stammen aus lösungsbasierten Schmelzkurven. Mit diesen Methoden werden die komplexen Verhältnisse bei oberflächengebundenen Fängermolekülen nur unvollständig wiedergegeben (Li et al., 2008; Pozhitkov et al., 2007).

Echtzeit Datenaufnahme während Hybridisierung und Denaturierung (Bishop et al., 2007; Chagovetz and Blair, 2009; Khomyakova et al., 2008; Marcy et al., 2008) überwinden diese Probleme, da die Änderung des spezifischen Signals I_{sp} in Gleichung (1) vom konstanten unspezifischen Signal I_{bg} unterscheidbar ist. Es ist bekannt, dass die Hybridisierungskinetik Informationen zur Unterscheidung von spezifischer und unspezifischer Hybridisierung und zur quantitativen Analyse liefert (Bishop et al., 2008; Dai et al., 2002; Khomyakova et al., 2008). Durch die Vielfachmessung können auch fortschrittliche Methoden zur Signalverarbeitung genutzt werden, besonders das Verwenden von physikalischen Modellierungsfunktionen ermöglicht eine klare Unterscheidung von Signal und Hintergrund. Ein guter Übersichtsartikel über Echtzeitmikroarrays ist (Chagovetz and Blair, 2009).

Schmelzkurvenanalyse wird bereits für lösungsgebundenes „high resolution melting“ (HRM) (Dahl and Guldberg, 2007; Herrmann et al., 2006; Wojdacz and Dobrovic, 2007) und für komplizierte oberflächengebundene Verfahren mit geringen Spotdichten verwendet: SPR (Xu et al., 2008; Yao et al., 2005), DASH (Howell et al., 1999; Stromqvist Meuzelaar et al., 2007). Da bei jeder Aufnahme ein Bild gespeichert wird, ergeben sich für eine komplette kinetische und thermodynamische Analyse etwa 50-100 .tif Dateien. Da das Signal/Hintergrund Verhältnis bei den oberflächengebundenen Verfahren und das Rauschen durch die Quantisierung schwer zu erfassen ist, sind Tiefpass-Filterverfahren und ableitungsbasierte Schmelzpunktermittlung im Gegensatz zu lösungsbasierten Verfahren nicht zielführend. Tiefpassfilterung erhöht auch die Anzahl der notwendigen Messungen.

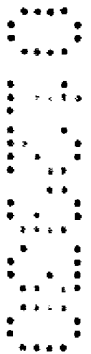
Die Verifikation des wurde mit 40 Experimenten gemacht, die Realisierung des Algorithmus wurde mit Matlab gemacht.

Für die Verifikation der Methode wurde der „Actin X-chip“ entwickelt (Krainer et al., 2010). Aktin ist eines der weitverbreitetsten Gene in Eukaryoten mit Potential zur Lebensmitteldiagnostik (Goodson and Hawse, 2002; Hightower and Meagher, 1986). Durch den Vergleich von Gensequenz aus unterschiedlichen Spezien konnte ein breites Spektrum an Homologie realisiert werden. Die Fängermoleküle wurden in unterschiedlichen Längen realisiert. Als Proben wurden beispielhaft DNA und RNA verwendet.



Für das Probendesign wurde ARB verwendet (Ludwig et al 2004). Die Fängermoleküle wurden mit Aminogruppen modifiziert.

Die Fängermoleküle wurden in 10 µl 50% DMSO gelöst und in drei Replikaten gespottet. Für die 6 wichtigsten Proben wurden vier Konzentrationen gespottet (5.6, 16.7, 50.0 and 150 µM). Damit wurde der Einfluß der Dichte der Fängermoleküle auf die Kinetik und Denaturierung ermittelt. Es wurden slides der Firma Genewave verwendet. Gespottet wurde mit SMP3 stealth Nadeln auf einem Omnigrid 100 Spotter. Das postprocessing der Slides wurde wie in (Bodrossy et al., 2003) durchgeführt.



