

4 ERGEBNISSE

4.1 HALBAUTOMATISCHE *IN VITRO*-SELEKTION

Da die Aptamer-Selektion für gewöhnlich ein repetitiver, zeitaufwändiger Prozess ist, wurde die SELEX im Zuge dieser Arbeit an den Roboter BioSprint 15 angepasst, wodurch eine schnelle und parallelisierte Selektion von DNA-Aptameren unter reproduzierbaren Bedingungen ermöglicht wird. Als Oberfläche für die Selektion wurden magnetische Partikel verwendet, die aufgrund ihrer geringen Größe (10 μm Durchmesser) ein vorteilhaftes Verhältnis von Oberfläche zu Volumen besitzen und deshalb das Selektionstarget in hoher Dichte präsentieren können. Die Immobilisierung des Targets über Biotin-Streptavidin ermöglicht zusätzlich eine einfache Übertragung auf andere Systeme wie FLAA oder Biacore.

4.1.1 Biotinylierung von Daunorubicin

Daunorubicin wurde an der 3'-Aminogruppe mit einem Überschuss Sulfo-NHS-SS-Biotin biotinyliert (Abbildung 14). Die Reaktion wurde über analytische DC überprüft, wobei die Umsetzung nahezu vollständig verlief (Abbildung 15). Das Produkt mit einem R_f -Wert von 0,67 wurde im Anschluss über präparative DC abgetrennt und gereinigt.

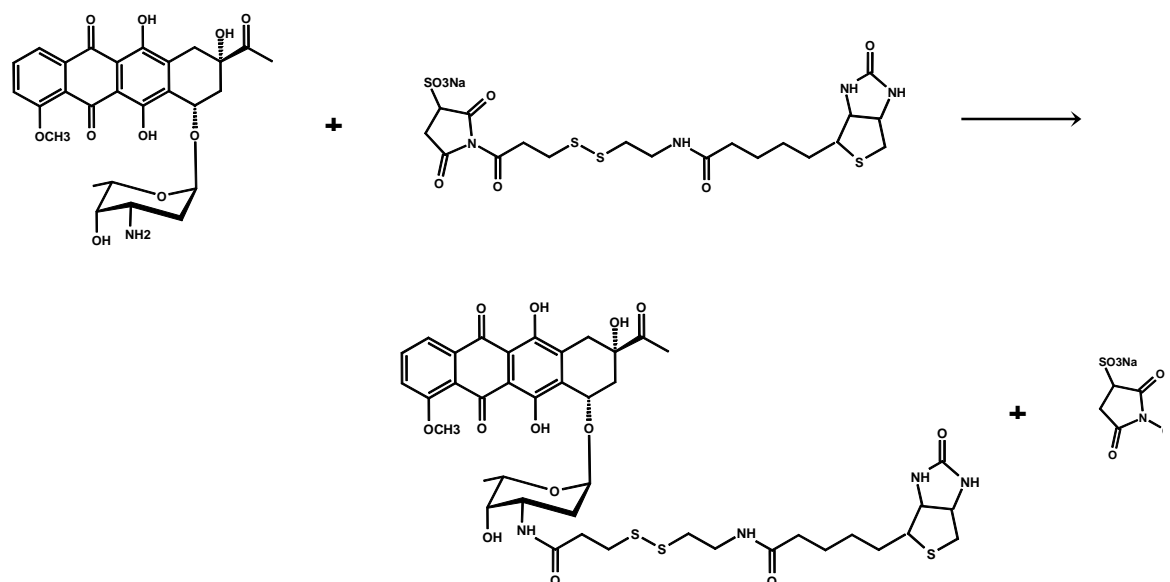


Abbildung 14: Reaktionsschema zur Biotinylierung von Daunorubicin. Daunorubicin wird über Sulfo-NHS-SS-Biotin in einer Additions-Eliminierungs-Reaktion an der 3'-Aminogruppe biotinyliert.



Abbildung 15: Analytische DC der Biotinylierung von Daunorubicin. Nach dem Chromatographielauf zeigt das Edukt Daunorubicin (DRN) einen roten Spot mit einem $R_f = 0,25$. Das Produkt biotinyliertes Daunorubicin (BioDRN) hat einen $R_f = 0,67$. Nachweisbar ist hier nur ein einziger Spot, was darauf schließen lässt, dass die Reaktion nahezu vollständig abgelaufen ist. Für das Edukt Sulfo-NHS-SS-Biotin (NHS) ist kein Spot sichtbar.

4.1.2 Durchführung der Selektion

Mit Hilfe des Roboters BioSprint 15 wurden zehn Runden einer halbautomatischen *in vitro*-Selektion gegen Daunorubicin unter den im Methoden-Teil beschriebenen Bedingungen durchgeführt, wobei Fünf-Kammern-Strips aus Plastik mit einem maximalen Fassungsvermögen von 1 ml pro Kammer verwendet wurden.

Als Bindungspuffer (BP-T) wurde 20 mM Tris/HCl, pH 7,4, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 0,05 % Tween 20 verwendet. Das Detergens dient dabei der Reduktion unerwünschter hydrophober Wechselwirkungen zwischen DNA und Selektionsmatrix (Eulberg *et al.* 2005a).

Die verwendete ssDNA-Bibliothek wurde von der Firma Purimex GmbH mit „extra wobble set-up“ hergestellt. Gemäß Herstellerangaben wird mit dieser Einstellung ein gleichmäßiger Einbau aller vier Nukleotide gewährleistet, der die unterschiedlichen Reaktivitäten der einzelnen Phosphoramitide berücksichtigt. Die ssDNA bestand aus einem randomisierten Bereich von 40 Nukleotiden, der auf beiden Seiten von konstanten Bereichen mit jeweils 20 Nukleotiden flankiert war.

Bei 40 Nukleotiden im randomisierten Bereich ist für die Diversität der DNA-Bibliothek eine theoretische Zahl von 4^{40} oder $1,2 \cdot 10^{24}$ verschiedenen Molekülen möglich. Da jedoch nur 80 nmol ssDNA synthetisiert wurden, sind maximal $4,8 \cdot 10^{16}$ verschiedene Moleküle zu erwarten.

Um eine möglichst große Diversität zu gewährleisten, wurde in die erste Runde 1 nmol (26,4 μ g) ssDNA ($5,9 \cdot 10^{14}$ Moleküle) eingesetzt, in den folgenden vier Runden wurde weiterhin so viel ssDNA, wie nach der Einzelstrangisolierung möglich war, nämlich 38 pmol in Runde 2, 45 pmol in Runde 3, 53 pmol in Runde 4 und 42 pmol in Runde 5. Ab Runde 6 wurden jeweils 18 pmol (500 ng) ssDNA pro Runde eingesetzt.

Standardmäßig wurden 100 pmol des biotinylierten Daunorubicins an 150 µl (1,5 mg) streptavidinbeschichtete magnetische Partikel gekoppelt. In der ersten Runde wurden die gesamten 150 µl eingesetzt, in den folgenden Runden das Volumen entsprechend dem gewünschten Verhältnis an eingesetzter DNA zu Target reduziert (Tabelle 1).

Jede Selektionsrunde umfasste die Schritte der Interaktion der ssDNA mit Daunorubicin, drei Waschschriffe, spezifische Elution (ab Runde 2), Amplifikation und Einzelstrang-Herstellung. Die Stringenz wurde im Laufe der Runden durch Erhöhung des Waschvolumens und Verlängerung der Waschschriffe verstärkt. Außerdem wurden matrixaffine DNA-Moleküle ab der vierten Runde durch Vorinkubation des Pools mit ungekoppeltem Säulenmaterial abgereichert. Die Säulenvolumina dieser sogenannten Vorsäule wurden im Laufe der Selektion erhöht (Tabelle 2).

In der ersten Selektionsrunde wurde kein Elutionsschritt durchgeführt, sondern es wurden alle sich auf den Beads befindlichen ssDNAs amplifiziert, um möglichst wenig Verluste an Bindern zu erreichen. Ab der zweiten Runde wurden im abschließenden Elutionsschritt durch Reduktion der Disulfidbrücke im Spacer des Daunorubicin-Biotin-Konjugats spezifisch alle an Daunorubicin gebundenen Nucleinsäuren zusammen mit dem Targetmolekül eluiert.

Der Verlauf der Selektion wurde während der Durchführung qualitativ über PCR analysiert. Dafür wurde die Menge an DNA in den unterschiedlichen Fraktionen (letzte Waschfraktion, Elutionsfraktion, Überstand, Beads) nach der Amplifikation verglichen. Da die letzte Waschfraktion erst von der 5. Runde an ebenso lang inkubiert wurde wie die Elutionsfraktion (Tabelle 2), ist erst hier ein direkter Vergleich der DNA-Mengen möglich.

Die PCR-Analyse der fünften und der zehnten Selektionsrunde ist in Abbildung 16 beispielhaft dargestellt. Die relative Menge an DNA in der Waschfraktion und auf den Beads nahm im Laufe der Selektion ab, während das relative Signal in der Elutionsfraktion anstieg. Dies deutet auf einen steigenden Anteil an bindenden Spezies und auf eine Abnahme nicht bindender bzw. matrixbindender Nucleinsäuren im DNA-Pool hin. Außerdem nahm die Anzahl der PCR-Zyklen, die nötig war, um ein deutliches Signal in der Elutionsfraktion zu erhalten, im Laufe der Runden von 15 (Runde 2) auf 8 (Runden 4 - 10) ab (Tabelle 2). Dies lässt ebenfalls auf eine Zunahme an Bindern schließen.

