

# Label-freier Nachweis von miRNA mit DNA-Biosensoren auf der Basis einer Quarzmikrowaage

Parvaneh Rahimi<sup>1</sup>, Maryam Rezvani Amin<sup>2</sup>, Sedigheh Falahi<sup>1</sup>, Yvonne Joseph<sup>1</sup>,

<sup>1</sup> Institut für Elektronik- und Sensormaterialien, Fakultät für Werkstoffwissenschaft und Werkstofftechnologie, Freiberg/Deutschland

<sup>2</sup>Fakultät für Chemie und Physik, Freiberg/Deutschland

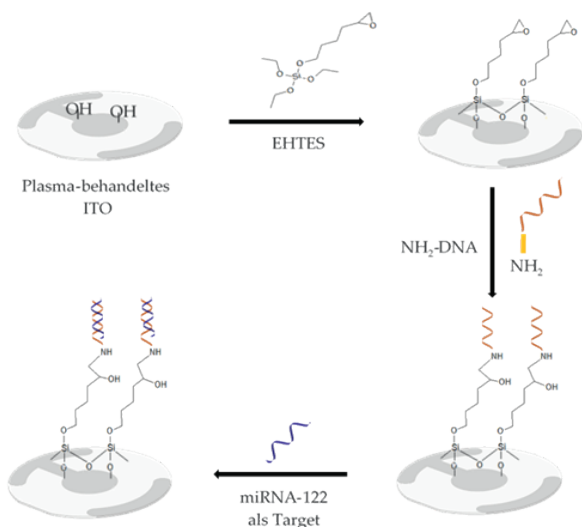
Kontakt: Parvaneh.Rahimi@esm.tu-freiberg.de

## Einleitung

Krebs ist eine der häufigsten Todesursachen weltweit [1]. Bis 2040 wird die Zahl der jährlichen Krebsneuerkrankungen voraussichtlich auf 29,5 Millionen und die Zahl der krebsbedingten Todesfälle auf 16,4 Millionen ansteigen. [2]. Leberkrebs ist weltweit die sechsthäufigste Krebserkrankung, aber die zweithäufigste Krebstodesursache mit jährlich mehr als 700.000 Todesfällen [3]. Die hohe Mortalitätsrate von Leberkrebs ist darauf zurückzuführen, dass es im Frühstadium keine Symptome gibt [4], [5]. Daher wird Leberkrebs in der Regel erst spät im Krankheitsverlauf diagnostiziert. Die Diagnose wird in der Regel durch Ultraschall, Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT) gestellt [6]. Eine zuverlässige Erkennung von Leberkrebs im Frühstadium ist ein entscheidender Schritt, um dessen hoher Mortalitätsrate entgegenzukommen [7]. In den letzten Jahren haben sich der Nachweis und die Analyse von Krebs-Biomarkern als wirksames Instrument zur Krebsvorsorge, Diagnose, Prognose und Behandlung etabliert. Biomarker sind Biomoleküle in den Geweben und Körperflüssigkeiten des Menschen, deren Werte sich bei der Entwicklung abnormaler Zustände und verschiedener Krankheiten wie Krebs verändern [8]. Zahlreiche Biomoleküle wurden als Biomarker für Leberkrebs in Betracht gezogen unter anderem Nucleinsäuren, Proteine, Saccharide, Metabolite sowie größere biologische Einheiten, wie z.B. ganze Tumorzellen [9]. MicroRNAs (miRNAs) sind eine Klasse von nicht-kodierenden Genen, die als RNA-Sequenzen von etwa 22 Nucleotiden Länge transkribiert werden. Das abnorme Expressionsmuster der miRNA trägt zur Krebsentstehung und -progression bei [10]. Für den Nachweis von miRNA wurden bereits viele verschiedene Methoden entwickelt, z. B. Northern Blotting, Microarray, und quantitative Polymerasekettenreaktion mit reverser Transkriptase. Trotz der angemessenen analytischen Leistung haben diese Techniken entscheidende Nachteile, wie z. B. einen hohen Zeitaufwand, ein großes Probenvolumen und teure Geräte. Daher ist die Entwicklung neuer, zuverlässiger und kostengünstiger Plattformen für das miRNA-Screening von entscheidender Bedeutung. DNA-basierten Biosensoren ermöglichen eine schnelle und selektive Identifikation von miRNAs [11]. Verschiedene DNA-basierten Biosensoren wie elektrochemische, optische und elektromechanische Biosensoren wurden bereits umfassend für den Nachweis von krebisrelevanten miRNAs

