

3 *METHODEN*

3.1 **ROBOTER BIOSPRINT 15**

Um den Selektionsprozess von Aptameren zu parallelisieren, zu beschleunigen und reproduzierbarer zu machen, war das erste Ziel dieser Arbeit, die Prozedur an den Roboter BioSprint 15 von Qiagen anzupassen.

Mit diesem Roboter (Abbildung 5) lässt sich das Arbeiten mit magnetischen Partikeln automatisieren. Er ist aufgebaut aus 3 x 5 Stabmagneten, die am oberen Ende miteinander verbunden und als Gesamtheit horizontal (x-Achse) und vertikal (y-Achse) beweglich sind. In einer zweiten Ebene gibt es Steckplätze für Plastikhüllen, die die Magneten umschließen, wenn diese in die Reaktionslösungen tauchen. Eine ausziehbare Lade enthält Steckplätze für insgesamt 15 Plastikstreifen ("Fünf-Kammern-Strips"), die aus jeweils fünf Reaktionskammern (Kammern A bis E) zusammengesetzt sind.

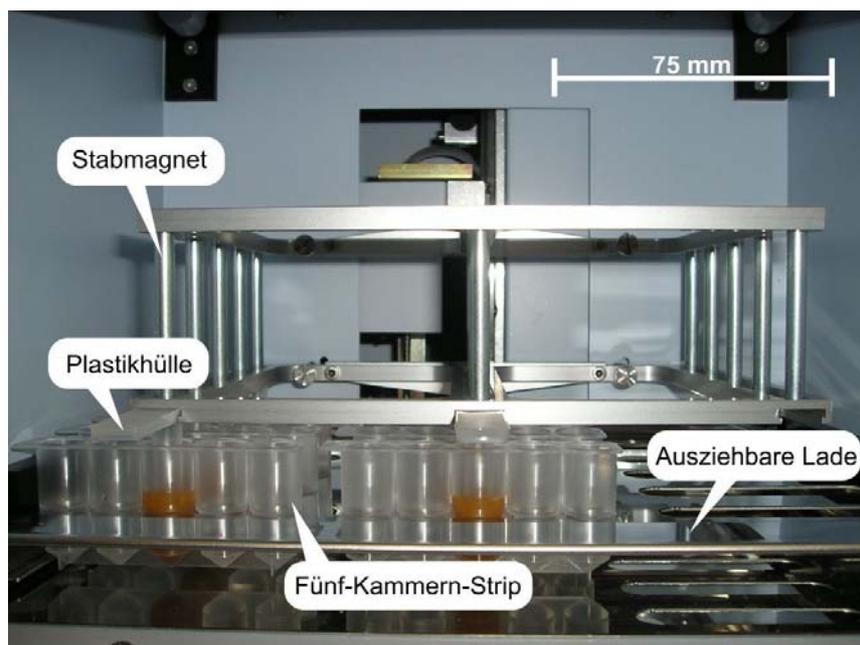


Abbildung 5: Innenansicht des BioSprint 15.

Mit Hilfe der Stabmagneten können magnetische Partikel in Lösung inkubiert und zwischen den Reaktionskammern eines Strips transferiert werden. Die Funktionsweise des BioSprint 15 ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt: Der von einer Plastikhülle umgebene Magnetstab taucht in die Reaktionskammer, in dem sich die magnetischen Partikel in Suspension befinden. Durch langsame Auf- und Ab-Bewegungen des Magneten werden die Partikel gebunden und können in die nächste Reaktionskammer transferiert werden. Hier wird der Magnetstab aus der Plastikhülle entfernt, und die

Beads werden durch schnelle Bewegungen der Plastikhülle in der neuen Lösung resuspendiert. Die Inkubationszeiten und die Geschwindigkeit der Magnetbewegung sind über die Software "BioSprint Software 1.0" programmierbar.

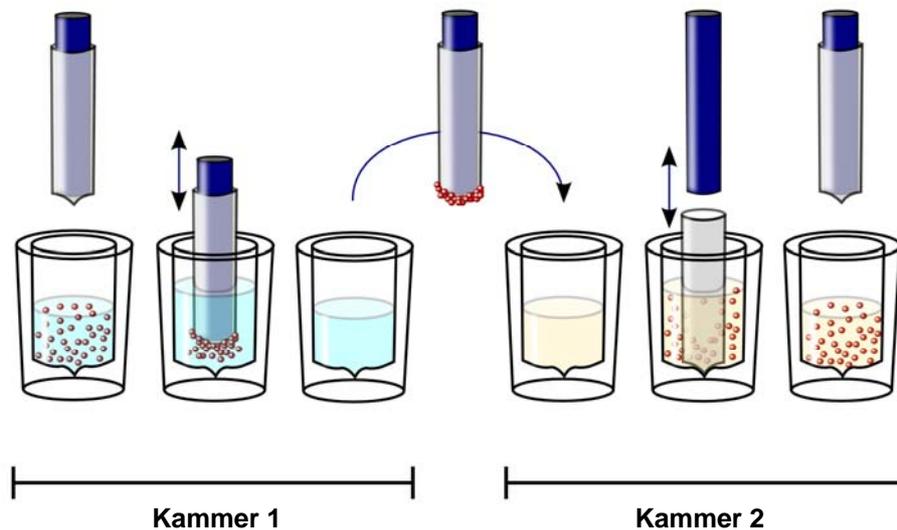


Abbildung 6: Funktionsweise des BioSprint 15.

3.2 SELEX

Die SELEX ist ein zyklischer Prozess, um Nukleinsäuren mit spezifischen Bindungseigenschaften aus einem Pool unterschiedlichster Sequenzen anzureichern. Im Zuge dieser Arbeit wurde die Methode halbautomatisiert und die Bedingungen an den Roboter BioSprint 15 (siehe 3.1) angepasst. Die hierzu verwendeten Programme "Beads_Wash", "Stripwechsel", "Kopplung_Target", "SELEX_Vorsäule" sowie "SELEX_DRN1" bis "SELEX_DRN10" befinden sich im Anhang.

3.2.1 Biotinylierung des Zielmoleküls Daunorubicin

Die Biotinylierung des Zielmoleküls Daunorubicin wurde nach Sugawara (Sugawara *et al.* 2005) mit Sulfo-NHS-SS-Biotin durchgeführt.

Dazu wurden 500 µl 2 mM Sulfo-NHS-SS-Biotin in Dimethylformamid mit 250 µl 1 mM Daunorubicin ($pK_a = 8,4$ (Frezard *et al.* 2001)) in PBS, pH 8,5, 24 h unter Rotation bei 4°C inkubiert. Die Reaktion wurde zunächst über analytische DC (siehe 3.5.1) überprüft, wobei als Laufmittel ein Chloroform-Ethanol-Ameisensäure-Gemisch (40:10:2) verwendet wurde. Das Produkt wurde anschließend von den Edukten über präparative DC im gleichen Laufmittel getrennt und aufgereinigt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte spektrophotometrisch bei 480 nm.

3.2.2 Kopplung des biotinylierten Daunorubicin an magnetische Partikel

Um Daunorubicin als Zielmolekül in die Selektion einsetzen zu können, wurde es über Biotin an streptavidinbeschichtete magnetische Partikel gekoppelt.

Dazu wurden 150 µl Dynabeads[®] M-280 Streptavidin (= 1,5 mg) zusammen mit 350 µl PBS-T in Kammer B eines Fünf-Kammern-Strips vorgelegt, und gemäß Protokoll "Beads_Wash" gewaschen. Über das Programm "Stripwechsel" wurden die Beads in Kammer A des zweiten Strips überführt. In diesem Strip waren in Kammer A 100 pmol biotinyliertes Daunorubicin in 500 µl PBS-T vorgelegt, Kammern C, D und E waren mit 1 ml PBS-T gefüllt. Über das Programm „Beads_Kopplung“ wurden die magnetischen Partikel 30 min mit dem biotinylierten Target inkubiert und anschließend dreimal jeweils 3 min gewaschen.

Die noch freien Streptavidin-Bindungsstellen wurden anschließend durch Inkubation mit einem Überschuss Biotin gesättigt. Das Blocken wurde analog der Target-Kopplung über das Programm „Beads_Kopplung“ durchgeführt. Hier wurden anstelle des biotinylierten Targets 500 µl 20 µM Biotin in BP-T in Kammer A pipettiert. Die Kammern C und D waren mit 1 ml PBS-T gefüllt, Kammer E zum Äquilibrieren der Beads mit 1 ml BP-T. Die mit dem Target gekoppelten Beads wurden über das Programm „Stripwechsel“ in den zweiten Strip transferiert.