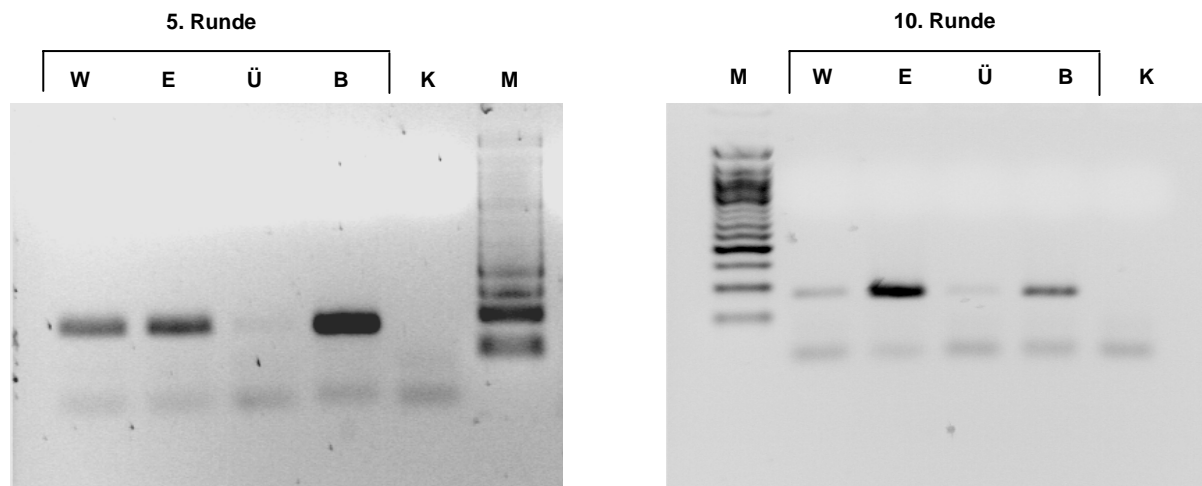


Abbildung 16: PCR-Analyse der Selektionsrunden 5 und 10. Relative Mengen an DNA in unterschiedlichen Fraktionen (W = letzte Wasch, E = Elution, Ü = Überstand, B = Beads, K = Kontrolle, M = 50 bp-DNA-Marker).

Auch der Effekt von Vorsäulen wurde untersucht, durch die potentielle Matrixbinder aus der Bibliothek entfernt werden sollen. Dazu wurden zwei parallele Selektionen durchgeführt, bei denen einmal das einfache, das andere Mal das doppelte Volumen an ungekoppelter Matrix als Vorsäule verwendet wurde. Beim Vergleich der beiden Beadfraktionen der parallel durchgeführten Selektionen wurde ersichtlich, dass durch Einsatz von größeren Vorsäulenvolumina der Anteil an Matrixbindern im angereicherten Pool erheblich reduziert werden kann.

4.2 NICHT-RADIOAKTIVES MONITORING DES SELEKTIONSPROZESSES

Um den Verlauf einer Selektion zu beobachten, werden die Nukleinsäuren üblicherweise radioaktiv markiert. Hierbei handelt es sich zwar um eine empfindliche Methode, jedoch ist radioaktives Arbeiten mit behördlichen Genehmigungen und unbequemen Vorsichtsmaßnahmen verbunden und zudem relativ teuer. Im Zuge dieser Arbeit wurden deshalb verschiedene alternative Methoden entwickelt, mit deren Hilfe der Verlauf der Selektion ohne Einsatz von Radioaktivität verfolgt werden kann.

4.2.1 Monitoring über Fluorescence dye-linked aptamer assay (FLAA)

Die Anreicherung des DNA-Pools mit bindenden Sequenzen im Verlauf der Daunorubicin-Selektion wurde mit Hilfe des FLAA verfolgt. Bei diesem Assay wurde biotinyliertes Daunorubicin auf einer streptavidinbeschichteten Mikrotiterplatte immobilisiert und die freien Bindungsstellen mit Biotin abgesättigt, um die gleiche Oberfläche wie während der Selektion bereit zu stellen. Zur Überprüfung der Hintergrundbindung wurde für jede Probe zusätzlich ein Well mit Biotin geblockt. Nach Inkubation mit der ssDNA-Bibliothek der verschiedenen Runden wurden nicht bindende Sequenzen durch Waschschrte entfernt und bindende Sequenzen mit dem ssDNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff

OliGreen nachgewiesen. Mit diesem Farbstoff können 100 pg/ml Nukleinsäure in einem Standard-Spektrofluorometer detektiert werden, wobei Fluorescein-Anregungs- und -Emissions-Wellenlängen verwendet werden (Gray & Wickstrom 1997). Der ungebundene Farbstoff ist praktisch nicht fluoreszent. Die Absorptionswerte wurden als relative Fluoreszenz gegen die Selektionsrunde aufgetragen (Abbildung 17).

Die Untersuchung der ssDNA aus den verschiedenen Selektionsrunden zeigte deutlich einen steigenden Anteil an bindenden Sequenzen im Pool, wobei die erste Anreicherung in Runde 6 nachzuweisen war. Unspezifische Bindung an Streptavidin wurde kaum beobachtet, das Hintergrundsignal blieb über den gesamten Verlauf der Selektion stabil.

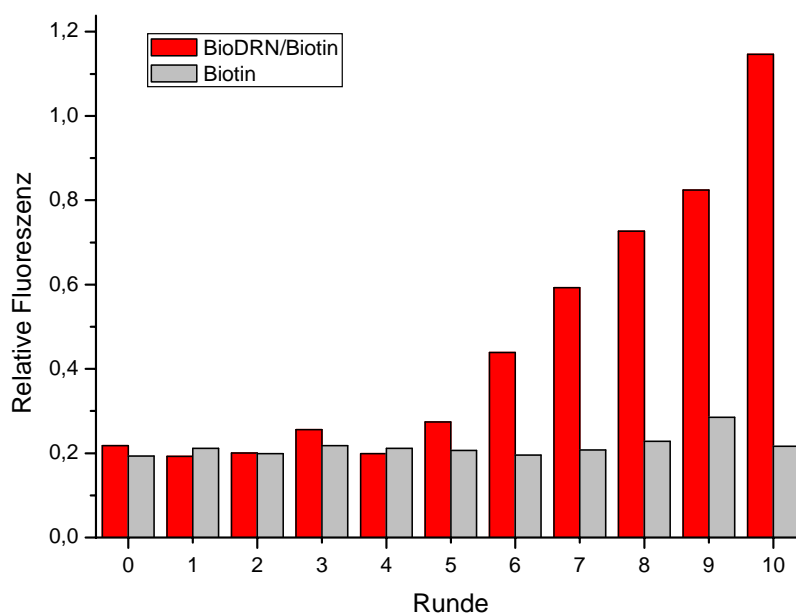


Abbildung 17: Anreicherung bindender DNA im Zuge der Selektion, nachgewiesen über FLAA. ssDNA der unterschiedlichen Selektionsrunden wurden parallel auf zwei Mikrotiterplattenwells aufgetragen: In einem Well war Daunorubicin immobilisiert (rot), das andere Well diente als Hintergrundkontrolle ohne Target (grau). Aufgetragen wurde die relative Fluoreszenz gegen die Selektionsrunde.

4.2.2 Monitoring über Diversity assay for nucleic acids (DANA)

Während sich bindende Sequenzen im Laufe der Selektion anreichern, nimmt die Diversität des DNA-Pools ab. Diese Verminderung der Diversität lässt sich mit Hilfe des *Diversity assay for nucleic acids* (DANA) nachweisen. Der Assay nutzt die Eigenschaft des Enzyms S1-Nuklease, ssDNA abzubauen, während Doppelstränge (bei den hier verwendeten Enzymkonzentrationen) nicht angegriffen werden.

Hintergrund für diese Methode ist die Tatsache, dass sich komplementäre Stränge nach Denaturierung umso langsamer finden, je mehr verschiedene Sequenzen in einem Gemisch von

dsDNA vorliegen (Britten & Kohne 1968; Arstila 2006; Baum & McCune 2006). Der Abbau durch die einzelstrangspezifische S1-Nuklease ist daher umso wahrscheinlicher, je größer die Diversität ist.

Nach Zugabe von S1-Nuklease zu dsDNA aus den zehn Selektionsrunden (Abbildung 18), wird die DNA in frühen Runden (Runden 0 - 5) vollständig abgebaut, was mit einem großen Anteil an Einzelstrang aufgrund einer hohen Diversität einhergeht. Im Laufe der Selektion nimmt der relative Anteil an nicht abgebauter DNA zu, was auf eine Abnahme der Diversität zurückzuführen ist. Diese Reduktion ist von Runde 6 an detektierbar.

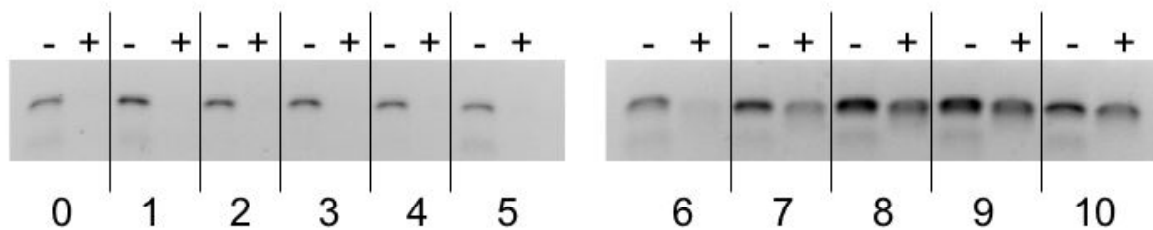


Abbildung 18: Abnahme der Diversität im Zuge der Selektion, nachgewiesen über DANA. Für jede Selektionsrunde (0 - 10) wurden zwei identische Proben dsDNA analysiert. Eine Probe (+) wurde mit S1-Nuklease inkubiert, die andere (-) diente als Negativkontrolle ohne S1-Nuklease. Runde 0 entspricht der Ausgangsbibliothek.

4.3 CHARAKTERISIERUNG DER APTAMERE

Die Elutionsfraktion der zehnten Selektionsrunde wurde über PCR amplifiziert und die darin enthaltenen Sequenzen anschließend vereinzelt. Dazu wurden die PCR-Produkte zunächst gelelektrophoretisch aufgetrennt und aufgereinigt, über AT-Klonierung in den pGEM-T Vektor ligiert, der ein Ampicillin-Resistenzgen enthält. Durch Transformation des Plasmids in kompetente *E. coli* JM109-Zellen und anschließendes Ausstreichen auf ampicillinhaltigen Agarplatten, wurden Kolonien mit einzelnen Aptamersequenzen erhalten. Die Plasmide von 24 verschiedenen Klonen wurden isoliert, der Einbau des Inserts über Kontrollrestriktion mit Pvu II verifiziert und anschließend von der Firma Sequence Laboratories Göttingen GmbH sequenziert.

