

2 ZIELSTELLUNG

Ziel dieser Arbeit ist die Selektion und Charakterisierung von DNA-Aptameren gegen das Anthracyclin-Antibiotikum Daunorubicin. Als Zytostatikum wird dieses häufig in der Krebstherapie eingesetzt, ist jedoch selbst hochgradig toxisch. Sein Nachweis ist deshalb in allen Produktions- und Anwendungsstadien von größter Bedeutung, um eine Gefährdung betroffener Personen zu minimieren. So sollte die Daunorubicin-Dosis sowohl beim Umgang am Arbeitsplatz (Hersteller, Apotheker, Krankenhauspersonal), bei der therapeutischen Applikation im Patienten als auch im Abwasser, wohin es zu einem signifikanten Anteil unmetabolisiert ausgeschieden wird, kontrolliert werden können. Mit Hilfe der selektierten Aptamere soll deshalb im Zuge dieser Arbeit ein einfaches, schnelles und preiswertes Detektionssystem für Daunorubicin aufgebaut werden.

Um Selektionen möglichst schnell, reproduzierbar – und für die Zukunft parallelisierbar – zu machen, soll im ersten Teil der Arbeit eine halbautomatische Selektionsprozedur für DNA-Aptamere etabliert werden. Dazu müssen zunächst Selektionsprotokolle für die einzelnen Schritte erarbeitet werden. Da die Selektion auf streptavidinbeschichteten magnetischen Partikeln durchgeführt wird, muss zudem Daunorubicin biotinyliert und auf den Beads immobilisiert werden.

Um den Einsatz von Radioaktivität zu vermeiden, sollen verschiedene Assays entwickelt werden, die ein nicht radioaktives Monitoring der Selektion ermöglichen.

Nach Selektion, Sequenzierung, Motivsuche und Vergleich der Bindungsaffinitäten aller Aptamere, wird der beste Binder charakterisiert. Dies umfasst neben der Bestimmung der Bindungskonstanten und der Spezifität auch die Evaluierung des Bindungsverhaltens unter verschiedenen Pufferbedingungen sowie nach Immobilisierung an einer festen Oberfläche.

Abschließend sollen Detektionssysteme auf Aptamerbasis entwickelt werden, die den Nachweis von Daunorubicin ermöglichen. Zur quantitativen Analyse der Daunorubicin-Konzentration in Patientenproben, eventuell auch zur Abwasseranalyse, eignet sich ein kompetitiver Assay im Mikrotiterplattenformat, mit dessen Hilfe auch die Spezifität der Aptamere bestimmt werden kann. Außerdem soll ein Assay für den qualitativen Daunorubicin-Nachweis in Form eines Streifentests aufgebaut werden, wodurch eine sehr schnelle und einfache Überprüfung, beispielsweise des Arbeitsplatzes, ermöglicht werden kann.