

# SELEKTION VON APTAMEREN GEGEN ANTIBIOTIKA UND DEREN EINSATZ IN EMPFINDLICHEN ASSAYFORMATEN

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Aniela Wochner**  
aus Frankfurt am Main

September 2007

Diese Arbeit wurde in der Zeit von August 2004 bis August 2007 bei der RiNA GmbH Berlin angefertigt. Die Verfasserin versichert, die Arbeit eigenständig durchgeführt und alle Hilfsmittel angegeben zu haben.

Gutachter: Prof. Dr. Volker A. Erdmann  
Prof. Dr. Hans Lehrach

Disputation am 17. Dezember 2007

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Aptamere</b>	<b>1</b>
1.1.1	<i>In vitro</i> -Selektion von Aptameren	1
1.1.2	Aptamere gegen kleine Moleküle	5
1.1.3	Aptamere in Sensorik und Diagnostik	7
1.2	<b>Daunorubicin</b>	<b>12</b>
1.2.1	Therapeutische Anwendung und Wirkung	12
1.2.2	Struktur der nichtkovalenten Wechselwirkung von Daunorubicin mit DNA	15
1.2.3	Detektion von Daunorubicin in Umwelt und Patientenproben	16
<b>2</b>	<b>Zielstellung</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>19</b>
3.1	<b>Roboter BioSprint 15</b>	<b>19</b>
3.2	<b>SELEX</b>	<b>20</b>
3.2.1	Biotinylierung des Zielmoleküls Daunorubicin	20
3.2.2	Kopplung des biotinylierten Daunorubicin an magnetische Partikel	21
3.2.3	Durchführung der SELEX	21
3.2.4	Alkalische Denaturierung von DNA	24
3.3	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>25</b>
3.3.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	25
3.3.2	Gelelektrophorese	26
3.3.2.1	Agarosegelelektrophorese	27
3.3.2.2	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	27
3.3.3	Nachweismethoden für Nukleinsäuren in Gelen	28
3.3.3.1	Ethidiumbromidfärbung	28
3.3.3.2	UV-Shadowing	28
3.3.4	Extraktion von Nukleinsäuren aus Gelen	29
3.3.4.1	Extraktion aus Agarosegelen	29
3.3.4.2	Extraktion aus Polyacrylamidgelen	29
3.3.5	Alkoholpräzipitation	30
3.3.6	Phenol-Chloroform-Extraktion	31
3.3.7	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	31
3.3.7.1	Konzentrationsbestimmung mittels Absorptionsspektroskopie	31
3.3.7.2	Konzentrationsbestimmung mittels Agarosegel	32
3.3.8	Nukleolytische Spaltung von Nukleinsäuren	32
3.3.8.1	Typ II-Restriktionsenzyme	32
3.3.8.2	S1-Nuklease	32
3.3.9	Klonierung	33
3.3.10	Ligation	33

<b>3.4</b>	<b>Mikrobiologische Methoden</b>	<b>33</b>
3.4.1	Herstellung kompetenter Zellen	33
3.4.2	Transformation	34
3.4.3	Übernachtskulturen	34
3.4.4	Gefrierkulturen	34
3.4.5	Isolierung von Plasmid-DNA	34
<b>3.5</b>	<b>Analytische Methoden</b>	<b>35</b>
3.5.1	Dünnschichtchromatographie	35
3.5.2	Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie	36
3.5.2.1	Bindungskonstanten	36
3.5.2.2	Bestimmung von Bindungskonstanten über SPR	36
3.5.2.3	Kopplung des Liganden Daunorubicin an Streptavidin Sensor-Chips	39
3.5.2.4	Bestimmung der Bindungsparameter der Aptamere	39
3.5.3	Mikrotiterplatten-Bindungsassay	40
3.5.3.1	Fluorescence dye-linked aptamer assay (FLAA)	40
3.5.3.2	Enzyme-linked aptamer assay (ELAA)	41
3.5.4	Nitrocellulose-Teststreifen	42
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>44</b>
<b>4.1</b>	<b>Halbautomatische <i>in vitro</i>-Selektion</b>	<b>44</b>
4.1.1	Biotinylierung von Daunorubicin	44
4.1.2	Durchführung der Selektion	45
<b>4.2</b>	<b>Nicht-radioaktives Monitoring des Selektionsprozesses</b>	<b>47</b>
4.2.1	Monitoring über Fluorescence dye-linked aptamer assay (FLAA)	47
4.2.2	Monitoring über Diversity assay for nucleic acids (DANA)	48
<b>4.3</b>	<b>Charakterisierung der Aptamere</b>	<b>49</b>
4.3.1	Primärstruktur	49
4.3.2	Affinitäten der Einzelklone	52
4.3.3	Sekundärstruktur	53
4.3.4	Verkürzung der Aptamer-Sequenz	56
4.3.5	Charakterisierung der Bindung	57
4.3.5.1	Oberflächenplasmonenresonanz	57
4.3.5.2	Mikrotiterplatten-Assays	59
4.3.5.2.1	Bindungsvergleich verkürzter Einzelklone	59
4.3.5.2.2	Affinität von dsDNA für Daunorubicin	60
4.3.5.2.3	Spezifität der Aptamere (kompetitiver FLAA)	61
4.3.5.2.4	Einfluss von Salzen auf die Aptamerbindung	63
4.3.5.2.5	Einfluss des pH-Werts auf die Aptamerbindung	63
4.3.5.2.6	Einfluss von Prädenaturierung auf die Aptamerbindung	64