entwickelt, um Krebs in einem frühen Stadium zu diagnostizieren. Elektromechanische Biosensoren sind interessante Analysegeräte, die das Grundprinzip einer Antwort auf eine Veränderung der Masse nutzen. Ein Biosensor, der auf der Quarzkristall-Mikrowaagen-Technologie (QCM) basiert, ist eine der häufigsten markierungsfreien elektromechanischen Biosensing-Plattformen für den Nachweis einer breiten Anzahl von Biomolekülen. Darüber hinaus bieten QCM-Biosensing-Assays eine hohe Empfindlichkeit und einen kurzen Nachweisprozess, was sie für die Entwicklung neuartiger Einweg-Diagnoseinstrumente attraktiv macht [12]. QCM-Biosensoren bestehen aus einem piezoelektrischen Kristall (Quarz), der mit einer Elektrode beschichtet ist, und ihre Funktion basiert auf der Änderung der Resonanzfrequenz des Quarzes als Reaktion auf die Anlagerung eines Zielmoleküls. DNA-Sonden können auf QCM-Sensoroberflächen immobilisiert werden. Die Zugabe einer miRNA-haltigen Probe und die anschließende Hybridisierung von DNA/miRNA führt zu einer Massenlagerung an der Kristalloberfläche und erzeugt eine Frequenzantwort. Die Immobilisierung der DNA Sonde auf der QCM-Sensoroberfläche ist dabei ein entscheidender Schritt bei der Herstellung dieser DNA-Biosensoren. Die Silanisierung ist dafür ein einfacher, attraktiver und relativ kostengünstiger Ansatz zur kovalenten Modifizierung der Sensoroberfläche [13]. Silan-Kopplungsmittel haben verschiedene funktionelle Gruppen (z. B. Amin-, Carboxyl- und Epoxygruppen), reagieren leicht mit hydroxylierten (OH) Oberflächen und bieten damit eine ideale Plattform für die Anbringung von Biomolekülen [14]. In dieser Arbeit wurde die Indium-Zinnoxid (ITO)-Elektrode des QCM-Sensors zunächst über eine O<sub>2</sub>-Plasmabehandlung hydroxyliert und dann mit 5,6-Epoxyhexyltriethoxysilan (EHTES) als Epoxy-Kopplungsmittel funktionalisiert, um den NH<sub>2</sub>-terminierten DNA-Strang über eine Epoxy-Ringöffnungsreaktion durch nukleophilen Angriff der NH<sub>2</sub>-Gruppen zu immobilisieren. Nach erfolgreicher Immobilisierung der DNA-Sonde auf der ITO-Oberfläche ist der Sensor bereit für die Detektion von Hybridisierungsereignissen der komplementären miRNA-122 (als Leberkrebs-Biomarker), die zu einer messbaren Frequenzänderung führen.

Hydroxylierung, Silanisierung, Immobilisierung von NH<sub>2</sub>-DNA und Hybridisierung von miRNA auf der Oberfläche der ITO-Elektrode sind in Schema 1 dargestellt.



**Abb. 1:** Schematische Darstellung der Modifizierung von ITO-Elektrode als QCM-Sensor

## Methoden und Materialien

### Silanisierung der Oberfläche der ITO-Elektrode

Vor der Funktionalisierung wurde die ITO-Elektrode mit Ethanol, Aceton und 2-Propanol gereinigt und mit Argongas getrocknet. Um die schwach gebundenen Verunreinigungen effizient zu entfernen und die Substratoberflächen zu aktivieren, indem polare Gruppen auf der Oberfläche für eine weitere kovalente Immobilisierung eingebaut werden, wurden sie 5 Minuten lang einem Sauerstoffplasma ausgesetzt. Die resultierende hydroxylterminierte ITO-Elektrode wurde 30 Minuten lang bei 100 °C in eine EHTES-Lösung (1,5 % v/v in Toluol) getaucht, dann gründlich mit Toluol und entionisiertem Wasser gespült und mit Argongas getrocknet.

### DNA-Immobilisierung auf der silanisierten ITO Elektrode

Für die Immobilisierung einer inosinmodifizierter DNA (CAAA CAC CAT TIT CAC ACT CCA), die am 3'-Ende mit einem C6-Aminolinker (Eurofins) versehen wurde, wurde eine NH<sub>2</sub>-DNA-Lösung (1,0 µM in Tris-HCl-Puffer, pH 8) auf die Oberfläche der epoxyfunktionalisierten ITO-Elektrode getropft und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert, dann wurde mit Tris-HCl-Puffer gespült, um nicht gebundene DNA zu entfernen. Die DNA kann durch eine Epoxyd-Ringöffnungsreaktion durch nukleophilen Angriff der NH<sub>2</sub>-Gruppen effektiv immobilisiert werden.