Nach der Sättigung der freien Biotin-Bindungsstellen wurden die magnetischen Partikel manuell in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, der Überstand abgenommen und die Beads in 150 µl BP-T resuspendiert. So wurde die ursprüngliche Konzentration von 10 mg/ml Beads wieder hergestellt.

3.2.3 Durchführung der SELEX

Die Selektion der Aptamere wurde ebenfalls am BioSprint 15 durchgeführt. Dabei wurde der Selektionsdruck durch Steigerung der Stringenz von Runde zu Runde immer weiter verstärkt. Um stringenteren Bedingungen zu erreichen, wurden beispielsweise die Waschschriffe durch Erhöhung des Waschvolumens oder durch Verlängerung der Inkubationszeit intensiviert oder das Verhältnis von DNA zu Target variiert. Außerdem wurden so genannte "Vorsäulen" eingesetzt – ungekoppeltes Matrixmaterial, das die unspezifischen Matrix-Binder aus dem Pool entfernt. Damit die in die Selektion eingesetzte DNA in ihrer stabilen Konformation vorliegt, wurde sie in einem Volumen von 100 µl BP-T 3 min bei 90°C denaturiert und im Anschluss für 5 min auf Eis gestellt.

In der ersten Runde wurde 1 nmol ssDNA eingesetzt; die Menge wurde in den folgenden Runden über 38 pmol (Runde 2), 45 pmol (Runde 3), 53 pmol (Runde 4) und 42 pmol (Runde 5) auf 18 pmol reduziert (Runden 6 - 10) (siehe Tabelle 1). Dabei wurde ein Verhältnis von 10:1 (Runde 1), 4:1 (Runden 2 - 5) und 2:1 (Runden 6 - 10) DNA zu Daunorubicin gewählt.

Zur Vorbereitung der Selektion wurden die 100 µl renaturierte ssDNA zu 900 µl (Runde 1) bzw. 300 µl BP-T (Runde 2 - 10) in Kammer A eines Fünf-Kammern-Strips pipettiert. In Kammern B, C und D des Strips wurden für die Waschschriffe jeweils 400 µl - 1 ml (Kammern B und C) bzw. 400 µl (Kammer D)

BP-T vorgelegt. Da in der ersten Runde nicht spezifisch eluiert wurde, sondern alle auf den Beads befindlichen DNAs amplifiziert werden sollten, wurde Kammer E in dieser Runde mit 400 µl BP-T befüllt; ab Runde 2 wurden für die spezifische Elution 400 µl 50 mM DTT in BP-T vorgelegt. In diesen Runden wurden die Beads nach der Elution über das Programm "Stripwechsel" in Kammer A eines zweiten Strips überführt, in das 400 µl BP-T vorgelegt waren (siehe Tabelle 2). Es wurde darauf geachtet, dass die Volumina der letzten Waschfraktion, der Elutionsfraktion und des Waschpuffers, in das die Beads nach der Elution abgeladen wurden, übereinstimmend waren, um die enthaltene DNA-Menge vergleichbar zu machen.

Für die Interaktion des DNA-Pools mit dem immobilisierten Target wurde dann – entsprechend dem gewünschten Verhältnis – das notwendige Volumen an gekoppelten Beads (siehe 3.2.2 und Tabelle 1) zur DNA in Kammer A gegeben. In der ersten Runde geschah dies nach dem Blocken des Säulenmaterials über das Programm „Stripwechsel“, ab Runde 2 wurden vorbereitete gekoppelte Beads aufgrund des geringen Volumens manuell in Kammer A pipettiert. Über die SELEX-Programme "SELEX_DRN1" bis "SELEX_DRN10" (siehe Anhang) wurden die Komponenten 45 min inkubiert und nicht bindende Nukleinsäuren in drei anschließenden Waschschrritten entfernt. Sowohl das Volumen der Waschfraktionen als auch die Inkubationszeiten wurden im Zuge der Runden erhöht. Von der zweiten Runde an wurden spezifische Binder nach den Waschschrritten durch 30-minütige Inkubation in 50 mM DTT eluiert. Da Daunorubicin über einen Spacer mit Disulfidbrücke an die magnetischen Partikel gekoppelt war, konnte das Target einschließlich der daran gebundenen Nukleinsäuren durch Reduktion der Disulfidbrücke von den Beads abgespalten werden. Um unspezifische Matrixbinder aus dem DNA-Pool zu entfernen, wurden ab der vierten Runde Vorsäulen verwendet. Hierzu wurden mit Biotin geblockte (siehe 3.2.2), in BP-T äquilibrierte magnetische Partikel vor der eigentlichen SELEX im gewünschten Volumen (Säulenvolumen der Hauptsäule oder ein Vielfaches davon) manuell zum vorbereiteten DNA-Pool in Kammer A pipettiert. Über das Programm "SELEX_Vorsäule" wurde die ssDNA 30 min mit dem Matrixmaterial inkubiert und anschließend in Kammer A eines zweiten Strips überführt und verworfen.

Nach Abschluss des SELEX-Programms wurden die magnetischen Partikel manuell in ein 0,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, der Überstand abgenommen und die Beads in 10 µl H₂O resuspendiert. Die DNA in den Wasch- und Elutionsfraktionen sowie im Überstand der Beads, der einer zusätzlichen Waschfraktion entspricht, wurde über Natriumacetat-Ethanol-Fällung präzipitiert (siehe 3.3.5), in 10 µl H₂O gelöst und anschließend über PCR amplifiziert, wobei der Gegenstrang 5'-biotinyliert wurde. Dazu wurden alle Fraktionen sowie die magnetischen Partikel selbst mit 190 µl eines PCR-Mastermixes versetzt, der alle für die PCR nötigen Komponenten (siehe 3.3.1) und zusätzlich 0,5 % (v/v) Triton X-100 enthielt (Akada *et al.* 2000). Nach 7 - 15 Zyklen (siehe Tabelle 2) wurden pro Ansatz 5 µl auf einem 2 % TBE-Agarosegel analysiert. Über alkalische Denaturierung (siehe 3.2.4) wurde anschließend aus der „Beadfraktion“ (Runde 1) bzw. den Elutionsfraktionen (Runden 2-10) der Einzelstrang aufgereinigt. Eine Übersicht über die genauen Selektionsbedingungen der einzelnen Runden ist in den Tabellen 1 und 2 zusammengestellt.

Tabelle 1: Übersicht über die in die Selektion eingesetzten Mengen ssDNA und Daunorubicin. Im Verlauf der Runden geänderte Parameter sind rot dargestellt. Die DRN-Beads hatten eine Konzentration von 10 mg/ml.

Runde	ssDNA [µg]	ssDNA [pmol]	[ssDNA] [nM]	DRN [pmol]	DRN-Beads [µl]	[DRN] [nM]	Molares Verhältnis DNA:DRN
1	26,4	1000	1000	100	150	100	10:1
2	1,0	38	95	10	15	25	4:1
3	1,2	45	112	10	15	25	4:1
4	1,4	53	132	15	22,5	37,5	4:1
5	1,1	42	105	11	16,5	27,5	4:1
6	0,5	18	45	9	13,5	22,5	2:1
7a & 7b	0,5	18	45	9	13,5	22,5	2:1
8	0,5	18	45	9	13,5	22,5	2:1
9	0,5	18	45	9	13,5	22,5	2:1
10	0,5	18	45	9	13,5	22,5	2:1

Tabelle 2: Übersicht über die Selektionsparameter der SELEX gegen Daunorubicin. Im Verlauf der Runden geänderte Parameter sind rot dargestellt. Ein Vorsäulenvolumen (VS) entspricht dem Säulenvolumen der Hauptsäule (siehe „DRN-Beads“ in Tabelle 1) (VSx2 = doppeltes Säulenvolumen, VSx4 = vierfaches Säulenvolumen). In Runde 3 und Runde 10 wurden die Parameter der vorhergehenden Runde ohne Änderung übernommen. Der angereicherte DNA-Pool aus Runde 7b wurde in Runde 8 eingesetzt.