4.3.1 Primärstruktur


Die Primärstrukturen des randomisierten Bereichs der Aptamere wurden verglichen und mit Hilfe des Computerprogramms MegAlign 5.00 (DNASTAR Inc., Madison, Wisconsin, USA) auf homologe Bereiche hin untersucht. Die Existenz von konservierten Bereichen kann Aufschluss darüber geben, welche Nukleotide für die Bindung an das Zielmolekül von Bedeutung sind.

Das Alignment erfolgte nach der ClustalV-Methode von Higgins und Sharp (Higgins & Sharp 1989). Diese Methode ist besonders geeignet für ein schnelles Alignment von Sequenzen und wurde gewählt, da sie die gegebenen Parameter (keine evolutionäre Abstammung der Sequenzen voneinander, keine weite Divergenz, mögliche Gaps am Ende der Sequenzen) am besten berücksichtigt.

Viele Sequenzen lagen in mehreren Kopien vor oder unterschieden sich nur durch Punktmutationen. Anhand dieser Homologien wurden sie zunächst in sieben Gruppen eingeteilt, die in Tabelle 6 zusammengefasst sind. Da die während der *in vitro*-Selektion verwendete Taq-Polymerase mit $2 \cdot 10^{-4}$ Mutationen pro Basenduplikation eine relativ hohe Fehlerrate aufweist (Keohavong & Thilly 1989), wurden diese Punktmutationen wahrscheinlich während der Amplifikation eingeführt. Neben der üblichen Länge von 40 nt wurde auch ein Klon (Klon 10.2) isoliert, dessen randomisierter Bereich eine Länge von 41 nt aufwies. Auch hierbei handelt es sich wohl um eine durch die DNA-Polymerase verursachte Veränderung. Alle Klone wiesen einen sehr hohen Anteil an Guanin (37,5 % bis 50 %) in der Sequenz auf (Tabelle 6).

Nach der Einteilung in Gruppen wurde die Gesamtheit der Sequenzen auf gemeinsame Primärstruktur motive überprüft, um Aussagen über Bindungsmotive treffen zu können (Tabelle 7). Mit Ausnahme von zwei Klonen (10.10 und 10.17) zeigte sich generell eine sehr starke Sequenzähnlichkeit, besonders im 3'-Bereich der Sequenz.

Tabelle 7: Sequenzvergleich aller isolierten Daunorubicin-Aptamer-Klone. Das Alignment wurde mit dem Programm MegAlign nach der ClustalV-Methode durchgeführt. Abweichungen von der berechneten Consensus-Sequenz sind farblich hervorgehoben (rot = Nukleotidsubstitution, blau = Nukleotidinsertion). Gruppen 1 - 7 sind durch Linien getrennt.

	-  +
⊗ Consensus	CCCGGCTGATAGTGCTCTGG-AGGGTGGGCTTGGGT-TAAGG
24 Sequences	10 20 30 40
10.5	CCCGCTTGC A ACTGCTCTGG-AGGGTGGGCTTGGGT-TAAGG
10.6	CCCGCTT AC A A CTGCTCTGG-AGGGTGGGCTTGGGT-TAAGG
10.9	CCCGCTT AC A A CTGCTCTGG-AGGGTGGGCTTGGGT-TAAGG
10.11	CCCGCTT AC A A CTGCTCTGG-AGGGTGGGCTTGGGT-TAAGG
10.13	CCCGCTT AC A A CTGCTCTGG-AGGGTGGG C TGGGT-TAAGG
10.26	CCCGCTT AC A A CTGCTCTGG-AGGGTGGGCTTGGGT-TAAGG
10.12	CCTGGCTT G TATTGCT T TGG-AGGGTGGG C ATTGGG-TAAGG
10.14	CCTGGCTT G TATTGCT T TGG-AGGGTGGG C ATTGGG-TAAGG
10.16	CCTGGCTT G TATTGCT T TGG-AGGGTGGG C ATTGGG-TAAGG
10.21	CCTGGCTT G TATTGCT T TGG-AGGGTGGG C ATTGGG-TAAGG
10.27	T CTGGCTT G TATTGCT T TGG-AGGGTGGG C ATTGGG-TAAGG
10.8	A AGTGTG C CTGT A AAATGG-AGGGTGGGCTTGGGT-TAAGG
10.25	A AGTGTG C CTGT A AAATGG-AGGGTGGGCTTGGGT-TAAGG
10.15	AC AAGCCGATT G CATGCTGG-AGGG A GGGCTTGGGT- T TAAGG
10.18	CT AAGCCGATT G CATGCTGG-AGGG A GGGCTTGGGT- T TAAGG
10.22	AC AAGCCGATT G CATGCTGG-AGGG A GGGCTTGGGT- T TAAGG
10.23	AC AAGCCGATT G CATGCTGG-AGGG A GGGCTTGGGT- T TAAGG
10.24	AG AAGCCGATT G CATGCTGG-AGGG A GGGCTTGGGT- T TAAGG
10.2	T GC A AGC A ATT G AAT G AC A GTAGGGTGGGCTTGGGT-TAAGG
10.7	T GC A AGC A ATT G AAT G AC A GTAGGGTGGGCTTGGGT--AAGG
10.19	T GC A AGC A ATT G AAT G AC A GTAGGGTGGGCTTGGGT--AAGG
10.20	T GC A AGC A ATT G AAT G AC A GTAGGGTGGGCTTGGGT--AAGG
10.10	AT --CTGT A AGGG T AAG G GGTGGGGT G GGT AC CT AG
10.17	TT AGCT G TTAGT G CG C GT A ACGGGG T AC G GT G - CT T C - G

4.3.2 Affinitäten der Einzelklone

Die isolierten Aptamere wurden mit Hilfe des FLAA auf ihre Bindungsqualität überprüft. Dabei wurden nur diejenigen Spezies im Mikrotiterplatten-Assay verglichen, die sich in ihrer Sequenz unterschieden (Tabellen 6 und 7); identische Klone wurden nicht doppelt analysiert. Als Kontrolle wurden zwei ssDNAs (C1 und C2) der gleichen Länge eingesetzt, die aus nicht verwandten Selektionen resultierten. C1 zeigte, ebenso wie die Daunorubicin-Aptamer-Klone, einen hohen Anteil an Guanin in der Sequenz (siehe Anhang 9.1.2).

Alle isolierten Daunorubicin-Klone banden an ihr Zielmolekül, wobei sich die Affinitäten zum Teil deutlich unterschieden (Abbildung 19). Bei keinem der Klone konnte eine Bindung an die Streptavidinoberfläche festgestellt werden. Keine der beiden Kontrollsequenzen erkannte Daunorubicin, was darauf hinweist, dass die beobachtete Aptamerbindung nicht auf unspezifische Wechselwirkungen von ssDNA mit Daunorubicin zurückzuführen ist. Der reproduzierbar beste Binder, Klon 10.10, wurde weiter charakterisiert und für alle folgenden Experimente eingesetzt.

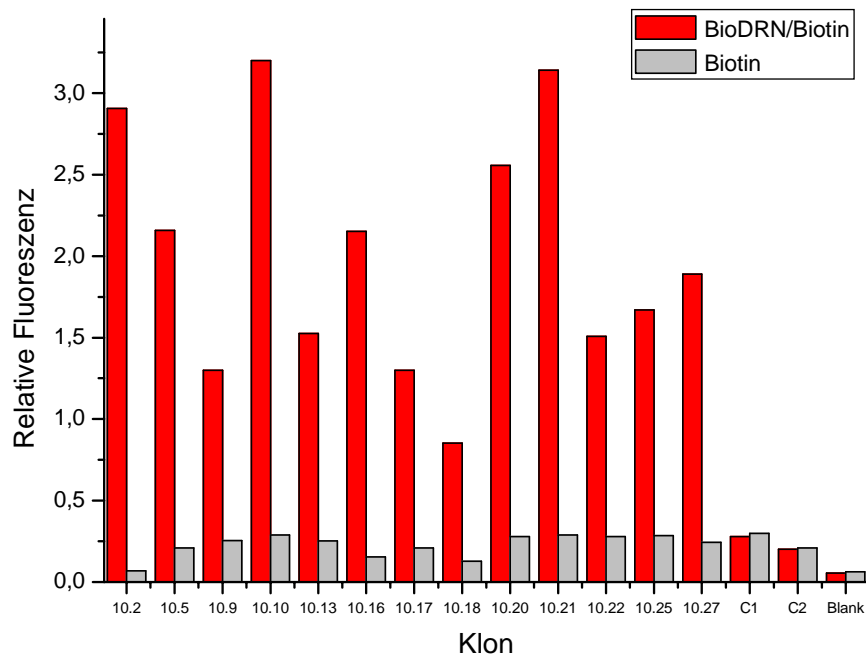


Abbildung 19: Vergleich der Bindungsaffinitäten der Daunorubicin-Aptamere mit Hilfe von FLAA. ssDNA der unterschiedlichen Aptamer-Einzelklone wurden parallel auf zwei Mikrotiterplattenwells aufgetragen: In einem Well war Daunorubicin immobilisiert (rot), das andere Well diente als Hintergrundkontrolle ohne Target (grau). Bei C1 und C2 handelt es sich um nicht verwandte ssDNAs gleicher Länge. Aufgetragen wurde die relative Fluoreszenz gegen die Aptamer-Klone.

4.3.3 Sekundärstruktur

Die Sekundärstruktur des besten isolierten Daunorubicin-Binders, Klon 10.10, wurde über das Programm Mfold Version 3.2 berechnet, dem der Zuker-Algorithmus zugrunde liegt (SantaLucia 1998; Zuker 2003). Dabei wurde die gesamte Aptamersequenz berücksichtigt, die auch die Primerregionen umfasste. Drei thermodynamisch stabile Strukturen wurden für das Aptamer mit Hilfe dieses Energieminimierungs-Algorithmus vorhergesagt (Abbildung 20).