---

4.3.5.2.7	Einfluss von Immobilisierung auf die Aptamerbindung.....	65
<b>4.4</b>	<b>Anwendung</b> .....	<b>66</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>68</b>
5.1	Halbautomatische <i>in vitro</i> -Selektion .....	68
5.2	Nicht-radioaktives Monitoring .....	69
5.3	Charakterisierung der Aptamere .....	70
5.4	Anwendung und Ausblick .....	74
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b> .....	<b>79</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>81</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>92</b>
9.1	<b>Materialien</b> .....	<b>92</b>
9.1.1	Puffer .....	92
9.1.2	Oligonukleotide .....	92
9.1.3	Enzyme .....	93
9.1.4	Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Geräte .....	93
9.2	<b>BioSprint 15-Protokolle</b> .....	<b>95</b>
9.3	<b>Eigene Publikationen</b> .....	<b>98</b>
9.4	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>99</b>
9.5	<b>Danksagung</b> .....	<b>100</b>

**ABKÜRZUNGEN UND EINHEITEN**

A <sub>260</sub>	Absorption bei 260 nm	OD	Optische Dichte
A	Adenin	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline 6-sulfonic acid)	PBS	Phosphate-buffered saline
APS	Ammoniumperoxodisulfat	PCR	Polymerasekettenreaktion
ATP	Adenosintri-phosphat	R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
BSA	Rinderserumalbumin	RNA	Ribonukleinsäure
BP	Bindungspuffer	RNase	Ribonuklease
C	Cytosin	rpm	Umdrehungen pro Minute
CAM	Chloramphenicol	RT	Raumtemperatur
DANA	Diversity assay for nucleic acids	RU	Resonanzeinheit
DC	Dünnschichtchromatographie	s	Sekunde
DNA	Desoxyribonukleinsäure	SDS	Natriumdodecylsulfat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	SELEX	systematic evolution of ligands by exponential enrichment
ds	Doppelstrang, doppelsträngig	SPR	Oberflächenplasmonenresonanz
DOX	Doxorubicin	ss	Einzelstrang, einzelsträngig
DRN	Daunorubicin	T	Thymin
DTT	1,4-Dithiothreitol	T	Tween 20
ε	Extinktionskoeffizient	t <sub>1/2</sub>	Halbwertszeit
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	TBE	Tris-Borat-EDTA (Puffer)
ELAA	Enzyme-linked aptamer assay	TE	Tris-EDTA (Puffer)
FLAA	Fluorescence dye-linked aptamer assay	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
g	Erdbeschleunigung	TET	Tetracyclin
g	Gramm	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
G	Guanin	U	Unit, Einheit der Enzymaktivität
h	Stunde	U	Uracil
HRP	Meerrettich-Peroxidase	ÜN	über Nacht
ka	Assoziationsrate	UV	Licht im ultravioletten Bereich
K <sub>A</sub>	Assoziationskonstante	V	Volt
kd	Dissoziationsrate	Vis	Licht im sichtbaren Bereich
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante	v/v	Volumen pro Volumen
l	Liter	w/v	Gewicht pro Volumen
LB	Luria-Bertani		
m	Meter		
M	molar (mol/l)		
min	Minute		
N, dN	Nukleotid, Desoxynukleotid	<b>Präfixe vor Einheiten</b>	
NA	Neutravidin	p	Pico (10 <sup>-12</sup> )
NHS	N-Hydroxysuccinimid	n	Nano (10 <sup>-9</sup> )
Ni-NTA	Nickel- Nitriлотriessigsäure	μ	Mikro (10 <sup>-6</sup> )
nt	Nukleotid	m	Milli (10 <sup>-3</sup> )