Runde	Vorsäule (VS)	Inkubations-Volumen Kammer A	Wasch1 (BP-T)	Wasch2 (BP-T)	Wasch3 (BP-T)	Elution (50 mM DTT in BP-T)	PCR-Zyklen
			Kammer B	Kammer C	Kammer D	Kammer E	
1	--	1000 µl	1000 µl 3 min	1000 µl 3 min	1000 µl 3 min	--	15+3
2	--	400 µl	400 µl 3 min	400 µl 3 min	400 µl 3 min	400 µl 30 min	15
3	--	400 µl	400 µl 3 min	400 µl 3 min	400 µl 3 min	400 µl 30 min	10
4	VS	400 µl	400 µl 3 min	400 µl 3 min	400 µl 3 min	400 µl 30 min	8
5	VS	400 µl	400 µl 3 min	400 µl 3 min	400 µl 30 min	400 µl 30 min	8
6	VS	400 µl	400 µl 3 min	400 µl 3 min	400 µl 30 min	400 µl 30 min	8
7a	VS	400 µl	1000 µl 3 min	1000 µl 3 min	400 µl 30 min	400 µl 30 min	8
7b	VSx2	400 µl	1000 µl 3 min	1000 µl 3 min	400 µl 30 min	400 µl 30 min	8
8	VSx4	400 µl	1000 µl 3 min	1000 µl 3 min	400 µl 30 min	400 µl 30 min	8
9	2x VSx2	400 µl	1000 µl 30 min	1000 µl 30 min	400 µl 30 min	400 µl 30 min	8
10	2x VSx2	400 µl	1000 µl 30 min	1000 µl 30 min	400 µl 30 min	400 µl 30 min	8

3.2.4 Alkalische Denaturierung von DNA

Neben der Strangtrennung über denaturierende Polyacrylamidgele, asymmetrischer PCR oder dem selektiven Abbau eines einzelnen Strangs durch das Enzym Lambda-Exonuklease, bietet die alkalische Denaturierung eine schnelle Methode zur Herstellung einzelsträngiger DNA aus einem doppelsträngigen PCR-Produkt.

Bei dieser Methode wird der Gegenstrang der gewünschten ssDNA durch Verwendung eines 5'-biotinylierten Primers über PCR biotinyliert und das PCR-Produkt an streptavidinbeschichtete magnetische Partikel gekoppelt. Durch Inkubation in Natronlauge werden die beiden DNA-Stränge getrennt, wobei der biotinylierte Gegenstrang an den Partikeln gebunden bleibt und mit Hilfe eines Magneten aus der Lösung entfernt werden kann. Die alkalische Lösung, die nun den gewünschten Einzelstrang enthält, wird anschließend neutralisiert.

Zur Durchführung wurde der Roboter BioSprint 15 (siehe 3.1) eingesetzt. Die zur Einzelstranggenerierung verwendeten Programme "Beads_Wash", "Stripwechsel" und "Separation_ds" sind im Anhang aufgeführt.

Zunächst wurden 200 μl Dynabeads[®] M-280 Streptavidin (experimentell bestimmte Bindungskapazität: 100 pmol Biotin/150 μl) gemäß Programm "Beads_Wash" dreimal in jeweils 1 ml PBS-T gewaschen. Dazu wurden 200 μl Beads zusammen mit 300 μl PBS-T in Kammer B eines Fünf-Kammern-Strips pipettiert, Kammern C, D und E wurden mit jeweils 1 ml PBS-T befüllt.

Über das Programm "Stripwechsel" wurden die äquilibrierten Partikel anschließend von Kammer E des ersten Strips in Kammer A des zweiten Strips transferiert.

In dieser Kammer waren 180 μl PCR-Produkt (4 - 8 μg), dessen Antisense-Strang am 5'-Ende biotinyliert war, und 46 μl 5 M NaCl (Endkonzentration 1 M NaCl) vorgelegt. Eine hohe Salzkonzentration ist für die Bindung von Biotin an Streptavidin vorteilhaft. Kammern B, C und D des zweiten Strips waren mit jeweils 1 ml PBS-T befüllt, Well E mit 200 μl 100 mM NaOH.

Nach 10-minütiger Bindung des PCR-Produkts an die streptavidinbeschichteten Partikel (Kammer A) wurde das DNA-Streptavidin-Konjugat dreimal jeweils 3 min in PBS-T gewaschen und die DNA anschließend 5 min in 100 mM NaOH denaturiert. Die Partikel wurden aus der Lösung entfernt und diese durch Zugabe von 760 μl PBS (ohne Tween 20) und 40 μl 1 M NaH_2PO_4 neutralisiert. Die Inkubation in Lauge sollte 5 min nicht überschreiten, da sonst sowohl die Nukleinsäuren als auch beteiligte Proteine zerstört werden. Die einzelsträngige DNA wurde im Anschluss über Natriumacetat-Isopropanol-Fällung (siehe 3.3.5) präzipitiert.

3.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

3.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode zur exponentiellen Amplifikation von DNA. Es werden neben der zu amplifizierenden DNA zwei 15 - 30 Basen lange Oligonukleotide (Primer) mit definierter Sequenz benötigt, die zu den 3'-Enden des DNA-Templates bzw. dessen Gegenstrang komplementär sind. Nach einem Denaturierungsschritt hybridisieren die Primer in einem Annealing-Schritt mit dem zu amplifizierenden DNA-Template. Dabei wird die Annealing-Temperatur so hoch gewählt, dass keine unspezifische Hybridisierung auftritt. Mit einer thermostabilen DNA-Polymerase erfolgt im Extensionsschritt die Verlängerung des Primers in 5'-3'-Richtung. Im Idealfall erhält man so aus jedem DNA-Doppelstrang zwei neue DNA-Stränge. Durch mehrmalige Wiederholung dieser drei Schritte erhält man eine exponentielle Zunahme der DNA nach $N_f = N_0 (1 + Y)^n$, wobei N_f die Kopienzahl des amplifizierten Sequenz nach n Zyklen ist, N_0 die Ausgangskopienzahl des Templates und Y die Effizienz der Amplifikation pro Zyklus (Saiki *et al.* 1985; Keohavong & Thilly 1989). Die exponentielle Phase hält so lange an, bis eine der Komponenten limitierend auf die Reaktion wirkt.

Als Template-DNA kann sowohl einzel- als auch doppelsträngige DNA eingesetzt werden. Die PCR-Reaktionen in dieser Arbeit wurden mit GoTaq[®] Flexi DNA Polymerase oder, in Fällen, in denen eine geringe Fehlerrate wichtig war, mit Phusion[®] DNA Polymerase durchgeführt. Die GoTaq DNA Polymerase ist eine nicht rekombinante, modifizierte Form der Taq-DNA-Polymerase, die keine 3'-5'-Exonukleaseaktivität besitzt. Außerdem besitzt sie eine terminale Transferaseaktivität, die für die Klonierung von Bedeutung ist (siehe 3.3.9). Bei der Phusion DNA Polymerase handelt es sich um eine Polymerase aus *Pyrococcus*, die mit einer Domäne zur Erhöhung der Prozessivität fusioniert ist. Sie besitzt eine 5'-3'-DNA-Polymeraseaktivität und eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität und generiert DNA-Fragmente mit glatten Enden. Ihre Fehlerrate liegt bei $4,4 \cdot 10^{-7}$ und damit – nach Herstellerangaben – etwa fünfzigfach niedriger als die der Taq-Polymerase, nach Keohavong sogar zweitausendfach niedriger (Keohavong & Thilly 1989).

Die Zusammensetzung von PCR-Ansätzen ist in Tabelle 3 zusammengefasst. Dem verwendeten 5x HF-Reaktionspuffer der Phusion DNA Polymerase war bereits $MgCl_2$ beigesetzt, so dass dieses nicht zusätzlich zugegeben werden musste. Bei PCR-Ansätzen, die magnetische Partikel enthielten, wurde 0,5 % (v/v) Triton X-100 zugesetzt. Triton X-100 verhindert dabei ein Denaturieren des Enzyms an der Beadoberfläche (Akada *et al.* 2000). Als Negativkontrolle wurde immer ein Ansatz ohne Template mitgeführt.

Tabelle 3: Zusammensetzung eines 100 µl-PCR-Ansatzes. Bei 200 µl-Ansätzen wurde die doppelte Menge der angegebenen Komponenten eingesetzt.

Komponenten	Mengen	Endkonzentration
Template-DNA	100 - 200 ng	100 - 200 ng/µl
5x Puffer	20 µl	1x
25 mM MgCl ₂	10 µl	2,5 mM
10 mM dNTPs	2 µl	200 µM
100 µM Forward-Primer	1 µl	1 µM
100 µM Reverse-Primer	1 µl	1 µM
DNA-Polymerase	1 µl	2 - 5 U/100 µl
H ₂ O	ad 100 µl	-

Für PCR-Ansätze mit GoTaq- bzw. Phusion-DNA-Polymerase wurden folgende PCR-Programme verwendet (Tabelle 4):

Tabelle 4: PCR-Programme.