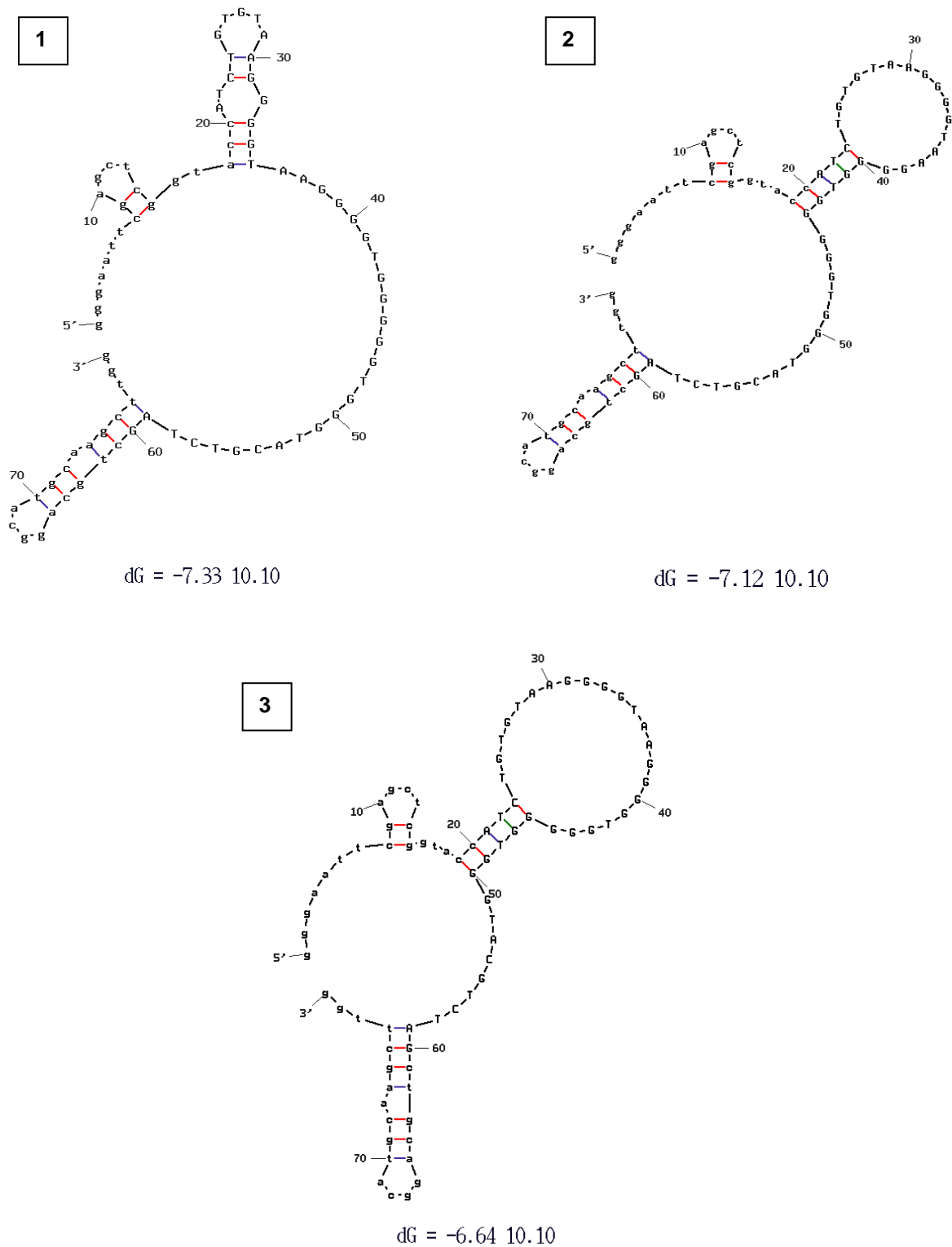


Abbildung 20: Sekundärstrukturvorhersage für Daunorubicin-Aptamer-Klon 10.10. Positionen 1 - 20 und 61 - 80 umfassen die definierten Primerregionen, Positionen 21 - 60 den randomisierten Bereich. Die Sekundärstrukturen wurden über Mfold (SantaLucia 1998; Zuker 2003) berechnet.

Alle drei Vorhersagen wiesen in den Primerregionen die gleichen Strukturen auf. Im Bereich des Reverse-Primers fand sich eine Haarnadel-Struktur mit Bulge (Positionen 59 - 77), der Forward-Primerbereich formte eine Haarnadelstruktur (Positionen 8 - 15). Auffällig bei allen drei Vorhersagen war die geringe Strukturierung des randomisierten Bereichs. Bei der stabilsten Struktur 1 war der Hauptanteil des randomisierten Bereichs, vor allem die G-reiche 3'-Region, völlig unstrukturiert (Positionen 36 - 58). Bei den beiden weniger stabilen Strukturen wurde dieser Bereich durch einen zusätzlichen Stamm (Positionen 19 - 23, komplementär zu Positionen 40 - 44 bei Struktur 2 bzw. komplementär zu Positionen 46 - 50 bei Struktur 3) in zwei große, nicht weiter strukturierte Loops geteilt.

Das gehäufte Vorkommen von Guaninen in der Sequenz legt die Vermutung nahe, dass die DNA G-Quadruplexe ausbildet. Hierbei handelt es sich um lipophile, viersträngige Strukturen, die durch vertikale Stapelung von multiplen planaren Guanin-Tetraden (G-Quartetten) gebildet werden (Abbildung 21) (Davis 2004). Diese Tetraden werden durch Hoogsteen-Wasserstoffbrücken stabilisiert. Oktakoordinierte Kationen, die Kation-Dipol-Wechselwirkungen mit acht unterschiedlichen Guanin-Basen bilden und die zwischen jeweils zwei G-Quartetten lokalisiert sind, stabilisieren die G-Quartette und erhöhen die Stapelwechselwirkungen (Davis 2004). Sowohl monovalente als auch divalente Kationen sind zur Stabilisierung möglich, wobei die Natur des Kations für die Stabilität eine große Rolle spielt ($K^+ \gg Na^+ > Rb^+ > NH_4^+ > Cs^+ \gg Li^+$; $Sr^{2+} \gg Ba^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+}$).

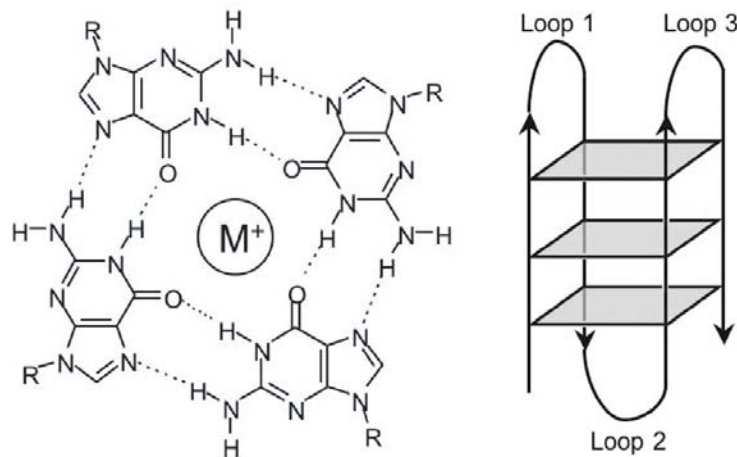


Abbildung 21: G-Quartett- und G-Quadruplexstrukturen. Links: Wasserstoffbrücken-Muster eines G-Quartetts. Rechts: Schematisches Diagramm einer einmolekularen G-Quadruplexstruktur (Huppert & Balasubramanian 2005).

Diese Strukturen können von den üblichen Algorithmen zur Sekundärstrukturanalyse nicht vorhergesagt werden (SantaLucia 1998; Saito & Tomida 2005), was das Fehlen eindeutiger Strukturen für den variablen Bereich in der Sekundärstrukturvorhersage erklären könnte.

Der guaninreiche Abschnitt des im FLAA als besten Binder identifizierten Klon 10.10 entspricht der allgemeinen Formel $G_{3+N_{1-7}}G_{3+N_{1-7}}G_{3+N_{1-7}}G_{3+N_{1-7}}$, die für einmolekulare G-Quadruplexe beschrieben wurde (Huppert & Balasubramanian 2005, 2007). Für den guaninreichen Abschnitt von Klon 10.10 werden hier nach dem von Davis (Davis 2004) beschriebenen Schema für einmolekulare Quadruplexe mögliche Strukturen vorgeschlagen, die in Abbildung 22 dargestellt sind. Alle Strukturen basieren auf drei gestapelten G-Quartetten, die durch Loops unterschiedlicher Länge verbunden sind.

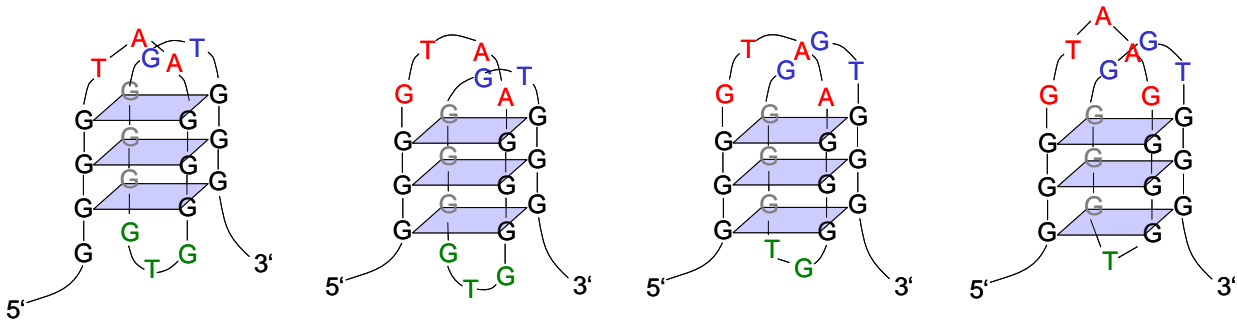


Abbildung 22: Mögliche einmolekulare G-Quadruplexstrukturen für Daunorubicin-Aptamer Klon 10.10. Für eine bessere Übersichtlichkeit sind die drei Loops farblich unterschiedlich dargestellt.