Es wurde die genomische DNA (gDNA) von folgenden Pflanzenarten extrahiert und amplifiziert *Kartoffel* (*Solanum tuberosum* L.) , *Paprika* (*Capsicum annuum* L.), *Bohne* (*Vicia faba*), *Tabak* (*Nicotiana glauca*), *Rose* (*Rubus idaeus*), *Mais* (*Zea mays* L.), *Soja* (*Glycine max*), *Sonnentau* (*Drosera rotundifolia* L.), *Kastanie* (*Castanea sativa* Mill.), *Kalanchoe* (*Kalanchoe daigremontiana*), *Apfel* (*Malus domestica*), *Kiefer* (*Pinus sylvestris* L.), *Weizen* (*Triticum aestivum* L.), *Götterbaum* (*Ailanthus altissima*), *Raps* (*Brassica napus*).

Um sicherzustellen, dass nur ein einziges Genfragment amplifiziert wurde (McKinney and Meagher, 1998; Muller et al., 2007), wurden die PCR-Produkte mit einem TA cloning kit (Clontech) geklont. Die Plasmid DNA wurde von *E.coli* mittels alkalischer Lysierung extrahiert. Nach der Extraction und Amplifikation mittels PCR wurden die Fragmente sequenziert (AGOWA GmbH) und wurden in Genbank eingereicht (Krainer S., 2009). Die Preparation der Proben ist in (Bodrossy et al., 2003) beschrieben.

Zur Kontrolle der PCR und zur Ermittlung der Fluorophore Inkorporation wurde ein ND-100 Spectrophotometer (NanoDrop, Wilmington, DE) verwendet.

Beispielsweise wurde folgender Versuch durchgeführt:

Die Hybridisierung erfolgte in einer Genewave Hybridisierungs- und Scanningstation (Marcy et al., 2008). Der Hybridisierungslösung bestand aus 6xSSC, 1x Denhardt's, 0.1 % SDS and 45% Formamid für die Systeme mit langen oligos und 25% formamide für die kurzen oligos. Die Konzentration der Proben wurde von 0.5 to 3.6 nM variiert. Die Lösung wurde für 5 min auf 95° erhitzt und danach sofort auf Eis gestellt um den Einfluss von Sekundärstrukturen zu reduzieren.

Während der 12 h Hybridisierungszeit wurde die Temperatur auf 42°C eingestellt und die Lösung agitiert. In der ersten Stunde wurde 1 Bild/Minute aufgezeichnet, danach alle 30 min ein Bild.

Nach der Hybridisierung wurden die slides bei 42°C gewaschen (5 min in 6x SSC, danach 5 min in 0.2x SSC). Vor dem Schmelzen wurden 15 Aufnahmen gemacht um

sicherzustellen, dass das System im Gleichgewicht ist und um das Ausbleichen des Fluorophors festzustellen. Zum Schmelzen wurde die Temperatur von 42°C to 85°C mit einer Rate von 1 °C/min erhöht. Dabei wurde alle 20s ein Bild aufgenommen.

Die Segmentierung und Quantifizierung der .tif files erfolgte mit der Hyblive software. Die Einstellung "irregular shape" wurde verwendet, alle anderen Parameter waren auf den Standardeinstellungen. Es wurde der Mittelwert aus den drei Replikaten genommen.

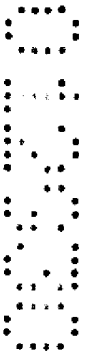
Eine besondere Weiterbildung des erfindungsgemäßen Verfahrens ermöglicht die Bestimmung der Konzentration der Probenmoleküle. Hierfür sind zwei auf gleiche Art durchzuführende Messungen der Hybridisierung erforderlich, die gleich durchgeführt werden. Bei der ersten Messung ist die Konzentration C_a^{ref} , C_b^{ref} der zu bestimmenden Probenmoleküle in einer vorgegebenen Referenzprobe bekannt. Es wird eine Referenz-Hybridisierungsreaktion durchgeführt und es werden die Intensitäten I zu den jeweiligen Zeitpunkten t gemessen. Diese Messung dient als Referenzmessung, wobei die Fitting-Parameter k_a , k_b ermittelt werden und die Konzentration C_a^{ref} , C_b^{ref} vorab bekannt sind. Mit der Formel

$$k_a = C_a^{ref} \cdot k_a', \quad k_b = C_b^{ref} \cdot k_b',$$

können die die Reaktionsgeschwindigkeit beschreibenden Parameter k_a' , k_b' ermittelt werden. Im Zuge der Referenzmessung werden die Fitting-Parameter A , k_a und k_b bestimmt. Anschließend werden anhand der ermittelten Fitting-Parameter sowie der angegebenen vorab bekannten Konzentrationen C_a^{ref} , C_b^{ref} , die Reaktionsgeschwindigkeiten k_a' , k_b' , ermittelt.