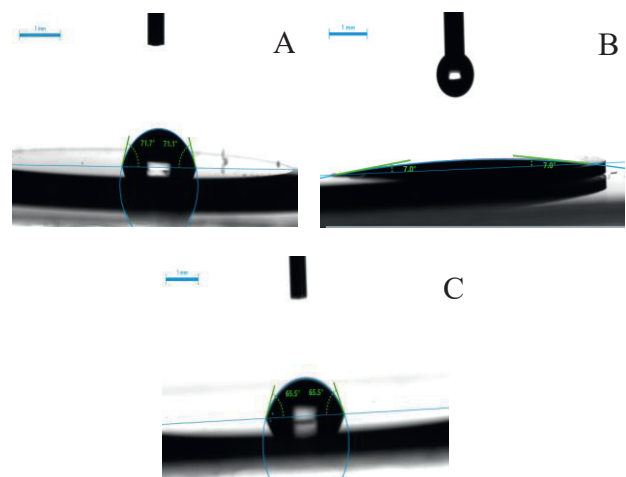
### Hybridisierung und Detektion des miRNAs-122

Die Hybridisierung und Detektion des miRNAs-122 ((UGG AGU GUG ACA AUG GUG UUUG) wurde durch QCM-Messung bestätigt. Die Hybridisierung und der Nachweis von miRNA durch QCM-Messung wurde durch verschiedene Parameter wie Pufferlösung, Durchflussrate und Hybridisierungszeit optimiert.

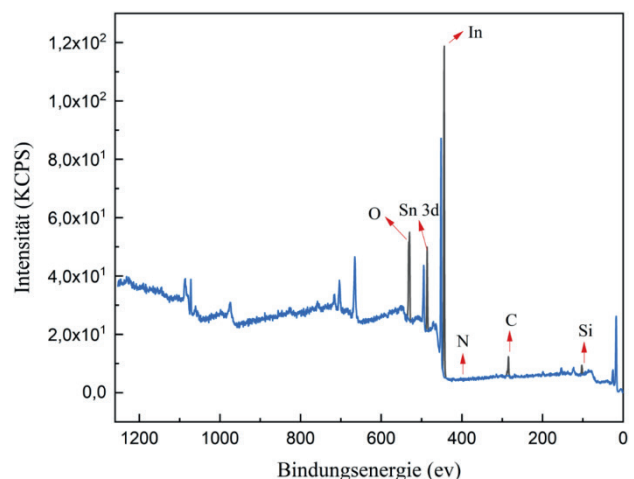
## Ergebnisse

Um die erfolgreiche Funktionalisierung vor weiteren Experimenten zu überprüfen, wurden Kontaktwinkelmessungen mit Wassertropfen an der Oberfläche von unbehandelten, mit O<sub>2</sub>-Plasma behandelten und epoxyd-funktionalisierten ITO-Elektroden durchgeführt (Abb. 2).

Die Veränderung der chemischen Zusammensetzung der ITO-Elektrodenoberflächen nach der Epoxyd-funktionalisierung und der DNA-Immobilisierung wurde ebenfalls mittels Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS) untersucht. Abbildung 3 zeigt repräsentative XPS-Spektren mit breiter Energieverteilung.

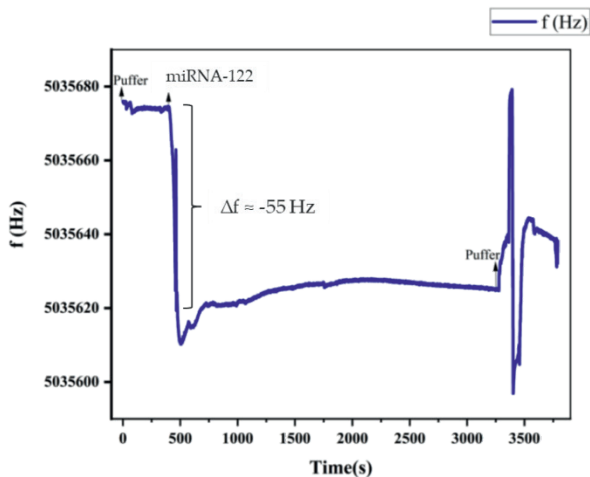


**Abb. 2:** Kontaktwinkelmessungen von A) unbehandelten, B) mit O<sub>2</sub>-Plasma behandelten und C) silanisierten ITO-Elektroden



**Abb. 3:** XPS-Analyse der ITO-Elektrode nach Silanisierung und DNA-Immobilisierung

Der Nachweis von miRNA durch QCM-Messungen ist in Abbildung 4 dargestellt.



