

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Der Einsatz des Anthracyclin-Antibiotikums Daunorubicin, das in großem Umfang als Zytostatikum verwendet wird, birgt aufgrund seiner Toxizität Risiken für alle, die Umgang mit der Substanz pflegen. Eine strikte Kontrolle des Arbeitsplatzes ist für Hersteller, Apotheker und Krankenhauspersonal deshalb ebenso notwendig wie die Überprüfung der tatsächlichen Konzentration des Medikaments im Blut von Patienten, um hier die Dosis so hoch wie nötig, jedoch so niedrig wie möglich zu halten. Da auch die Belastung der Umwelt durch kontaminiertes Abwasser zu einem Problem führen kann, sind Abwasseranalysen, insbesondere der Krankenhausabwässer, von großer Wichtigkeit.

Im Zuge dieser Arbeit wurden Daunorubicin-spezifische DNA-Aptamere aus einer DNA-Bibliothek mit einem randomisierten Bereich von 40 Nukleotiden über eine halbautomatische *in vitro*-Selektion auf magnetischen Partikeln isoliert, die am Roboter BioSprint 15 etabliert wurde. Um den Verlauf der Selektion ohne Einsatz von Radioaktivität verfolgen zu können, wurden zwei Assays entwickelt. Der auf Mikrotiterplatten durchgeführte *Fluorescence dye-linked aptamer assay* (FLAA) erlaubt die Überprüfung der Anreicherung von bindenden Spezies über einen ssDNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff. Mit Hilfe des *Diversity assay for nucleic acids* (DANA) hingegen kann die Abnahme der Diversität eines Oligonukleotidpools untersucht werden. Die Kombination der Ergebnisse beider Assays erlaubt eine klare Aussage, wann die Selektion weit genug fortgeschritten ist, um mit der Vereinzelnung der Aptamersequenzen beginnen zu können. Die Abnahme der Diversität des Nukleinsäurepools und die Anreicherung von Bindern verliefen bei der Daunorubicin-Selektion eindeutig parallel.

Nach zehn Selektionszyklen konnten 24 Aptamere isoliert werden, die anhand ihrer Sequenz in sieben Gruppen eingeteilt wurden und sich in FLAA-Experimenten alle als affine Daunorubicin-Binder herausstellten. Alle Sequenzen wiesen einen hohen Anteil an Guanin und eine starke Sequenzhomologie untereinander auf.

Der im FLAA identifizierte beste Binder wurde weitreichend charakterisiert. Seine Dissoziationskonstante lag bei 20 nM, womit er für ein Aptamer gegen ein kleines Molekül überdurchschnittlich affin ist. Die meisten bisher beschriebenen DNA-Aptamere gegen kleine Moleküle zeigen Dissoziationskonstanten im mikromolaren Bereich. Die Bindungseigenschaften des Aptamers wurden unter verschiedenen Pufferbedingungen und pH-Werten untersucht. Die Bindung zeigte sich unabhängig von der Anwesenheit bestimmter Salze, solange eine ausreichend hohe Kationenkonzentration als Gegenionen vorhanden war. Die Abhängigkeit vom pH-Wert beschrieb eine Optimumskurve, wobei die beste Bindung bei pH 6,0 detektiert wurde. Eine Prädenaturierung des Aptamers war für eine effiziente Bindung nicht nötig; eine Immobilisierung am 5'-Ende war ohne Funktionsverlust möglich. Das Aptamer zeigte sich spezifisch für die Anthracycline Daunorubicin und Doxorubicin, wobei die Affinität zu Doxorubicin, das C-14-Hydroxyl-Derivat des Daunorubicins, sogar höher war.

Außerdem wurden mit Hilfe des Aptamers zwei Testsysteme für die Daunorubicin-Detektion aufgebaut. Ein kompetitiver Schnelltest wurde auf Nitrocellulosestreifen entwickelt, der die qualitative

Detektion von 5  $\mu\text{M}$  Daunorubicin ermöglichte. Für den *proof of principle* erfolgte der colorimetrische Nachweis durch manuelle Zugabe eines Enzymsubstrats. Für eine einfache und schnelle Anwendung sollte die Art der Detektion jedoch weiter optimiert werden, um einen zweiten Arbeitsschritt zu vermeiden. Des Weiteren wurde ein kompetitiver Assay im Mikrotiterplattenformat entwickelt, der die Detektion und Quantifizierung von bis zu 15 nM Daunorubicin bzw. Doxorubicin ermöglichte. Dieser Assay eignet sich aufgrund seiner Empfindlichkeit zum Monitoring der Daunorubicin-Konzentration in Patientenserum – zumal Tests in 10 % fötalem Kälberserum ergaben, dass das Aptamer in verdünnten Serumproben mindestens für die Dauer des Assays stabil bleibt.