Programmschritt	GoTaq		Phusion	
	Temperatur [T]	Zeit [t]	Temperatur [T]	Zeit [t]
1 Initiale Denaturierung	94°C	3 min	98°C	30 s
2 Denaturierung	94°C	1 min	98°C	10 s
3 Annealing	55°C	1 min	55°C	30 s
4 Extension	72°C	1 min	72°C	30 s
5 Wiederholungen (Schritte 2 - 4)		7-14x		9x
6 Abschließende Extension	72°C	3 min	72°C	10 min
7 Kühlen	4°C	∞	4°C	∞

3.3.2 Gelelektrophorese

Die gängigste Methode zur Trennung und Aufreinigung von Nukleinsäuren ist die Gelelektrophorese. Sie beruht auf der Wanderung der geladenen Moleküle im elektrischen Feld. Man arbeitet hier bei einem pH-Wert von etwa 8,5, da die Nukleinsäuren bei diesem pH-Wert als Polyanionen vorliegen und zur positiv geladenen Anode wandern. Dabei macht man sich die von der Größe und Form abhängige Mobilität der Moleküle in der Gelmatrix zunutze. Als Gelmatrix wird hauptsächlich Agarose und Polyacrylamid verwendet. Während Agarose zur Trennung von größeren Nukleinsäuren (0,1 - 25 kb) eingesetzt wird, werden mit Polyacrylamid kleinere Nukleinsäuren bis zu einer Größe von etwa 1 kb getrennt. Der Trennbereich wird über die Konzentration von Agarose bzw. Acrylamid/Bisacrylamid variiert.

3.3.2.1 Agarosegelelektrophorese

Elektrophoretische Untersuchungen von dsDNA erfolgen in dieser Arbeit über 2 % (w/v) Agarosegele in 1x TBE-Puffer, denen 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt war. Diese Konzentration erlaubt eine Auftrennung von DNA-Fragmenten zwischen 100 bp und 2 kb (Sambrook & Russell 2001). Die Proben wurden vor dem Gelauftrag mit 1 µl 10x Loading Buffer versetzt und zu einem Endvolumen von 10 µl mit 1x TBE aufgefüllt. Als Laufpuffer wurde 1x TBE verwendet, der Gellauf erfolgte bei einer Spannung von 8 V/cm. Als Größenstandards wurden 10 bp- oder 50 bp-Leitern aufgetragen.

3.3.2.2 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Bei der Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) wird die Gelmatrix durch radikalische Polymerisation von Acrylamid und dem Quervernetzer N,N'-Methylenbisacrylamid hergestellt. Als Polymerisationsstarter dient Ammoniumperoxodisulfat (APS), als Radikalstabilisator N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED). Die Porengröße des Gels und somit sein Trennbereich wird über die Konzentration von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid reguliert. Für analytische Zwecke wurden in dieser Arbeit Gele mit einem Acrylamid-Gehalt von 10 % und 12 % verwendet. Für präparative denaturierende PAGE wurden 6 % Acrylamid-Gele eingesetzt, da die Extraktion über Elektroelution bei niedriger Acrylamid-Konzentration effizienter verläuft.

Denaturierende PAGE. Um die Ausbildung von Sekundär- und Tertiärstrukturen zu unterbinden, die das Laufverhalten von Nukleinsäuren verändern können, arbeitet man bei der Analyse und Aufreinigung einzelsträngiger Nukleinsäuren unter denaturierenden Bedingungen. Dafür wird der Polymerisationsansatz mit 7 M Harnstoff versetzt. Sowohl für die Gelherstellung als auch als Laufpuffer wurde in dieser Arbeit 1x TBE verwendet. Der Gellauf erfolgte bei 15 V/cm.

Native PAGE. Die native PAGE erfolgt analog, jedoch wurde dem Polymerisationsansatz kein Harnstoff zugesetzt. Als Puffer wurde 0,5x TB mit 1 mM MgCl₂ verwendet. Bei dieser Methode darf das Gel, im Gegensatz zur denaturierenden PAGE, nicht zu warm werden, da die DNA sonst denaturiert. Der Gellauf erfolgte hier bei 8 V/cm.

Tabelle 5: Herstellung von Polyacrylamidgelen. Dargestellt ist die Zusammensetzung für 100 ml-Gellösung. Zur Herstellung nativer Polyacrylamidgele wurde dem Ansatz kein Harnstoff zugesetzt.

Acrylamid-Gehalt	6 %	10 %	12 %
Trennbereich	70 - 450 bp	25 - 200 bp	15 - 100 bp
40 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	15 ml	25 ml	30 ml
10x Puffer	10 ml	10 ml	10 ml
Harnstoff	(42 g)	(42 g)	(42 g)
H ₂ O	ad 100 ml	ad 100 ml	ad 100 ml
APS (10 %)	1000 µl	1000 µl	1000 µl
TEMED	100 µl	100 µl	100 µl

3.3.3 Nachweismethoden für Nukleinsäuren in Gelen

3.3.3.1 Ethidiumbromidfärbung

Der schnellste und gängigste analytische Nachweis von Nukleinsäuren geschieht über Ethidiumbromid. Dieser heterozyklische, kationische Fluoreszenzfarbstoff interkaliert in die Nukleinsäuren, wodurch diese auf einem Transilluminator bei 306 nm Durchlicht als leuchtende Banden nachweisbar werden.

Polyacrylamidgele wurden für 10 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml) in 1x TBE angefärbt, bei Agarosegelen wurde der Farbstoff bereits der Gellösung zugesetzt (0,5 µg/ml).

3.3.3.2 UV-Shadowing

Bei der präparativen Aufreinigung von Nukleinsäuren sollen Verunreinigungen der Probe, beispielsweise mit Nukleotiden oder Fluoreszenzfarbstoffen, vermieden werden. Für den Nachweis macht man sich die Absorption der Nukleinsäuren bei 260 nm zunutze.

Dazu wird das Gel auf eine in Frischhaltefolie eingewickelte Dünnschichtchromatographie (DC)-Platte gelegt, die mit einem Fluoreszenzindikator (UV₂₅₄) behandelt wurde. Durch aufgestrahltes UV-Licht kann man die Nukleinsäuren als dunklen Schatten erkennen und ausschneiden. Um eine Schädigung der Nukleinsäuren durch UV-Licht zu vermeiden, sollte dieser Schritt möglichst schnell durchgeführt werden. Der Nachteil dieser Methode liegt in ihrer geringen Empfindlichkeit (0,5 - 1 A₂₆₀), weshalb sie hauptsächlich bei präparativen Aufreinigungen eingesetzt wird.

3.3.4 Extraktion von Nukleinsäuren aus Gelen

3.3.4.1 Extraktion aus Agarosegelen

Zur Vereinzelung der Aptamere wurden die PCR-Produkte nach der SELEX kloniert. Dafür wurde die amplifizierte dsDNA zunächst über Gelelektrophorese aufgetrennt, um unerwünschte Nebenprodukte zu entfernen. Anschließend wurde die gewünschte Nukleinsäurebande unter UV-Licht (254 nm) ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion aus dem Gelstück erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Diese Präparationsmethode eignet sich für dsDNA von 70 bp bis 10 kb.

Das Prinzip der Aufreinigung beruht auf der Tatsache, dass Silica-Material in Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze (z. B. Guanidiniumthiocyanat) DNA bindet, die nach einem Waschschriff mit einem Salz-Ethanol-Puffer, durch Wasser oder Lösungen mit geringen Salzkonzentrationen eluiert werden kann.

3.3.4.2 Extraktion aus Polyacrylamidgelen

Um größere Mengen an ssDNA in reiner Form herzustellen, etwa für Biacore-Messungen, wurde der Einzelstrang über denaturierende PAGE aufgereinigt.

Elution mittels Diffusion. Nach der Auftrennung über Gelelektrophorese wurde die gewünschte Nukleinsäurebande über UV-Shadowing (siehe 3.3.3.2) identifiziert und mit Hilfe eines Skalpells ausgeschnitten. Das Gelstück wurde zerkleinert und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen mit Elutionspuffer (0,3 M Natriumacetat, pH 4,8) überschichtet. Nach Inkubation im Thermomixer (1 h, 37°C, 400 rpm) wurde der Überstand über Glaswolle in ein neues Reaktionsgefäß zentrifugiert, um Gelreste zu entfernen und durch Zugabe des 2,5-fachen Volumens Ethanol bei -80°C präzipitiert (siehe 3.3.5). Die Gelstücke wurden weitere zwei Mal mit Elutionspuffer überschichtet und analog eluiert.