Für die zweite Messung, die nunmehr der Bestimmung der unbekannten Konzentration C_a^T , C_b^T von Molekülen einer Probe dient, wird angenommen, dass die die Reaktionsgeschwindigkeit beschreibenden Parameter k_a' und k_b' für beliebige Konzentrationen desselben Probenmoleküls konstant sind und auch bei weiteren Hybridisierungsreaktionen derselben Reaktionsprodukte etwa den selben Wert annehmen.

Die Ergebnisse der zweiten Messung werden durch eine Ausgleichskurve derselben Form, also der Form $I(t) = A'' \frac{k_a''}{k_b'' - k_a''} (e^{-k_a'' t} - e^{-k_b'' t})$ ausgewertet, wobei ein Satz von weiteren Fitting-Parametern A'' , k_a'' und k_b'' durch ein Fitting-Verfahren an die



Messdatensätze der zweiten Messung angepasst wird. Die Fitting-Parameter k_a'' und k_b'' werden durch jeweils ein Produkt aus der zu bestimmenden Konzentration C^T und der bereits bekannten Reaktionsgeschwindigkeit k_a' und k_b' ersetzt, sodass sich eine Formel der folgenden Form ergibt:

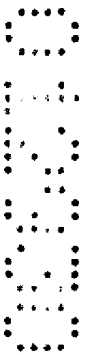
$$I(t) = A \cdot \frac{C_a^T \cdot k_a'}{C_b^T \cdot k_b' - C_a^T \cdot k_a'} \cdot \left(e^{-C_a^T \cdot k_a' \cdot t} - e^{-C_b^T \cdot k_b' \cdot t} \right)$$

$$k_a'' = C_a^T \cdot k_a' \quad k_b'' = C_b^T \cdot k_b',$$

Unter der bereits getroffenen Annahme, dass die Reaktionsgeschwindigkeiten k_a' und k_b' für sämtliche Messungen mit denselben Substanzen identisch sind, kann nunmehr die Konzentration der Probenmoleküle der zweiten Messung durch einfache Division ermittelt werden:

$$C_a^T = \frac{k_a''}{k_a'} \quad \text{und} \quad C_b^T = \frac{k_b''}{k_b'}$$

Fig. 4 zeigt einen Hybridisierungsverlauf $I_1^{ref}(t)$, $I_2^{ref}(t)$ für eine vorgegebene Referenzmessung bei einer initialen Konzentration von $C_a^{ref} = 0,5 \text{ nM}$ für zwei unterschiedliche Arten von Molekülen (01x277, 0,5x399). Weiters zeigt Fig. 4 den Hybridisierungsverlauf $I_1^{mess}(t)$, $I_2^{mess}(t)$ für die Messung einer zu bestimmenden Konzentration, die vorab mit einem alternativen Verfahren auf 3,6 nM bestimmt worden ist. Durch Auswertung der experimentellen Werte, nach dem eben beschriebenen Verfahren, erhält man eine Konzentration von $C_a^T = 3,66 \text{ nM}$.



Patentansprüche:

1. Verfahren zur Approximation der Kinetik einer Hybridisierungsreaktion einer Probe von DNA, RNA, Proteinen und/oder synthetischen Nukleinsäuren, oder PNA oder LNA, basierend auf einer Anzahl von Messdatensätzen umfassend jeweils einen Messwert (I), der proportional zur Konzentration der an einem Fängermolekül anhaftenden zu messenden Moleküle der Probe ist, sowie die zugehörige Messzeit (t),

dadurch gekennzeichnet, dass die ermittelten Messdatensätze mittels eines Fitting-

Verfahrens an eine Kurve der Form
$$I(t) = A \frac{k_a}{k_b - k_a} (e^{-k_a t} - e^{-k_b t})$$
 angepasst werden,

wobei die Fitting-Parameter A, k_a und k_b im Zuge des Fitting-Verfahrens an die Messdatensätze angepasst werden.

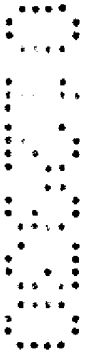
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Messdatensätze während des Ablaufs der Hybridisierungsreaktion aufgezeichnet werden, wobei die Probe gegebenenfalls bestrahlt und/oder mit Markermolekülen versetzt wird, und dass in vorgegebenen Zeitabständen Messungen der Intensität (I) der von der Probe reflektierten bzw. durch Fluoreszenz abgestrahlten Intensität (I) vorgenommen werden und gegebenenfalls gemeinsam mit dem Zeitpunkt (t) der Messung abgespeichert werden.

3. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass nach der Bestimmung einer Anzahl von Messdatensätzen jeweils ein Fitting-Schritt durchgeführt wird und basierend auf den bisher ermittelten Ergebnissen jeweils eine verbesserte Fitting-Kurve erstellt wird.

4. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Hybridisierungsrate näherungsweise als Fitting-Parameter k_a ermittelt und/oder diesem gleichgesetzt wird und/oder dass die Denaturierungsrate näherungsweise als Fitting-Parameter k_b ermittelt bzw. diesem gleichgesetzt wird.

5. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass für die Durchführung für des Fitting-Verfahrens der Fitting-Parameter k_b und/oder die Denaturierungsrate näherungsweise auf null gesetzt wird.

6. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Probenträger als Microarray ausgestaltet ist und/oder dass die Helligkeitsmessungen durch Aufnahme eines Digitalbildes des Microarrays durchgeführt wird.



7. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Probenträger an zumindest einer Seite von einem Microarray begrenzt ist, und die Bestimmung des Messwerts durch Aufnahme eines Digitalbildes des Microarrays durchgeführt wird.

8. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe in einen Probenträger verbracht wird, wobei an einer der Begrenzungsflächen des Probenträgers Fängermoleküle angeordnet sind, die eine vorgegebene Art von Molekülen binden, wobei die Anzahl der an den Fängermolekülen befindlichen Moleküle, DNA, RNA, PNA, LNA oder Proteinen, als Messwert I bestimmt werden.

9. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass als Messwert die von der Probe reflektierte und/oder, insbesondere durch Lumineszenz, vorzugsweise Fluoreszenz, abgestrahlte Lichtintensität herangezogen wird.

10. Verfahren gemäß Anspruch 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass jedem Rasterpunkt des Microarrays vorab ein oder mehrere Pixel des Digitalbilds zugeordnet werden und aus den Lichtintensitätswerten der jeweiligen Pixel die jeweiligen Messwerte (I) der in den Rasterpunkten des Microarrays befindlichen Proben bestimmt werden und dass für jeden Rasterpunkt des Microarrays laufend separate Messungen und Fitting-Verfahrensschritte durchgeführt werden.

11. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass als Messwert (I) die elektrische Leitfähigkeit, die Magnetisierbarkeit, die Impedanz der Fängermoleküle bei einer vorgegebenen Frequenz, insbesondere zwischen 1 Hz und 10^7 Hz, oder die Änderung des Brechungsindex der Probenmoleküle herangezogen wird.

12. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass als Messwert I die Gewichtszunahme bedingt durch das Anhaften der Moleküle an den Fängermolekülen herangezogen wird.

13. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zur Bestimmung der Fitting-Parameter A, k_a , k_b ein Gauß-Newton-Verfahren verwendet wird.

14. Verfahren gemäß einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der zeitlich letzte Messdatensatz herangezogen wird und sämtliche Messwerte (I) der Messdatensätze (I) durch den Messwert (I) des zeitlich letzten Messdatensatzes dividiert werden.



15. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass in einem ersten Schritt zur Kalibrierung eine Referenzprobe mit einer vorgegebenen Konzentration C_a^{ref} , C_b^{ref} von zu messenden Molekülen hergestellt wird und für diese eine Referenz-Hybridisierungsreaktion durchgeführt wird, wobei die Fitting-Parameter A, k_a , k_b bestimmt werden,

dass Reaktionsgeschwindigkeiten k_a' , k_b' bestimmt werden, wobei $k_a = C_a^{ref} \cdot k_a'$ und $k_b = C_b^{ref} \cdot k_b'$ und

dass eine Messprobe mit einer zu bestimmenden Konzentration C_a^T , C_b^T einer Mess-Hybridisierungsreaktion unterzogen wird, und für die ermittelten Messdatensätze erneut weitere Fitting-Parameter A'', k_a'' und k_b'' bestimmt werden und die zu bestimmenden Konzentrationen C_a^T , C_b^T gemäß $C_a^T = \frac{k_a''}{k_a'}$ und $C_b^T = \frac{k_b''}{k_b'}$ bestimmt werden.