4.3.4 Verkürzung der Aptamer-Sequenz

Basierend auf den Sekundärstrukturvorhersagen (Abbildung 20) wurde die Aptamer-Sequenz 10.10 verkürzt. Zunächst wurden die Primerbereiche der ursprünglichen Sequenz entfernt, die laut Mfold nicht in Sekundärstrukturen des randomisierten Bereichs involviert waren. Hieraus entstand das 41mer 10.10v. Das 23mer (10.10q) wurde empirisch verkürzt, so dass nur die G-reiche Sequenz erhalten wurde. Da G-reiche Sequenzen bekanntermaßen stabile Sekundär- und Tertiärstrukturen, die G-Quartette bzw. G-Quadruplexe, ausbilden, könnte der G-reiche Anteil von Bedeutung für die Aptamerbindung sein. Die Sequenzen von Klon 10.10 und seinen verkürzten Varianten sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Sequenzen des Daunorubicin-Aptamers 10.10 und seiner Verkürzungen.

Name	Sequenz (5'-3')	Ntd.
10.10	GGGAATTCGAGCTCGGTACC ATCTGTGTAAGGGGTAAGGGGTGGGGTGGGTACGTCTAG CTGCAGGCATGCAAGCTTGG	80
10.10v	ACC ATCTGTGTAAGGGGTAAGGGGTGGGGTGGGTACGTCT	41
10.10q	AGGGGTAAGGGGTGGGGTGGGT	23

4.3.5 Charakterisierung der Bindung

Die Bindungseigenschaften des Daunorubicin-Aptamers 10.10 wurden in verschiedenen Testsystemen charakterisiert. So wurden zunächst die Bindungskonstanten des Aptamers und seiner verkürzten Varianten (10.10v und 10.10q) über SPR-Spektroskopie bestimmt. Die Abhängigkeit der Bindung von unterschiedlichen Pufferbedingungen sowie die Immobilisierbarkeit in funktioneller Form wurden in Mikrotiterplatten-Assays untersucht.

4.3.5.1 Oberflächenplasmonenresonanz

Die Wechselwirkungen des besten Binders, Aptamer 10.10, sowie die seiner Verkürzungen mit dem Zielmolekül Daunorubicin wurden mit Hilfe der SPR-Spektroskopie auf einem BIAcore-Gerät quantifiziert. Dazu wurden die kinetischen Parameter und Affinitätskonstanten bestimmt.

Das biotinylierte Daunorubicin wurde auf dem Sensorchip über die Bindung an Streptavidin immobilisiert. Zum immobilisierten Anthracyclin wurden verschiedene Konzentrationen (70 - 500 nM) der jeweiligen Aptamere bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ injiziert. Die Assoziation an das Daunorubicin konnte durch den Anstieg des Messsignals (RU) und die Dissoziation durch den Abfall der RU-Werte verfolgt werden. Der Signalanstieg im Differenzsensorgramm (Messkurve abzüglich Referenzkurve) erreichte Werte zwischen 40 und 120 RU. Abbildung 23 zeigt das Sensorgramm, das die Bindung von Klon 10.10 beschreibt. Die SPR-Daten bestätigten die in FLAA-Experimenten beobachtete hohe Affinität des Aptamers für Daunorubicin.

Die gemessenen Daten für Assoziation und Dissoziation wurden über ein 1:1 Langmuir-Bindungsmodell gefittet, wodurch Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten bestimmt werden konnten (Tabelle 9). Für die Assoziationsrate (k_a) von Klon 10.10 wurde ein Wert von $3,26 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bestimmt, die Dissoziationsrate (k_d) lag bei $6,48 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Als Dissoziationskonstante (K_D) wurde ein Wert von 20 nM erhalten (Tabelle 9). Die Assoziationsrate des Aptamers war schnell und die Stabilität des Aptamer-Daunorubicin-Komplexes hoch, was durch die langsame Dissoziationsrate deutlich wird. Es war nicht möglich, das Aptamer mit Hochsalz (2 M MgCl_2 , 0,5 M NaCl) vom Zielmolekül zu eluieren; 5 M Harnstoff war nötig, um die Chipoberfläche komplett zu regenerieren.

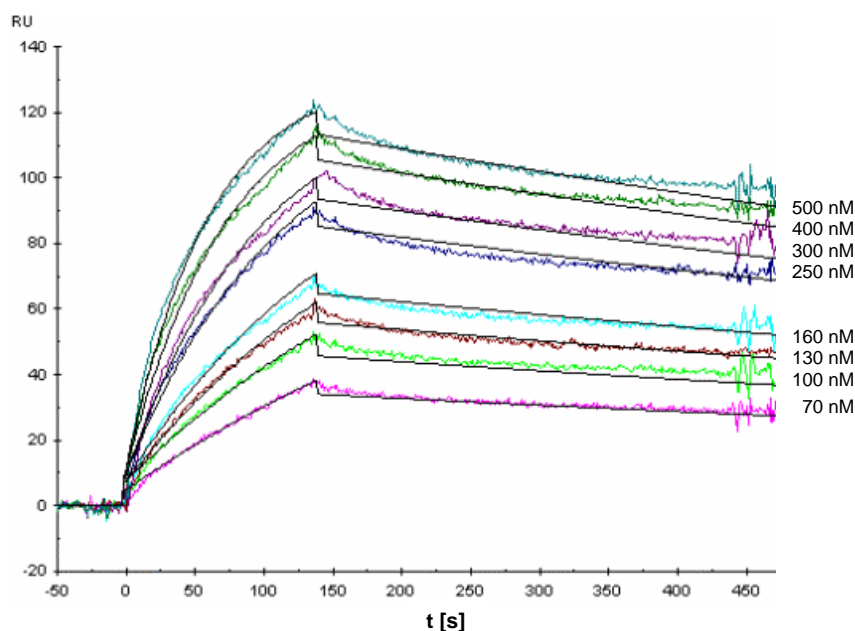


Abbildung 23: SPR-Sensorgramm für Daunorubicin-Aptamer 10.10. Biotinyliertes Daunorubicin wurde auf einem streptavidinbeschichteten Sensor-Chip immobilisiert. Das Aptamer wurde in Konzentrationen von 500 nM, 400 nM, 300 nM, 250 nM, 160 nM, 130 nM, 100 nM und 70 nM injiziert, gefolgt von einem Wasch- und einem Elutionsschritt. Die Bindungskurven wurden überlagert und global nach dem 1:1 Langmuir-Bindungsmodell gefittet, um Werte für die Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten zu erhalten. Aufgetragen sind die Resonanzeinheiten (RU) gegen die Zeit (s).

Die gleichen Experimente wurden mit dem verkürzten Aptamer 10.10v, bei dem die Primersequenzen entfernt wurden, durchgeführt. Hier wurde eine zehnfach größere K_D von 272 nM erhalten. Die Assoziationsrate war mit $3,32 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ beinahe identisch dem vollständigen Klon 10.10, während die Dissoziationsgeschwindigkeit mit $9,02 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ im Vergleich mehr als zehnfach beschleunigt war.

Bei der Analyse der G-reichen Region allein (10.10q) ließ sich keine Bindungsaffinität für immobilisiertes Daunorubicin nachweisen.

Tabelle 9: Geschwindigkeits- und Affinitätskonstanten von Klon 10.10 und seinen Verkürzungen. (n.d. = nicht detektierbar)

	10.10	10.10v	10.10q
$k_a = k_{\text{on}}$ (Erkennung)	$3,26 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$3,32 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	n.d.
$k_d = k_{\text{off}}$ (Stabilität)	$6,48 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$9,02 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	n.d.
$K_A = k_a/k_d$	$5,03 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$	$3,68 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$	n.d.
$K_D = k_d/k_a$	20 nM	272 nM	n.d.

4.3.5.2 Mikrotiterplatten-Assays

Im Hinblick auf eine tatsächliche Anwendung des Aptamers für analytische Zwecke, musste sein Verhalten unter unterschiedlichen Bedingungen getestet und charakterisiert werden. Dafür wurde die Spezifität, die Abhängigkeit der Bindung von externen Parametern wie Salzen und pH-Werten sowie die Immobilisierbarkeit des Aptamers in Mikrotiterplatten-Assays evaluiert. Auch die verkürzten Klone wurden in diesem Testsystem auf ihre Bindungseigenschaften überprüft.

4.3.5.2.1 Bindungsvergleich verkürzter Einzelklone

Die Bindungseigenschaften der verkürzten Einzelklone 10.10v und 10.10q wurden zusätzlich zur SPR-Analyse in FLAAs überprüft und verglichen (Abbildung 24).

Analog den SPR-Analysen, zeigte die auf die G-reiche Region reduzierte Sequenz (10.10q) auch im FLAA keine Bindung an Daunorubicin. Die variable Sequenz des Aptamers (10.10v) band zwar an das Zielmolekül, die Bindungsaffinität war durch das Fehlen der Primerregionen jedoch auch hier stark reduziert.

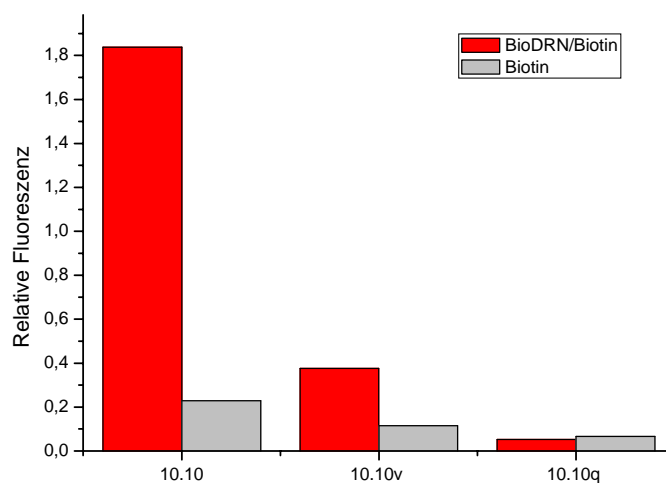


Abbildung 24: Bindungsvergleich des besten Daunorubicin-Aptamers 10.10 und seiner verkürzten Varianten 10.10v und 10.10q im FLAA. Die verschiedenen ssDNAs wurden parallel auf zwei Mikrotiterplattenwells aufgetragen. In einem Well war Daunorubicin immobilisiert (rot), das andere Well diente als Hintergrundkontrolle ohne Target (grau). Aufgetragen wurde die relative Fluoreszenz gegen die ssDNA.