Elektroelution. Die Elektroelution erfolgte mit Hilfe des ELUTRAP[®] Electro-Separation Systems von Schleicher und Schuell. Das Prinzip beruht auf der Wanderung der negativ geladenen Nukleinsäuren im elektrischen Feld hin zur positiv geladenen Anode.

Es wird eine Kammer verwendet, die an beiden Enden von einer engmaschigen Membran (BT1) abgeschlossen wird. Durch diese Membran gelangen unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes nur Moleküle einer Größe von 3 bis 5 kD, große Nukleinsäuren werden zurückgehalten. Eine zweite Membran (BT2) dient als Vorfilter, der Gelbestandteile und andere Partikel von der gereinigten Probe trennt. Zwischen den beiden Membranen BT1 und BT2 wird so eine Falle gebildet, in der die zu reinigenden Nukleinsäuren zurückgehalten werden (Abbildung 7).

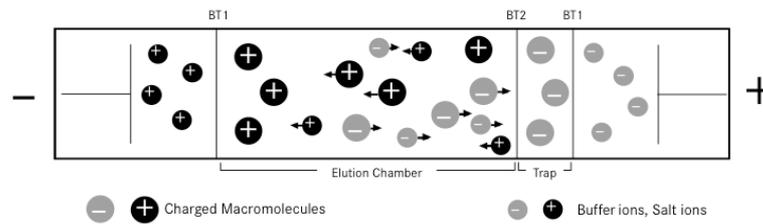


Abbildung 7: Prinzip der Elektroelution von Nucleinsäuren aus Gelen mit Hilfe des ELUTRAP® Electro-Separation Systems (Whatman GmbH 2007).

Die nach einer Gelelektrophorese über UV-Shadowing (siehe 3.3.3.2) identifizierte Nucleinsäurebande wurde mit Hilfe eines Skalpellts ausgeschnitten, das Gelstück zerkleinert und in der Elutionskammer vor der BT2-Membran platziert. Die Gelstücke wurden mit Puffer überschichtet, 1 ml Puffer wurde zudem in die Falle zwischen die BT1- und BT2-Membranen pipettiert. Die Elution erfolgte über Nacht (ÜN) bei einer Spannung von 100 V. Vor der anschließenden Präzipitation (siehe 3.3.5) der Nucleinsäuren wurde für 20 s eine umgekehrte Spannung von 200 V angelegt, um an der BT1-Membran haftende Nucleinsäuren zu lösen. Diese Methode eignet sich prinzipiell auch für die Elution von Nucleinsäuren aus Agarosegelen.

3.3.5 Alkoholpräzipitation

Um Nucleinsäuren zu konzentrieren und aufzureinigen, können sie aus wässriger Lösung durch Zusatz von monovalenten Salzen und Alkohol gefällt werden, während Salze und andere Verunreinigungen in Lösung bleiben. Dabei entfernt der Alkohol die Hydrathülle der Nucleinsäuren und exponiert so die negativ geladenen Phosphatgruppen. Gegenionen wie Na^+ binden an die geladenen Gruppen und reduzieren die Abstoßungskräfte zwischen den Polynucleotidketten, so dass sich ein Präzipitat bildet (Sambrook & Russell 2001).

Die Nucleinsäure-Lösung wurde dazu mit 1/10 des Volumens einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) und dem 2,5-fachen Volumen Ethanol versetzt und für 30 min bei -80°C präzipitiert. Anschließend wurde 30 min bei $16.000 \times g$ und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet zweimal mit jeweils 1 ml 80 % Ethanol gewaschen, wobei nach jedem Waschschrift 15 min zentrifugiert wurde ($16.000 \times g$, 4°C). Das Pellet wurde im Anschluss 5 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

Für Ansätze mit großem Volumen ($500 \mu\text{l}$ - 1 ml) wurde eine Natriumacetat-Isopropanol-Fällung durchgeführt. Die Präzipitation verläuft analog der Ethanol-Fällung, jedoch wird zur Fällung der Nucleinsäure das einfache Volumen Isopropanol zugesetzt. Isopropanol fällt die Nucleinsäuren effektiver als Ethanol, jedoch lassen sich Reste des Alkohols weniger gut entfernen (Mülhardt 2006). Das Pellet wurde zweimal mit 80 % Ethanol gewaschen.

Bei sehr kleinen Nukleinsäuremengen kann die Präzipitation aufgrund der schlechten Fällungseffizienz durch Zugabe von Glycogen (20 µg) verbessert werden. Da Glycogen jedoch die Bindungseigenschaften der Nukleinsäure beeinflussen kann (Gaillard & Strauss 1990), sollte es nur beigefügt werden, wenn die Nukleinsäuren nicht direkt in Bindungsexperimente (z. B. SELEX) eingesetzt werden.

3.3.6 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Entfernung von Proteinkontaminationen aus Nukleinsäurelösungen wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dazu wurde die aufzureinigende Nukleinsäurelösung mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und 3 min kräftig gemischt. Phenol und Chloroform führen zu einer Denaturierung von Proteinen, die sich in der Interphase ansammeln. Isoamylalkohol verhindert das Schäumen und inhibiert sehr effizient Ribonukleasen (RNasen). Durch Zugabe von 0,1 % Hydroxychinolin ist die einfache Identifizierung der organischen Phase möglich. Der pH-Wert des Phenol-Chloroform-Gemisches lag bei der DNA-Aufreinigung bei pH 7,5 - 8; für RNA wurde in Wasser gesättigtes Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol mit einem pH-Wert von 4,5 - 5 verwendet. Durch einen niedrigen pH-Wert bei der RNA-Aufreinigung sammelt sich die DNA eher in der Interphase an, so dass die DNA-Kontamination im RNA-Eluat vermindert wird. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 16.000 x g und RT wurde die wässrige Phase abgenommen, mit dem doppelten Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt und erneut 3 min kräftig gemischt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 16.000 x g wurde wiederum die wässrige Phase abgenommen und die Nukleinsäure, wie unter „Alkoholpräzipitation“ (siehe 3.3.5) beschrieben, präzipitiert.

3.3.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

3.3.7.1 Konzentrationsbestimmung mittels Absorptionsspektroskopie

Aufgrund der Proportionalität von Lichtabsorption und Konzentration ($I = I_0 \cdot 10^{-\epsilon dc}$, Lambert-Beersches Gesetz), kann die Konzentration von Nukleinsäurelösungen photometrisch bestimmt werden. Hierfür wird die Absorption bei 260 nm gemessen, was dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäurebasen entspricht. Die Extinktionskoeffizienten von Nukleinsäuren setzen sich aus der Summe der Extinktionskoeffizienten der einzelnen Nukleotide zusammen. Da es für große Moleküle nur eine geringe Fehlerabweichung bedeutet, werden hier anstelle der Aufsummierung der einzelnen Koeffizienten Durchschnittsextinktionskoeffizienten verwendet. Zur Berechnung der Nukleinsäuremenge gelten dann näherungsweise folgende Gleichungen (Sambrook & Russell 2001):

$$\text{dsDNA:} \quad 1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\text{ssDNA:} \quad 1 \text{ OD}_{260} = 33 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

$$\text{RNA:} \quad 1 \text{ OD}_{260} = 40 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

In dieser Arbeit wurde zur Konzentrationsbestimmung 1 μ l Nukleinsäurelösung im NanoDrop ND-1000 spektrometrisch vermessen.

3.3.7.2 Konzentrationsbestimmung mittels Agarosegel

Proben, die neben der gewünschten Nukleinsäure noch weitere Nukleinsäuren wie Primer oder Nukleotide enthalten, wodurch eine Quantifizierung über UV-Messung nicht möglich ist, wurden über eine Gelabschätzung quantifiziert. Dazu wird ein DNA-Größenmarker, bei dem die Menge der einzelnen Fragmente bekannt ist, neben der zu quantifizierenden Probe auf ein Gel aufgetragen. Durch Vergleich der Bandenintensitäten wird die DNA-Menge der Probe abgeschätzt.

Diese Methode wurde hauptsächlich zur Abschätzung der DNA-Menge nach Amplifikation über PCR eingesetzt.

3.3.8 Nukleolytische Spaltung von Nukleinsäuren

3.3.8.1 Typ II-Restriktionsenzyme

Für Restriktionen wurden etwa 500 ng aufgereinigte Plasmid-DNA (siehe 3.4.5) und 10 U Restriktionsenzym in einem Volumen von 10 μ l eingesetzt. Die Ansätze wurden 2,5 h bei den vom Hersteller angegebenen Bedingungen inkubiert.