**Abb. 4:** QCM- Messung; Frequenzänderung der modifizierten ITO-Elektrode nach Zugabe von 2.5  $\mu\text{M}$  miRNA-122 und Hybridisierung mit DNA

## Diskussion

Kontaktwinkelmessungen mit Hilfe von Sessile-Drop-Techniken werden häufig zur Charakterisierung von beschichteten Oberflächen oder Oberflächenmodifikationen verwendet. Wie gezeigt, verringerte sich der Wasserkontaktwinkel der blanken ITO-Elektrode (Abb. 2A) nach der Behandlung mit  $\text{O}_2$ -Plasma (Abb. 2B), was auf die hochgradig hydrophilen Oberflächen durch die dichte Bildung von Hydroxylgruppen auf der Oberfläche zurückgeführt werden kann.

Nach der Reaktion mit EHTES vergrößerte sich der Wasserkontaktwinkel des epoxidfunktionalisierten Substrats (Abb. 2C), was auf die hydrophobe Natur der Silanmoleküle zurückzuführen ist [15]. Es wurde bereits berichtet, dass die Temperatur und die Dauer der Silanisierung den Grad der Silanisierung beeinflussen. Um diese Faktoren zu optimieren, wurde die Silanisierungsreaktion bei verschiedenen Temperaturen (60–120 °C) und Reaktionszeiten (30–240 Minuten) durchgeführt. Schließlich wurden eine Temperatur von 100 °C und eine Reaktionszeit von 30 Minuten als die optimalen Bedingungen für den maximalen Silanisierungsgrad des Substrats ermittelt.

Die Veränderung der chemischen Zusammensetzung der ITO-Elektrodenoberflächen nach der Silanisierung und der DNA-Immobilisierung wurde auch mittels XPS untersucht. Repräsentative breitbandige XPS-Spektren liefern eindeutige Beweise für die Silanisierung und DNA-Immobilisierung. Wie in Abb.3 gezeigt wurde, erscheinen Peaks bei 529.70 eV, 284.70 eV, und 399.83 eV, die dem Sauerstoff bzw. dem Kohlenstoff und Stickstoff in der DNA-Sonde gehören [16]. Drei Peaks bei 443,7, 486,20 und 102,70 eV, die In 3d, Sn 3d bzw. Si 1s entsprechen, werden auf die Oberflächenzusammensetzung des ITO zurückgeführt [17]. Die Kontaktwinkel- und XPS-Ergebnisse bestätigen, dass EHTES ein vielversprechendes Epoxid-Silan-Mittel für die direkte und effektive Immobilisierung von Biomolekülen mit

Aminogruppen ist, ohne dass eine zusätzliche Reaktion erforderlich ist.

Abbildung 4 zeigt die QCM-Frequenzverschiebung bei Einwirkung der miRNA-122-Lösung. Wie bereits erwähnt, wurden verschiedene Faktoren wie Durchflussrate, Pufferlösung und Hybridisierungszeit der miRNA optimiert. Unter optimierten Bedingungen ist der Frequenzabfall nach Einwirkung der miRNA-122-Lösung deutlich zu erkennen. In Anwesenheit von 2,5  $\mu\text{M}$  miRNA-122 und einer optimalen Durchflussrate von 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  und einer Hybridisierungszeit von 30 Minuten wurde eine Frequenzänderung von -55 Hz gemessen. Dieses Ergebnis zeigt, dass der in dieser Arbeit entwickelte Sensor eine vielversprechende Technik zum Nachweis von miRNAs als Krebs-Biomarker ist.