4.3.5.2.2 Affinität von dsDNA für Daunorubicin

Daunorubicin besitzt eine natürliche Affinität zu DNA. Allerdings sind die Affinitäten mit $1,98 \cdot 10^{-5}$ M für dsDNA bzw. $2,25 \cdot 10^{-4}$ M für ssDNA relativ niedrig (Cheng *et al.* 2005). Um zu überprüfen, ob die in Bindungstests nachgewiesene Aptamerbindung tatsächlich spezifisch ist und nicht aus unspezifischer Interkalation resultiert, wurden FLAAs durchgeführt, bei denen dsDNA anstelle von ssDNA verwendet wurden. Das Daunorubicin-Aptamer 10.10 sowie zwei weitere, nicht verwandte dsDNAs derselben Länge (C1 und C2) wurden hierbei untersucht. C1 besitzt, ebenso wie die Daunorubicin-Aptamere, einen hohen Anteil an Guanin in der Sequenz.

Zwei Experimente wurden parallel durchgeführt. Im ersten wurde aufgereinigte dsDNA in den Bindungstest eingesetzt. Im zweiten Experiment wurden dieselben dsDNA-Proben wie die ssDNA-Aptamere in der Selektion und in vorangegangenen Assays behandelt und hitzedenaturiert (3 min, 95°C) und anschließend 5 min auf Eis gekühlt.

Keine der nicht denaturierten dsDNA-Proben band an Daunorubicin. Bei den denaturierten Proben konnte eine geringe Bindung beim Daunorubicin-Klon nachgewiesen werden, das Signal war jedoch 90 % niedriger als das der zum Vergleich mitgeführten ssDNA. Bei den hitzedenaturierten Kontroll-DNAs wurde keine Bindung detektiert (Abbildung 25).

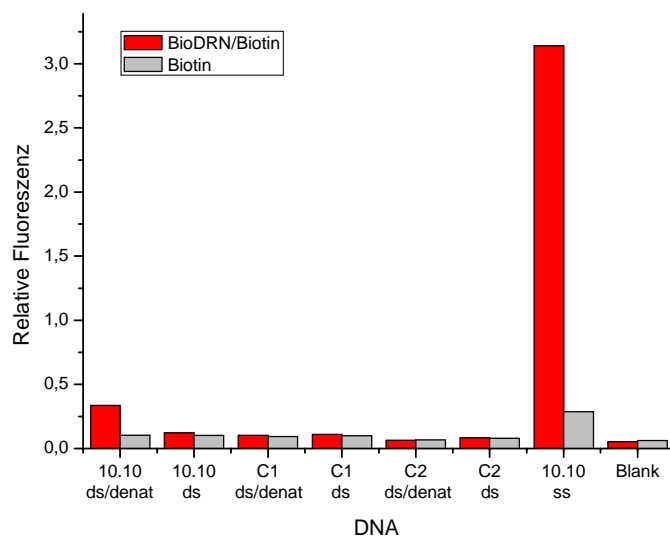


Abbildung 25: Überprüfung der Bindung von dsDNA an Daunorubicin im FLAA, detektiert mit einzelstrangspezifischem Fluoreszenzfarbstoff OliGreen. dsDNAs des Daunorubicin-Aptamers 10.10 und zwei Kontroll-DNAs (C1 und C2) wurden unbehandelt (ds) bzw. hitzedenaturiert (ds/denat) parallel auf zwei Mikrotiterplattenwells aufgetragen: In einem Well war Daunorubicin immobilisiert (rot), das andere Well diente als Hintergrundkontrolle ohne Target (grau). Aufgetragen wurde die relative Fluoreszenz gegen die dsDNA.

Da es sich beim verwendeten Farbstoff OliGreen um einen einzelstrangspezifischen Fluoreszenzfarbstoff handelt und nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die erhaltenen Ergebnisse durch diese Tatsache beeinflusst wurden, wurden die Experimente unter Verwendung des doppelstrangspezifischen Fluoreszenzfarbstoffs PicoGreen wiederholt. Auch hier zeigte nur das hitzedenaturierte Daunorubicin-Aptamer eine schwache Bindung, bei allen anderen Proben war kein Signal detektierbar (Abbildung 26).

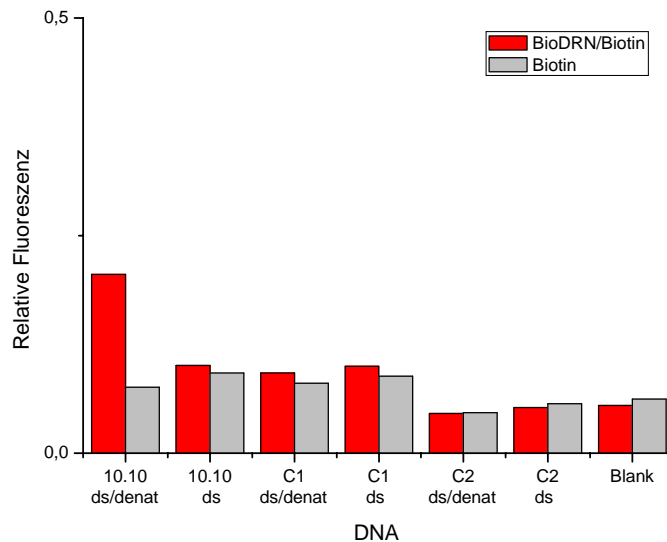


Abbildung 26: Überprüfung der Bindung von dsDNA an Daunorubicin im FLAA, detektiert mit doppelstrangspezifischem Fluoreszenzfarbstoff PicoGreen. dsDNAs des Daunorubicin-Aptamers 10.10 und zwei Kontroll-DNAs (C1 und C2) wurden unbehandelt (ds) bzw. hitzedenaturiert (ds/denat) parallel auf zwei Mikrotiterplattenwells aufgetragen: In einem Well war Daunorubicin immobilisiert (rot), das andere Well diente als Hintergrundkontrolle ohne Target (grau). Aufgetragen wurde die relative Fluoreszenz gegen die dsDNA.

4.3.5.2.3 Spezifität der Aptamere (kompetitiver FLAA)

Um die Spezifität des Aptamers zu überprüfen, wurden Konkurrenztests mit verschiedenen Antibiotika durchgeführt. Nach Vorinkubation des Aptamers in Lösung mit jeweils unterschiedlichen Mengen der Antibiotika Daunorubicin, Doxorubicin, Tetracyclin und Chloramphenicol, wurde die Aptamer-Antibiotika-Mischung auf Mikrotiterplatten transferiert, die mit Daunorubicin gekoppelt waren. Aptamere, die in Lösung an freies Antibiotikum gebunden hatten, konnten nicht mehr an immobilisiertes Daunorubicin auf der Platte binden und wurden in anschließenden Waschschrinen entfernt. Freies Aptamer hingegen blieb über Daunorubicin auf der Mikrotiterplatte gebunden (Abbildung 27).

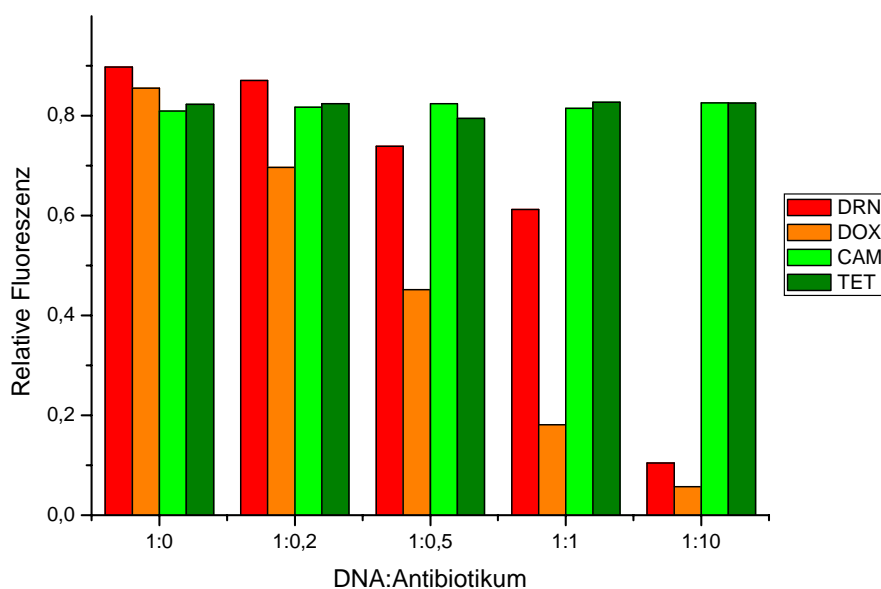


Abbildung 27: Nachweis der Spezifität der Aptamere über kompetitiven FLAA. Das Aptamer 10.10 wurde mit den Antibiotika Daunorubicin (DRN, rot), Doxorubicin (DOX, orange), Chloramphenicol (CAM, hellgrün) bzw. Tetracyclin (TET, dunkelgrün) in den Verhältnissen DNA:Antibiotikum 1:0, 1:0,2, 1:0,5, 1:1, 1:10 in Lösung vorinkubiert. Nach Transfer der Mischungen auf eine mit Daunorubicin gekoppelte Mikrotiterplatte konnten Aptamere, die im Komplex mit freiem Antibiotikum vorlagen, nicht an immobilisiertes Daunorubicin binden und wurden durch Waschen entfernt, während nicht komplexierte Aptamere banden und quantifiziert wurden. Aufgetragen wurde die relative Fluoreszenz gegen das DNA:Antibiotikum-Verhältnis.