3.3.8.2 S1-Nuklease

S1-Nuklease aus *Aspergillus oryzae* spaltet sequenzunabhängig Phosphodiesterbindungen in einzelsträngiger DNA (und RNA), wobei Oligonukleotid-5'-Phosphate freigesetzt werden. Doppelsträngige DNA, RNA sowie DNA-RNA-Hybride sind unempfindlich gegenüber einem Nukleaseangriff, sofern kein großer Überschuss an Enzym verwendet wird (Sambrook & Russell 2001).

Mit Hilfe der S1-Nuklease lassen sich unterschiedliche Diversitäten komplexer DNA-Gemische vergleichen. Hintergrund ist hier die Annahme, dass je größer die Anzahl verschiedener doppelsträngiger DNA in einem komplexen Gemisch ist, desto unwahrscheinlicher ist es, dass sich komplementäre Sequenzen nach Denaturierung "finden" (Britten & Kohne 1968; Arstila 2006).

Für den *Diversity assay for nucleic acids* (DANA) wurden 200 ng PCR-Produkt in 54 μ l 1x S1-Nuklease-Puffer 3 min bei 98°C denaturiert. Nach Abkühlung auf 65°C und 5-minütiger Inkubation wurde 1 U S1-Nuklease in einem Volumen von 1 μ l in 1x S1-Nuklease-Puffer zum Ansatz gegeben. Als Negativkontrolle wurde 1 μ l S1-Nukleasepuffer ohne Enzym zum Reaktionsansatz pipettiert. Nach 30-minütiger Inkubation bei 65°C wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 2 μ l 0,5 M EDTA gestoppt und 9 μ l des Ansatzes über Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

3.3.9 Klonierung

Um die unterschiedlichen Sequenzen in der angereicherten Bibliothek zu vereinzeln und zu analysieren, wurden die PCR-Produkte nach der Selektion in einen Vektor kloniert und anschließend durch Transformation in Bakterien separiert.

Es wurde die Methode der TA-Klonierung eingesetzt. Hierbei wird die matrizenunabhängige terminale Transferaseaktivität der Taq-Polymerase genutzt, die keine Fragmente mit glatten Enden produziert, sondern einen unspezifischen Überhang von einer Base (Clark 1988), meist eines Desoxyadenylats (Holton & Graham 1991; Hu 1993). Diese lassen sich leicht in einen Vektor klonieren, der eine Klonierungsstelle mit zwei freien Thymidin-Überhängen besitzt. In dieser Arbeit wurde das pGEM[®]-T Vector System I von Promega verwendet (siehe 3.3.10).

3.3.10 Ligation

Ligationen wurden mit Hilfe der T4-DNA-Ligase durchgeführt. Dieses Enzym knüpft unter ATP-Verbrauch Phosphodiesterbindungen zwischen direkt benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphat-Enden in doppelsträngiger DNA. Die Reaktionen wurden in einem Volumen von 20 µl durchgeführt und erfolgten 1 - 3 h bei RT oder ÜN bei 4°C. Dabei wurden 50 ng Vektor pGEM[®]-T mit einem drei- bis sechsfachen molaren Überschuss an aufgereinigtem PCR-Fragment (siehe 3.3.4.1) sowie 3 U Ligase eingesetzt.

3.4 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN

3.4.1 Herstellung kompetenter Zellen

Als Kompetenz wird die Fähigkeit von Zellen bezeichnet, fremde DNA aufzunehmen. Im Gegensatz zur Konjugation (direkter Kontakt zwischen Bakterien) oder zur Transduktion (über Bakteriophagen) wird bei der Transformation freie, lösliche DNA in ein Empfängerbakterium übertragen. Kompetente Zellen wurden mittels der Calciumchlorid-Methode (Hanahan 1983) hergestellt.

Dafür wurde zunächst eine Übernachtskultur von 10 ml LB mit einem Aliquot von 10 µl *E. coli* JM109 angeimpft und bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 100 ml LB mit 5 ml der Übernachtskultur angeimpft und die Zellen bis zu einer Dichte von OD₆₀₀ = 0,4 bis 0,5 angezüchtet. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen 7 min bei 2500 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 25 ml eiskaltem 0,1 M CaCl₂ unter Vermeidung von Luftblasenentwicklung vorsichtig resuspendiert und 30 min auf Eis gestellt. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 12,5 ml eiskaltem 0,1 M CaCl₂ resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert, wiederum zentrifugiert (7 min, 2500 x g, 4°C) und das Pellet anschließend in 2 ml 0,1 M

CaCl₂/30 % Glycerin resuspendiert. Aliquots von 100 µl wurden in vorgekühlte Reaktionsgefäße pipettiert und die Zellen bei -80°C gelagert.

Die Überprüfung der Kompetenz erfolgte durch Transformation von 10 ng eines Plasmids mit Ampicillin-Resistenz und Ausplattieren von 50 µl auf ampicillinhaltige LB-Platten (100 µg/ml). Die Zahl der transformierten Bakterien pro µg transformierter DNA sollte mindestens $1 \cdot 10^5$ betragen (Sambrook & Russell 2001).

3.4.2 Transformation

Für jede Transformation wurden 100 µl kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut. Bei Transformationen von Ligationen (siehe 3.3.10) wurde der halbe Ligationsansatz (10 µl) des zu transformierenden Plasmids zur Bakteriensuspension pipettiert und vorsichtig gemischt. Die Zellen wurden 30 min auf Eis inkubiert, 90 s einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und anschließend 5 min auf Eis gestellt. 900 µl LB-Medium wurden zugegeben und der Ansatz 60 min bei 37°C und 500 rpm geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde anschließend 10 s bei 16.000 x g zentrifugiert, 800 µl des Überstands verworfen und die Bakterien nach Resuspension des Pellets auf LB-Agar mit Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert. Die Platten wurden ÜN im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

3.4.3 Übernachtkulturen

Nach der Transformation wurden zur Amplifikation von Plasmiden einzelne Bakterienkolonien von der Agarplatte steril in jeweils 2,5 ml LB-Medium, das mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt war, überführt. Die Suspension wurde ÜN bei 37°C und 200 rpm inkubiert.

3.4.4 Gefrierkulturen

Um transformierte Bakterienkulturen für weitere Experimente aufzubewahren, wurden Glycerin-Stammkulturen angelegt. Dazu wurden 600 µl einer Übernachtkultur mit 400 µl 100 % sterilem Glycerin vermischt und in Kryoröhrchen bei -80°C gelagert.

3.4.5 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte nach Herstellerangaben aus 2 ml Übernachtkultur mit dem QIAprep Spin Miniprep Kits von Qiagen.

3.5 ANALYTISCHE METHODEN

3.5.1 Dünnschichtchromatographie

Chemische Kopplungen wurden mit Hilfe der DC auf Alugram Sil G/UV₂₅₄-Platten überprüft. Bei diesem physikalisch-chemischen Verfahren werden Verbindungen aufgrund ihres unterschiedlichen Laufverhaltens getrennt.

Für analytische DCs wurden jeweils 2 µl der Edukt- bzw. Produkt-Lösungen punktförmig etwa 1 cm oberhalb des unteren Rands auf einer mit Kieselgel beschichteten Dünnschichtchromatographie-Platte (stationäre Phase) aufgetragen. Nach Trocknen der Proben wurde die Platte senkrecht in eine DC-Kammer gestellt, die mit etwa 100 ml Lösungsmittelgemisch (mobile Phase) befüllt war. Für einen gleichmäßigen Lauf muss darauf geachtet werden, dass der Luftraum in der Kammer mit Lösungsmitteldampf gesättigt ist. Nachdem die Lösungsmittelfront etwa drei Viertel der Plattenhöhe erreicht hatte, wurde die Platte getrocknet und unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm analysiert.

Durch Quotientenbildung aus Laufweite der Probe und der Laufront des Lösungsmittels kann der Retentionsfaktor (R_f -Wert) berechnet werden. Dieser ist substanzspezifisch und liefert einen weiteren Hinweis auf den Erfolg der Reaktion.

Für präparative DCs wurden etwa 50 µl der Reaktionslösung 1 cm oberhalb des unteren Rands der DC-Platte in einer dünnen Linie aufgetragen. Der Probenlauf wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Anschließend wurde die Produktbande mit Hilfe eines Spatels ausgekratzt, die Kieselgelstücke zerkleinert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Überschichtung mit Ethanol wurde das Produkt unter Schütteln (450 rpm, 23°C) ÜN aus dem Kieselgel extrahiert. Zur Abtrennung der festen Bestandteile wurde die Lösung anschließend 1 min bei 16.000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

3.5.2 Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie

Zur Bestimmung der Bindungseigenschaften der isolierten Aptamere wurde die Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (*surface plasmon resonance*, SPR) eingesetzt.