16. Datenträger auf dem ein Programm zur Durchführung eines Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15 abgespeichert ist.

17. Datenträger mit elektronisch auslesbaren Steuersignalen, die so mit einem programmierbaren Computersystem zusammenwirken können, dass ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15 ausgeführt wird.

18. Computerprogramm mit Programmcode-Mitteln eingerichtet zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 15, wenn das Programm auf einem Computer ausgeführt wird,

19. Computerprogramm nach Anspruch 18, gespeichert auf einem Datenträger.

20. Computerprogrammprodukt mit Programmcode zur Ausführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 15, wenn das Programm auf einem Computer ausgeführt wird.

Wien, am 3 Dezember 2010

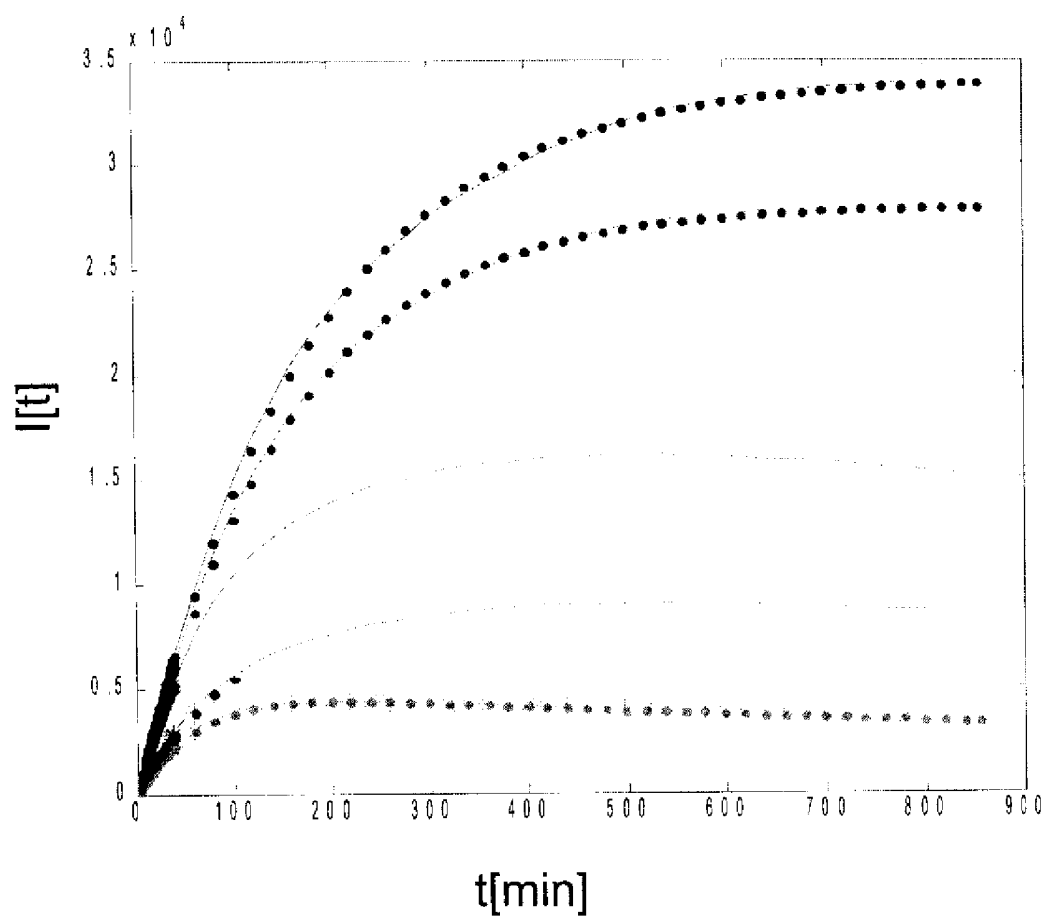


Fig. 1

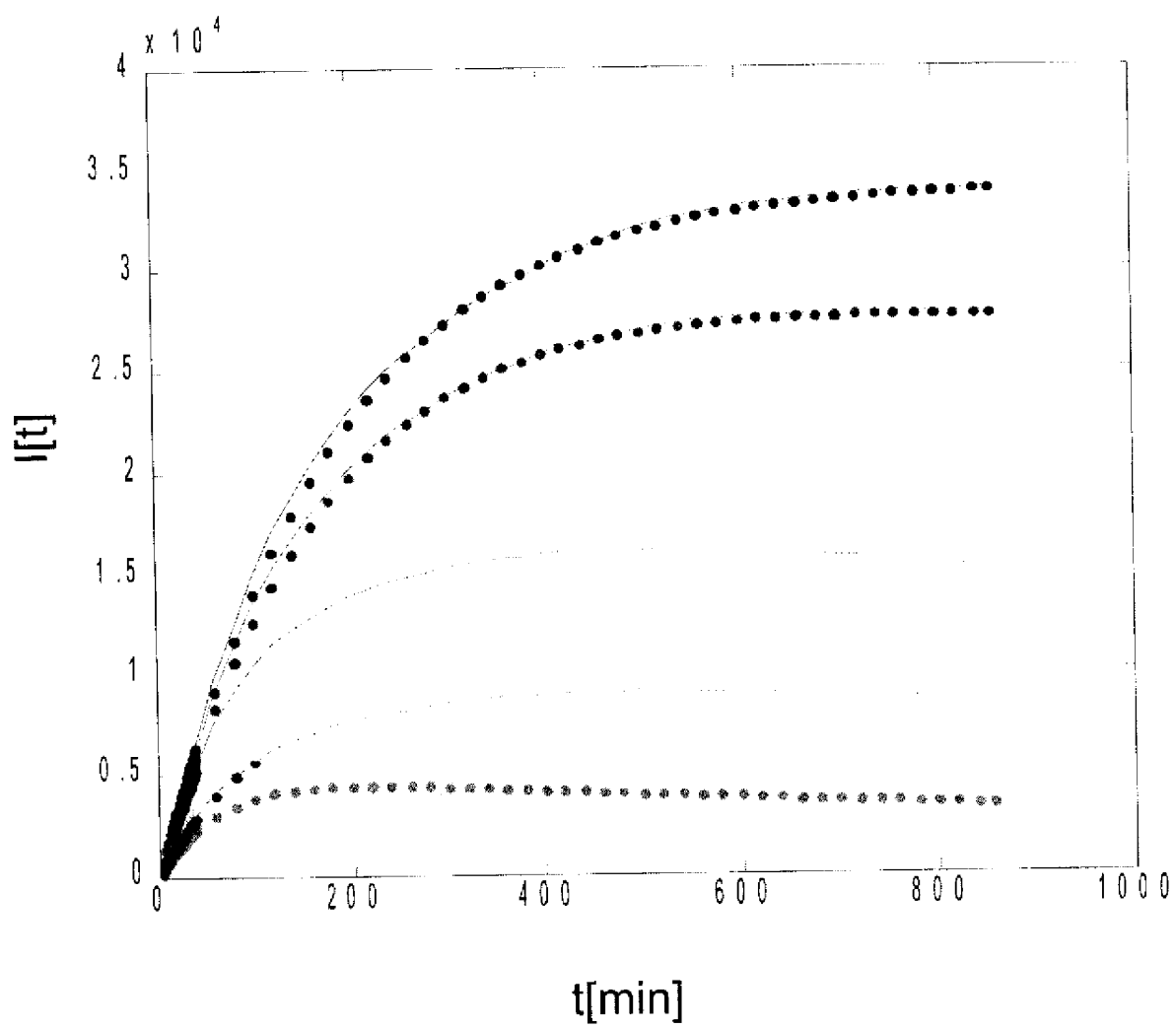


Fig. 2

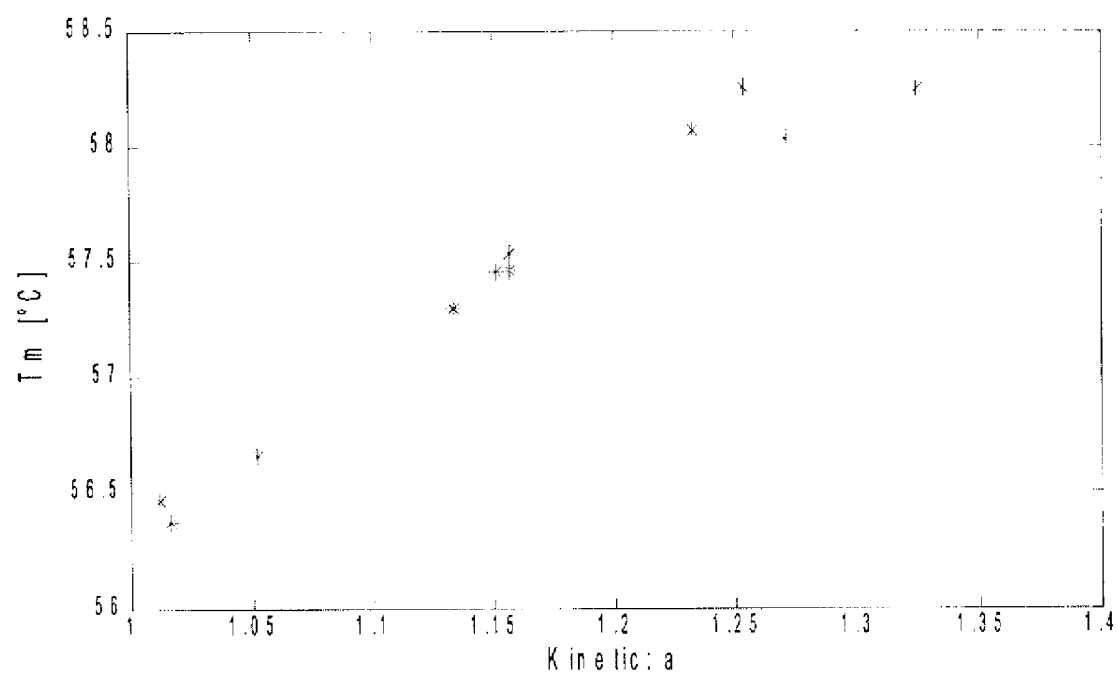


Fig. 3

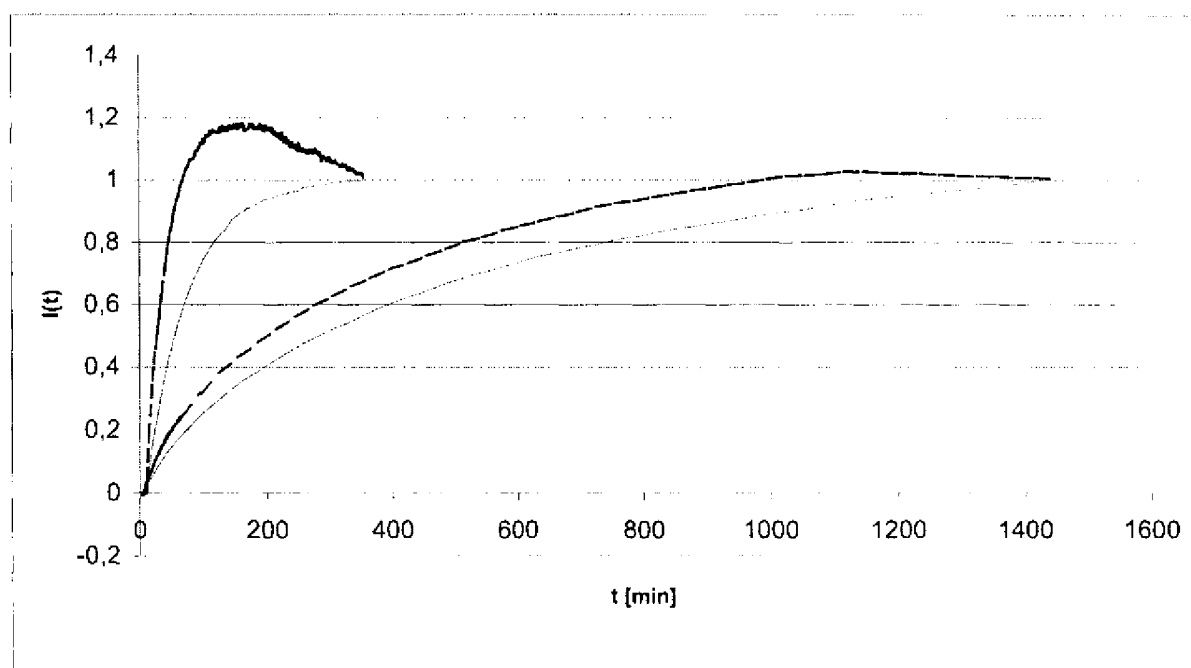


Fig. 4