Bei keinem der getesteten Verhältnisse konnte eine Bindung des Aptamers an die Antibiotika Chloramphenicol und Tetracyclin nachgewiesen werden. Nach Vorinkubation mit freiem Daunorubicin konnte eine Abnahme des Fluoreszenzsignals mit steigender Menge des Antibiotikums detektiert werden, die von 100 % über 97 %, 82 % und 68 % auf 12 % für die DNA:Antibiotikum-Verhältnisse von 1:0, 1:0,2, 1:0,5, 1:1 und 1:10 zurückging. Das Aptamer zeigte eine noch höhere Affinität zum strukturell ähnlichen Doxorubicin, bei dem das Wasserstoffatom am C-14 durch eine Hydroxylgruppe ersetzt ist. Eine starke Abnahme der Fluoreszenz konnte hier mit steigender Antibiotika-Menge beobachtet werden, die von 100 % über 77 %, 50 % und 20 % auf 6 % des ursprünglichen Signals sank. Neben der Überprüfung der Spezifität des Aptamers erlaubt der kompetitive FLAA zudem eine empfindliche Detektion der beiden Anthracycline Daunorubicin und Doxorubicin. Der untere Detektionsbereich des Assays liegt dabei bei etwa 8,4 µg/l Anthracyclin, was einer Konzentration von 15 nM entspricht.

4.3.5.2.4 Einfluss von Salzen auf die Aptamerbindung

Auch der Einfluss der Pufferzusammensetzung auf die Aptamerbindung wurde mit Hilfe von FLAA untersucht. Hierfür wurde die Inkubation des Aptamers auf Mikrotiterplatten mit immobilisierten Daunorubicin in Varianten des üblichen Bindungspuffers BP-T durchgeführt, dem einzelne Kationen oder Kombinationen verschiedener Kationen fehlten (Abbildung 28).

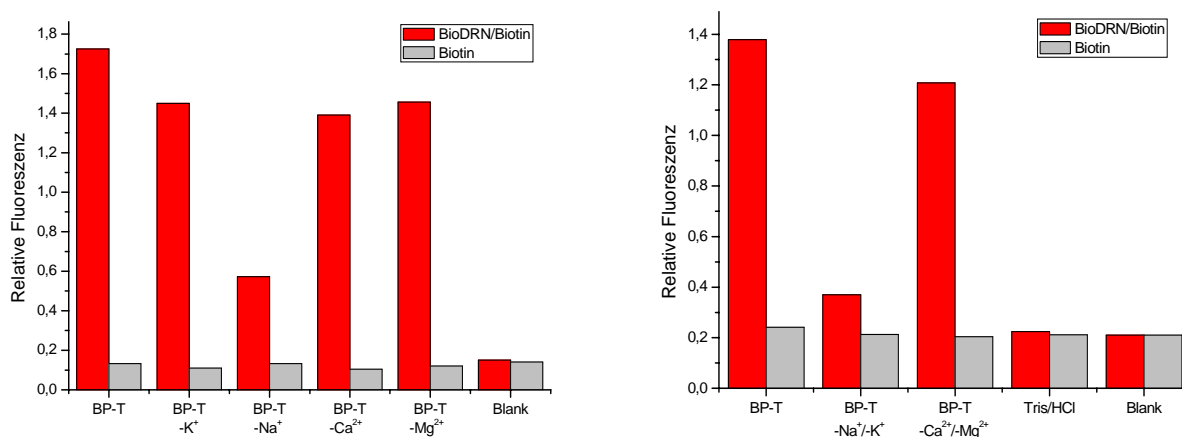


Abbildung 28: Einfluss der Pufferzusammensetzung auf die Aptamerbindung des Klon 10.10, getestet im FLAA. Die Aptamere wurden parallel auf zwei Mikrotiterplattenwells aufgetragen. In einem Well war Daunorubicin immobilisiert (rot), das andere Well diente als Hintergrundkontrolle ohne Target (grau). Die Inkubation des Aptamers mit immobilisiertem Daunorubicin wurde in unterschiedlichen Varianten des Bindungspuffers durchgeführt, dem einzelne Kationen oder Kombinationen verschiedener Kationen fehlten. Aufgetragen wurde die relative Fluoreszenz gegen den verwendeten Puffer.

Die Abwesenheit von K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, oder der Kombination von Ca²⁺ und Mg²⁺ hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Bindungsfähigkeit des Aptamers. Wurde jedoch Na⁺ aus dem Puffer entfernt, führte das zu einer 66 %igen Reduktion der Bindung. Bei Fehlen beider monovalenten Ionen, Na⁺ and K⁺, wurde eine Abnahme der Bindung um 74 % detektiert und lag nur noch geringfügig über dem Hintergrundsignal. In Bindungstests, die in 20 mM Tris/HCl, pH 7,4 durchgeführt wurden, konnte überhaupt keine Aptamerbindung nachgewiesen werden.

4.3.5.2.5 Einfluss des pH-Werts auf die Aptamerbindung

Die Abhängigkeit der Aptamerbindung vom pH-Wert wurde ebenfalls über FLAA analysiert. Dazu wurden die Bindungsexperimente in BP-T durchgeführt, der auf pH-Werte zwischen pH 2,0 und pH 10,0 eingestellt war (Abbildung 29).

Die Aptamerbindung zeigte sich stark abhängig vom pH-Wert, wobei eine klare Optimumskurve erhalten wurde. Die beste Bindung wurde bei pH 6,0 beobachtet und fiel in Richtung beider Extremwerte ab. Bei pH 7,4, bei dem die Selektion durchgeführt worden war, war die Bindungsfähigkeit des Aptamers um 10 % gegenüber dem optimalen pH-Wert reduziert. Bei den alkalischen pH-Werten 8,0, 9,0 bzw. 10,0 sank die Bindung um 18 %, 54 % bzw. 74 % ab. Im sauren Bereich wurde eine Abnahme der Bindung von 11 %, 38 %, 65 % bzw. 83 % für die pH-Werte 5,0, 4,0, 3,0 und 2,0 registriert. Im untersuchten pH-Bereich konnte keine Bindung des Aptamers an die Streptavidinoberfläche beobachtet werden.

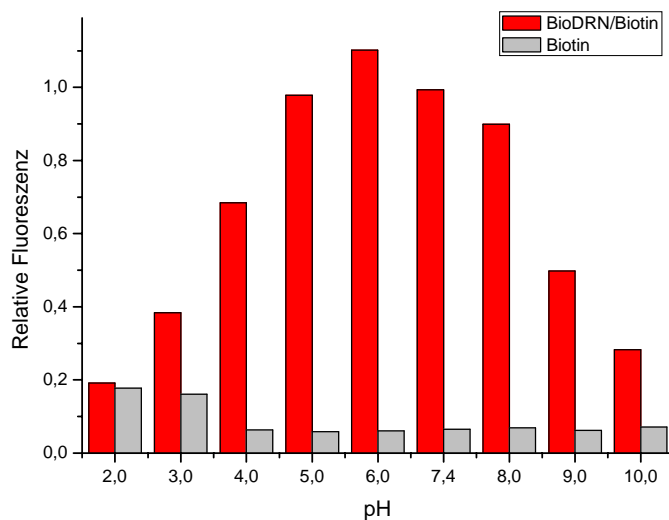


Abbildung 29: pH-Abhängigkeit der Aptamerbindung, getestet im FLAA. Die Aptamere wurden parallel auf zwei Mikrotiterplattenwells aufgetragen. In einem Well war Daunorubicin immobilisiert (rot), das andere Well diente als Hintergrundkontrolle ohne Target (grau). Die Inkubation des Aptamers mit immobilisiertem Daunorubicin wurde in BP-T bei unterschiedlichen pH-Werten (pH 2,0 - 10,0) durchgeführt. Aufgetragen wurde die relative Fluoreszenz gegen den pH-Wert.

4.3.5.2.6 Einfluss von Prädenaturierung auf die Aptamerbindung

Um zu überprüfen, ob der während der Selektion und den folgenden Affinitätsassays standardmäßig durchgeführte Denaturierungsschritt für die Funktionalität des Aptamers notwendig ist, wurden FLAAs durchgeführt. Dafür wurde das Aptamer einmal wie üblich vor dem Test denaturiert und auf Eis gestellt, eine parallele Probe wurde ohne Vorbehandlung nach Auftauen der Probe eingesetzt.

Auch ohne vorherige Denaturierung zeigte das Aptamer eine starke Affinität für das Zielmolekül Daunorubicin, während keine Hintergrundbindung an die mit Biotin gesättigte Streptavidinoberfläche nachzuweisen war (Abbildung 30). Zwar war das Signal gegenüber dem prädenaturierten Aptamer um

15 % reduziert, die generelle Funktionalität des Aptamers ist jedoch auch ohne Denaturierung gegeben, was für eine potentielle Anwendung in Sensorsystemen von Bedeutung ist.

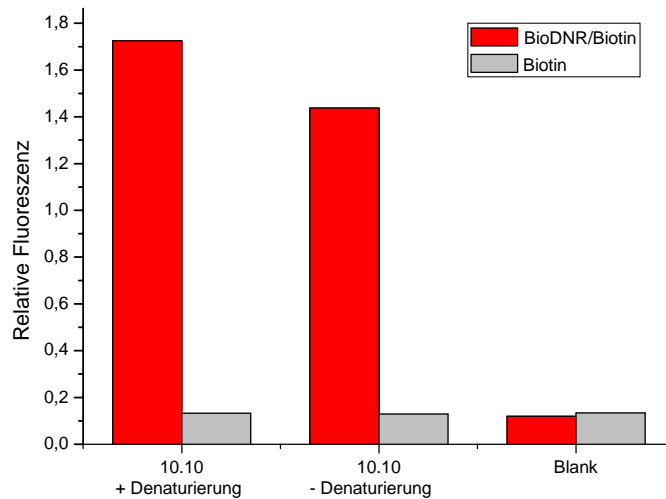


Abbildung 30: Einfluss von Prädenaturierung auf die Aptamerbindung, getestet im FLAA. Das Aptamer wurde mit bzw. ohne vorherige Denaturierung parallel auf zwei Mikrotiterplattenwells aufgetragen. In einem Well war Daunorubicin immobilisiert (rot), das andere Well diente als Hintergrundkontrolle ohne Target (grau). Aufgetragen wurde die relative Fluoreszenz gegen den verwendeten Puffer.