## Literatur

- [1] BAX, C.; LOTESORIERE B. J. J.; SIRON, S.; CAPELLI, L.: Review and Comparison of Cancer Biomarker Trends in Urine as a Basis for New Diagnostic Pathways. In: *cancers*, 11 (2019), Nr. 1244, S. 1-42.
- [2] KULOTHUNGAN, V.; SATHISHKUMAR, K.; LEBURU, S.; RAMAMOORTHY, T.; STEPHEN, S.; BASAVARAJAPPA, D.; TOMY, N.; MOHAN, R.: Burden of cancers in India – estimates of cancer crude incidence, YLLs, YLDs and DALYs for 2021 and 2025 based on National Cancer. In: *BMC Cancer*, 22 (2022), Nr. 527, S. 1-12.
- [3] FALAHI, S.; RAFIEE-POUR, H. A.; ZAREJOUSHEGHANI, M.; RAHIMI, P.; JOSEPH, Y.: Non-Coding RNA-Based Biosensors for Early Detection of Liver Cancer. In: *Biomedicines*, 9(2019), Nr. 964, S. 1-23.
- [4] PETRICK, J. L.; MCGLYNN, K. A.: The Changing Epidemiology of Primary Liver Cancer, In: *Curr Epidemiol Rep*, 6(2019), Nr. 2, S. 104–111.
- [5] ZHU, P.; LI, F.; ZENG, J.; TANG, D.; CHEN, W.: Integrative analysis of the characteristics of lipid metabolism-related genes as prognostic prediction markers for hepatocellular carcinoma. In: *Eur. Rev. Med. Pharmacol*, 25 (2021), S. 116-126.
- [6] VOGEL, A.; CEVANTES, A.; CHAU, I.; DANIELE, B.; LIOVET, J. M.; MEYER, T.; NAULT, J.: Hepatocellular carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. In: *Annals of Oncology*, 29 (2018), Nr. 4, S. 238-255.
- [7] MANSOURI, V.; RAZZAGHI, M.; NIKZAMIR, A.; AHMADZADEH, A.; IRANSHAHI, M.; HAGHAZALI, M.; HAMIDEH, M.: Assessment of liver cancer biomarkers. In: *Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench*, 13 (2020), S. 29-39.
- [8] WU, X.; MU, F.; WANG, Y.; ZHAO, H.: Graphene and Graphene-Based Nanomaterials for DNA Detection: A Review. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 23 (2018), Nr. 8, S. 1-23.
- [9] WU, L.; QU, X.: Cancer biomarker detection: recent achievements and challenges. In: *Chemical Society Reviews*, 44 (2015), Nr. 10, S. 2963-2997.
- [10] GONG, J.; HE, X.-X.; TIAN, D. A.: Emerging role of microRNA in hepatocellular carcinoma (Review). In: *Oncology letters*, 9 (2015), Nr. 3, S. 1027–1033.
- [11] MUJICA, M. L.; GALLAY, P. A.; PERRANCHIONE, F.; MONTEMERLO, A. E.; TAMBORELLI, L. A.;

- VASCETTI, V. M.; REATERS, D. F.; BOLLO, S.; RODRIGUEZ, M. C.; DALMASSO, P. R.; RUBIANES, M. D.; RIVAS, G. A.: New trends in the development of electrochemical biosensors for the quantification of microRNAs. In: *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 189 (2020), S. 113478.
- [12] LIM, J.Y.; LEE, S.S.: Sensitive detection of microRNA using QCM biosensors: Sandwich hybridization and signal amplification by TiO<sub>2</sub> nanoparticles. In: *Anal. Methods*, 12 (2020), S. 5103–5109.
- [13] SUNG, D.; PARK, S.; JON, S.: Facile Immobilization of Biomolecules onto Various Surfaces Using Epoxide-Containing Antibiofouling Polymers. In: *Langmuir* (2012), Nr. 28, S. 4507–4514.
- [14] UDOMSOM, S.; MANKONG, U.; PAENGNKORN, P.; THEERA-UMPON, N.: Novel Rapid Protein Coating Technique for Silicon Photonic Biosensor to Improve Surface Morphology and Increase Bioreceptor Density. In: *Coatings* 11 (2021), Nr. 595, S. 1-19.
- [15] KAMRA, T.; CHAUDHARY, S.; XU, C.; JOHANSSON, N.; MONTELIUS, L.; SCHNADT, J.; YE, L.: Covalent immobilization of molecularly imprinted polymer nanoparticles using an epoxy silane. In: *J. Colloid Interface Sci.* (2015), Nr. 445, S. 277–284.
- [16] ESCORIHUELA, J.; BANULS, M. J.; PUCHADES, R.; MAQUIEIRA, A.: Development of Oligonucleotide Microarrays onto Si-Based Surfaces via Thioether Linkage Mediated by UV Irradiation, In: *Bioconjugate Chem.* (2012), Nr. 28, S. 2121–2128.
- [17] GEORGIEVA, V.; ALEKSANDROVA, M.; STEFANOV, P.; GRECHNIKOV, A.; GADJANOVA, V.; DILOVA, T.; ANGLOV, TS.: Study of quartz crystal microbalance NO<sub>2</sub> sensor coated with sputtered indium tin oxide film, In: *Journal of Physics* (2015), Nr. 558, S. 1-6.