3.5.2.1 Bindungskonstanten

Die Wechselwirkungen zwischen zwei Molekülen A und B werden über verschiedene Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten beschrieben, die in Bezug zueinander stehen.

Für das Modell einer 1:1-Bindung gilt die in Gleichung 1 dargestellte Reaktion zwischen den Edukten A und B zum Produkt AB, die solange abläuft, bis sie einen Gleichgewichtszustand erreicht hat. Dieser ist erreicht, wenn sich die gegenläufigen Reaktionen von Komplexbildung und -zerfall ausgleichen.



Die Geschwindigkeit der Komplexbildung wird dabei durch die Geschwindigkeitskonstante k_a (k_{on}) beschrieben, die des Zerfalls durch k_d (k_{off}). Im Gleichgewichtszustand ergeben sich aus dem Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten die Werte für die Assoziations- (K_A) bzw. Dissoziationskonstanten (K_D) (Gleichung 2).

Gleichung 2:

$$K_A = \frac{k_a}{k_d} = \frac{[AB]}{[A]*[B]} \quad K_D = \frac{k_d}{k_a} = \frac{[A]*[B]}{[AB]}$$

Anders ausgedrückt, beschreiben die Gleichgewichtskonstanten das Verhältnis von Produkt zu Edukt im Gleichgewichtszustand.

Die Einheit der Assoziations- oder Affinitätskonstanten wird in l/mol angegeben. Je größer der Wert der Assoziationskonstanten (K_A) ist, desto stärker ist die Affinität zwischen A und B. Der Kehrwert von K_A ist die Dissoziationskonstante (K_D) mit der Dimension mol/l. Hier gilt, je kleiner der K_D -Wert, desto stärker ist die Bindung.

3.5.2.2 Bestimmung von Bindungskonstanten über SPR

Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen können mit Hilfe der biomolekularen Interaktionsanalyse (BIA) auf Biacore-Geräten untersucht und die Bindungsparameter (Kinetik, Affinität) bestimmt werden. Diese Methode beruht auf der Messung der Oberflächenplasmonenresonanz, eines Phänomens, das bei der Totalreflexion von Licht an der Grenzfläche zwischen einem Metall und einem Nichtleiter auftritt (Alves et al. 2005, Liedberg et al. 1995).

Wird polarisiertes Licht aus einem Medium mit höherem Brechungsindex (z. B. Glas) auf ein Medium mit niedrigerem Brechungsindex (z. B. Wasser) gestrahlt, kommt es an der Grenzfläche oberhalb eines kritischen Winkels zur Totalreflexion. Auch wenn kein Licht mehr in das weniger dichte Medium übergeht, geht doch das elektrische Feld der Photonen als so genannte Schwindende Welle (*evanescent wave*) über die reflektierende Fläche hinaus (Abbildung 8).

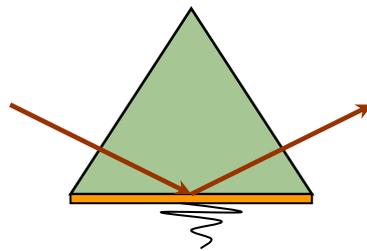


Abbildung 8: Entstehung einer Schwindenden Welle. Bei der Totalreflexion an einer metallbeschichteten Oberfläche verbreitet sich eine Schwindende Welle in das weniger dichte Medium auf der nicht beleuchteten Seite.

Wird diese Grenzfläche nun mit einer dünnen Metallschicht beschichtet, kann das elektrische Feld mit delokalisierten Elektronen in dieser Metalloberfläche interagieren, sofern die Energien übereinstimmen. Wenn dies passiert, werden die eingestrahnten Photonen absorbiert bzw. in Oberflächenplasmonen (elektromagnetische Wellen, die parallel zur Grenzfläche propagieren) umgewandelt (Kretschmann & Raether 1968). Man erhält Oberflächenplasmonenresonanz und es kommt zur Auslöschung eines Teils des reflektierten Lichts in einem für das aufgedampfte Metall spezifischen Winkel. Dieser Winkel ist neben der Wellenlänge des eingestrahnten Lichts außerdem abhängig von den Brechungsindices der Medien auf beiden Seiten des Metallfilms.

Bei der biomolekularen Interaktionsanalyse werden alle Parameter (Metall, Brechungsindex des dichteren Mediums, Wellenlänge des Lichts) konstant gehalten, so dass SPR nur noch vom Brechungsindex des Mediums auf der dem Licht abgewandten Seite abhängig ist. Dieser Brechungsindex wird wiederum durch die Konzentration der gelösten Stoffe an der Oberfläche beeinflusst. Veränderungen der Oberflächenkonzentration gehen deshalb mit Winkelveränderungen einher. Von der Detektionseinheit werden diese Winkelveränderungen registriert und in das so genannte Resonanzsignal überführt, welches letztlich dargestellt wird (Abbildung 9).

Bei Biacore-Geräten ist ein Glasprisma mit einer Goldoberfläche beschichtet. An diese wird über eine Dextranmatrix einer der beiden Bindungspartner (Ligand) immobilisiert. Der zweite Bindungspartner (Analyt) befindet sich in Lösung und wird über eine Flusszelle am Liganden vorbeigeleitet. Kommt es zur Bindung, ändern sich die Konzentrationsverhältnisse an der Oberfläche und somit der Winkel des ausgelöschten Bereichs. Dabei ist das Ausmaß der Winkeländerung direkt von der Masse auf der Oberfläche befindlicher Moleküle abhängig.

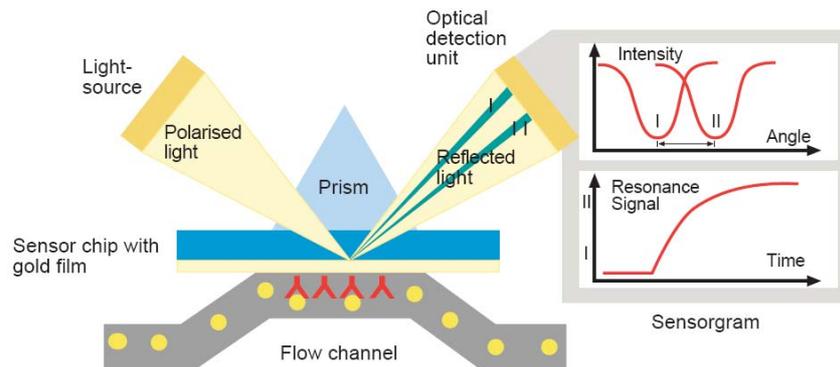


Abbildung 9: Aufbau des SPR-Detektionssystems und sein Zusammenhang mit dem Resonanzsignal. SPR wird als starkes Abfallen der Intensität des reflektierten Lichts registriert, wobei der Winkel vom Brechungsindex des Mediums in der Flusszelle abhängt. Dieser wiederum ist abhängig von der Dichte. Der SPR-Winkel verschiebt sich von (I) nach (II), wenn Biomoleküle an die Goldoberfläche binden (Biacore Handbook 2001).

Wird der Verlauf des Resonanzsignals gegen die Zeit aufgetragen, erhält man ein so genanntes Sensorgramm. Die Stärke des Resonanzsignals wird dabei in Resonanzeinheiten (RU) angegeben, wobei es sich um absolute Zahlenwerte handelt. Für die Auswertung der Daten ist jedoch nur die Differenz der Resonanzeinheiten von Bedeutung. Ein klassisches Sensorgramm ist in Abbildung 10 dargestellt.

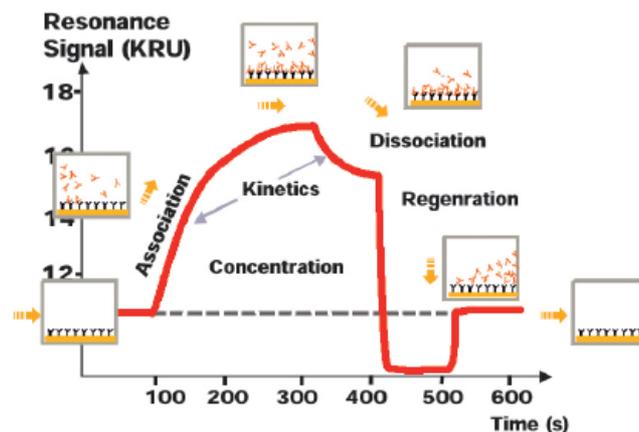


Abbildung 10: Sensorgramm. Der Analyt bindet während der Probeninjektion an die Oberfläche und dissoziiert, sobald die Probe durch Puffer ersetzt wird. Auf der Ordinate ist das SPR-Signal in Resonanzeinheiten (RU) aufgetragen, auf der Abszisse die Echtzeit in Sekunden (Biacore Handbook 2001).