4.3.5.2.7 Einfluss von Immobilisierung auf die Aptamerbindung

Da ein störender Einfluss von Immobilisierung auf die Bindungseigenschaften von Aptameren ausführlich diskutiert wurde (Potyrailo *et al.* 1998; Lee & Walt 2000; Baldrich *et al.* 2004; Nutiu & Li 2004), wurden *enzyme-linked aptamer assays* (ELAA) (Baldrich *et al.* 2004) durchgeführt, um die Immobilisierbarkeit des Aptamers zu überprüfen. Das Daunorubicin- sowie ein Kontroll-Aptamer wurden über einen C6-Spacer 5'-biotinyliert und auf streptavidinbeschichteten Mikrotiterplatten immobilisiert. Nach Inkubation mit Neutravidin-HRP-gekoppeltem Daunorubicin wurde der Umsatz des Substrats ABTS durch die Meerrettich-Peroxidase quantifiziert (Abbildung 31).

Beim Daunorubicin-Aptamer war mit bloßem Auge ein sehr deutlicher Farbumschlag von hell- auf dunkelgrün zu beobachten, was auf die Bindung des Daunorubicin-Neutravidin-HRP-Konjugats schließen lässt. Bei der unspezifischen Kontroll-DNA C1 hingegen konnte keine Farbänderung festgestellt werden. Das Substrat ABTS blieb ebenso hellgrün wie das zum Vergleich aufgetragene, unbehandelte ABTS (Blank). Das über einen C6-Spacer immobilisierte Daunorubicin-Aptamer behielt demnach seine Bindungsfähigkeit. Der beobachtete Farbumschlag konnte im Spektrometer nachgewiesen werden, jedoch war die Differenz der gemessenen Absorptionswerte vergleichsweise gering.

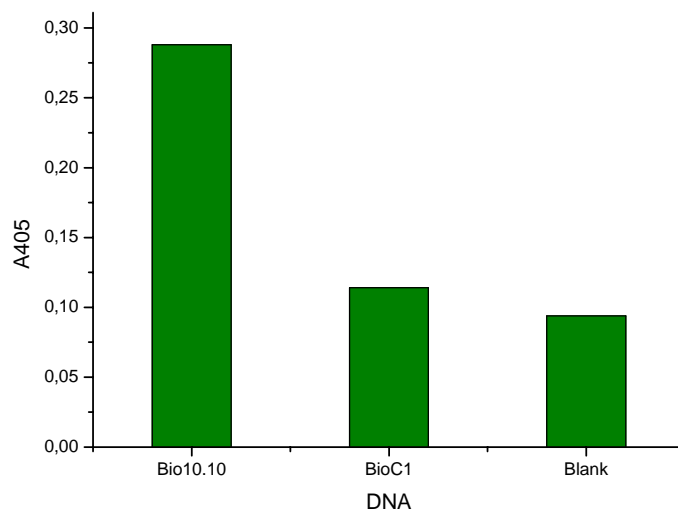


Abbildung 31: Einfluss von Immobilisierung auf die Aptamerbindung, getestet im ELAA. Während eine deutliche Bindung von DRN-Neutravidin-HRP an das immobilisierte Daunorubicin-Aptamer 10.10 (Bio10.10) gemessen wurde, konnte keine Bindung für die unspezifische DNA C1 (BioC1) nachgewiesen werden. Zum Vergleich wurde das Substrat ABTS vermessen (Blank). Aufgetragen ist die Absorption bei 405 nm gegen die immobilisierte DNA.

4.4 ANWENDUNG

Daunorubicin wurde unter anderem als Zielmolekül für die Aptamer-Selektion ausgewählt, da sein Nachweis in verschiedenen Bereichen wie beispielsweise der personalisierten Medizin oder der Umweltanalytik von Bedeutung ist.

Um zu demonstrieren, dass das selektierte Daunorubicin-Aptamer neben empfindlichen Mikrotiterplattenformaten auch in anderen Detektionssystemen eingesetzt werden kann, wurde ein kompetitiver, qualitativer Schnelltest auf Nitrocellulosestreifen aufgebaut.

Dazu wurde auf der Membran eines Teststreifens biotinyliertes Daunorubicin (Probenfeld) und eine zum 5'-Ende des Aptamers komplementäre 5'-biotinylierte Sequenz (Kontrollfeld) über Neutravidin immobilisiert. An Neutravidin-HRP gekoppeltes Aptamer, das mit bzw. ohne Daunorubicin vorinkubiert worden war, wurde auf das Probenvlies aufgetragen und der Probenlauf durch Eintauchen des Eintauchvlieses in Laufpuffer gestartet. Aptamere, die in Lösung an Daunorubicin gebunden hatten, konnten nicht mehr an immobilisiertes Daunorubicin im Probenfeld binden und wurden im Kontrollfeld von der komplementären Sequenz eingefangen. Freies Aptamer hingegen band an das immobilisierte Anthracyclin im Probenfeld und ergab nach Umsatz mit dem HRP-Substrat 4-Chloro-1-Naphthol im Probenfeld ein violettes Signal.

Drei Teststreifen wurden parallel getestet: Bei der Negativkontrolle (N) wurde im Probenfeld nur Neutravidin ohne daran gekoppeltes Daunorubicin immobilisiert, um zu überprüfen, ob das Aptamer unspezifisch an das Protein bindet. Eine solche Affinität würde zu falsch-positiven Ergebnissen führen, da ein Signal im Probenfeld aufträte. Im Kontrollfeld wurde das komplementäre Oligonukleotid, auf das Probenvlies das Daunorubicin-Aptamer aufgetragen. Auf einen zweiten Teststreifen, die Bindungskontrolle (B), wurde im Probenfeld an Neutravidin gekoppeltes Daunorubicin immobilisiert, im Kontrollfeld das komplementäre Oligonukleotid, auf das Probenvlies wurde ebenfalls das Daunorubicin-Aptamer aufgetragen. Der dritte Teststreifen für den kompetitiven Test (K) wurde wie die Positivkontrolle vorbereitet, jedoch wurde hier das Aptamer mit freiem Daunorubicin vorinkubiert, bevor es auf das Probenvlies aufgetragen wurde.

Nach dem Probenlauf, Entfernen von Eintauch- und Saugvlies sowie dem Umsatz von 4-Chloro-1-Naphthol konnte bei der Negativkontrolle im Probenfeld kein Signal detektiert werden, das Aptamer zeigte demzufolge keine unspezifische Bindung an Neutravidin. Im Kontrollfeld war hingegen ein deutliches Signal zu erkennen. Das Aptamer wurde demnach über den Nitrocellulosestreifen transportiert und vom komplementären Oligonukleotid eingefangen. Bei der Bindungskontrolle war ein starkes Signal im Probenfeld zu sehen, das Aptamer erkannte folglich das immobilisierte Daunorubicin. Dennoch wurde ein Anteil der Aptamere über das Probenfeld hinaus transportiert und im Kontrollfeld aufgehalten, wodurch auch hier ein Signal nachzuweisen war. Beim kompetitiven Teststreifen wird im Vergleich zur Positivkontrolle deutlich, dass nur sehr wenig Aptamer im Probenfeld an immobilisiertes Aptamer binden kann, da sich der Hauptteil der Aptamere im Komplex mit freiem Daunorubicin befindet. Da dieser Komplex über das Probenfeld hinaus transportiert wird, ist das Signal im Kontrollfeld demzufolge deutlich stärker als bei der Bindungskontrolle (Abbildung 32).

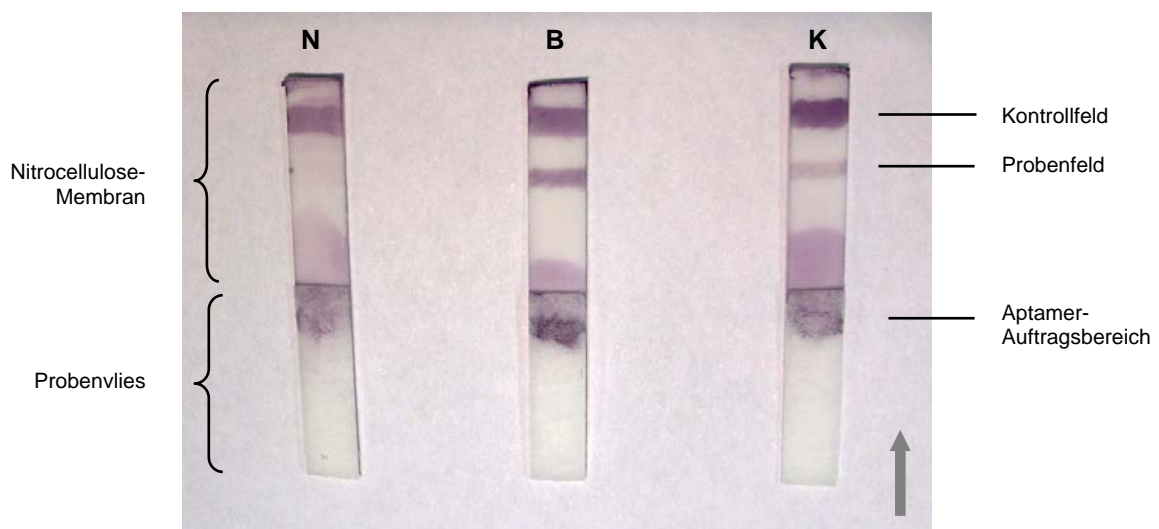


Abbildung 32: Nitrocellulose-Teststreifen. Vor der enzymatischen Farbreaktion wurden Eintauch- und Saugvlies von den Teststreifen entfernt. Im Kontrollfeld aufgetragen war ein zum Aptamer komplementäres, an Neutravidin gekoppeltes Oligonukleotid; im Probenfeld war Neutravidin (N) bzw. Daunorubicin-Neutravidin (K, B) immobilisiert. (N = Negativkontrolle, B = Bindungskontrolle, K = kompetitiv)