3.5.2.3 Kopplung des Liganden Daunorubicin an Streptavidin Sensor-Chips

Der Sensor-Chip ist der Signalüberträger bei der biomolekularen Interaktionsanalyse. Er besteht aus einem Trägerglas, auf das eine dünne Goldoberfläche aufgebracht ist. Diese wiederum ist über eine Linkerschicht mit einer Carboxymethyl-dextran-Matrix beschichtet, auf die in Abhängigkeit vom jeweiligen Sensor-Chip die zur Immobilisierung benötigten Gruppen gekoppelt sind. Im Falle des Streptavidin-Sensor-Chips handelt es sich um Streptavidin, das die nicht kovalente Kopplung von biotinylierten Molekülen erlaubt.

Die Bindungsanalysen dieser Arbeit wurden an einem Biacore X-Gerät bei einer Temperatur von 25°C durchgeführt. Als Laufpuffer diente BP mit 0,005 % Tween 20. Die Kopplung des Liganden Daunorubicin an den Sensor-Chip erfolgte bei einer Flussrate von 5 µl/min, Pufferinjektionen und Spülen der Flusszelle bei einer Flussrate von 30 µl/min. Zwischen allen Arbeitsschritten wurde die Flusszelle zweimal über den Befehl „Wash IFC“ mit Laufpuffer gewaschen.

Um biotinyliertes Daunorubicin auf der Chip-Oberfläche zu immobilisieren, wurde die Flusszelle zunächst mit Laufpuffer gespült. Nachdem das Signal stabil war, wurde der zweite der beiden Kanäle (Messkanal) zweimal mit je 30 µl 1 M NaCl, 50 mM NaOH konditioniert und anschließend durch Injektion von 10 µM biotinyliertem Daunorubicin bei einer Flussrate von 5 µl/min mit 55 - 90 RU beladen. Auch der Referenzkanal (Kanal 1) wurde durch zweimalige Injektion von 30 µl 1 M NaCl, 50 mM NaOH konditioniert. Die Flusszelle wurde bis zur Bindungsanalyse der Aptamere mit Laufpuffer gespült.

3.5.2.4 Bestimmung der Bindungsparameter der Aptamere

Zur Bestimmung von Bindungskonstanten werden etwa sechs bis acht Sensorgramme mit verschiedenen Analytkonzentrationen aufgenommen.

Die Bindungsexperimente wurden bei einer Flussrate von 30 µl/min durchgeführt. Aptamere wurden dazu in Laufpuffer in Konzentrationen von 500 nM, 400 nM, 300 nM, 250 nM, 160 nM, 130 nM, 100 nM und 70 nM gelöst und jeweils 75 µl in 150 s-Injektionen mit einer 300 s-Verzögerung injiziert. Die Chipoberfläche wurde durch Injektion von 30 µl 5 M Harnstoff in Laufpuffer regeneriert.

Die Auswertung der Sensorgramme und die Bestimmung der Bindungsmodelle und -konstanten erfolgte über „BIAevaluation Software Version 3.1“ (Biacore, Uppsala, Schweden).

3.5.3 Mikrotiterplatten-Bindungsassay

3.5.3.1 Fluorescence dye-linked aptamer assay (FLAA)

Die Anreicherung des DNA-Pools während der SELEX sowie die Bindungseigenschaften und Spezifitäten der isolierten Aptamere wurden mit Hilfe des *Fluorescence dye-linked aptamer assays* (FLAA) (Wochner & Glökler 2007) untersucht.

Bei diesem Assay wird das biotinylierte Zielmolekül auf einer mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte immobilisiert und mit der zu analysierenden ssDNA inkubiert. Während nicht bindende Sequenzen in anschließenden Waschschrinen entfernt werden, können Binder mit dem ssDNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff OliGreen auf der Platte detektiert werden. Der Farbstoff fluoresziert in Abwesenheit von DNA nicht. Der Aufbau ist in Abbildung 11 dargestellt.

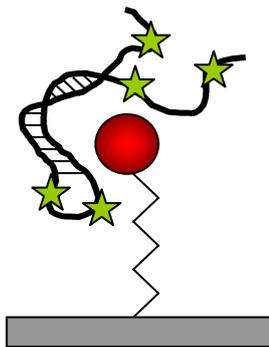


Abbildung 11: Aufbau des *Fluorescence dye-linked aptamer assay* (FLAA). Das biotinylierte Daunorubicin (rot) wird über einen Spacer auf einer streptavidinbeschichteten Mikrotiterplatte (grau) immobilisiert. Nach Inkubation mit ssDNA und anschließenden Waschschrinen bleiben bindende DNAs (schwarz) am Target und können mit dem einzelstrangspezifischen Fluoreszenzfarbstoff OliGreen (grüne Sterne) nachgewiesen werden.

Gemäß der vom Hersteller angegebenen Bindungskapazität wurden 125 pmol biotinyliertes Daunorubicin in einem Volumen von 100 μ l BP-T auf einer streptavidinbeschichteten Mikrotiterplatte immobilisiert (30 min, RT, 100 rpm). Nachdem die Wells dreimal mit jeweils 300 μ l BP-T gewaschen worden waren, wurden sie mit 200 μ l 52 μ M Biotin 30 min bei 100 rpm und RT geblockt. Als Negativkontrolle wurde zusätzlich für jede zu untersuchende Probe ein Well mit Biotin geblockt.

Parallel dazu wurden jeweils 200 ng ssDNA in einem Volumen von 100 μ l BP-T 3 min bei 90°C denaturiert und anschließend sofort 5 min auf Eis gestellt, gefolgt von einer kurzen Inkubation bei RT. Die DNA wurde in die erneut gewaschenen Wells pipettiert und 1 h bei 100 rpm und RT inkubiert. Nach nochmaligem Waschen (dreimal mit jeweils 300 μ l BP-T) wurden jeweils 150 μ l OliGreen, in einer Verdünnung von 1:200 in TE, automatisch durch das verwendete Fluoreszenzspektrometer

zugegeben und die Fluoreszenz nach 10-minütiger Inkubation bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 527 nm gemessen.

3.5.3.2 Enzyme-linked aptamer assay (ELAA)

Mit dem *Enzyme-linked aptamer assay* (ELAA) (Baldrich *et al.* 2004) kann die Funktionalität von Aptameren nach Immobilisierung überprüft werden.

Für diesen Assay wird biotinyliertes Aptamer an eine streptavidinbeschichtete Mikrotiterplatte immobilisiert und mit dem Target, das über Biotin an Neutravidin-HRP gekoppelt ist, inkubiert. Nach anschließenden Waschschrinen wird die Bindung des Targets anhand der Grünfärbung quantifiziert, die beim Umsatz von zugegebenem Substrat ABTS durch HRP entsteht (Abbildung 12).

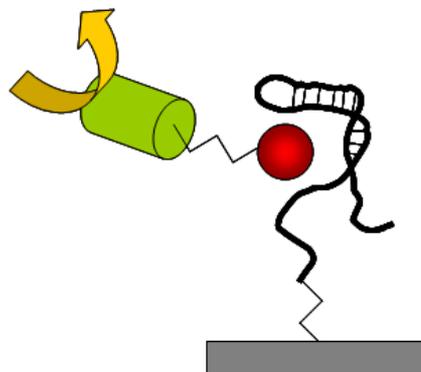


Abbildung 12: Aufbau des *Enzyme-linked aptamer assay* (ELAA). Das biotinylierte Aptamer (schwarz) wird über einen Spacer auf einer streptavidinbeschichteten Mikrotiterplatte (grau) immobilisiert. Nach Inkubation mit an Neutravidin-HRP (grün) gekoppeltem Daunorubicin (rot) wird die Bindung durch enzymatischen Umsatz von ABTS nachgewiesen.

100 pmol 5'-biotinyliertes Aptamer wurden in einem Volumen von 100 μ l BP-T auf eine streptavidinbeschichtete Mikrotiterplatte gekoppelt (30 min, RT, 100 rpm). Nachdem die Wells dreimal mit jeweils 300 μ l BT-T gewaschen worden waren, wurden sie mit jeweils 400 μ l 1x Rotiblock 4 h bei 100 rpm und RT geblockt. Parallel dazu wurden pro Ansatz 10 pmol biotinyliertes Daunorubicin mit 2,5 μ g Neutravidin-HRP in einem Volumen von 100 μ l BP-T umgesetzt, um eine vollständige Bindung des Targets zu garantieren. Die Bindungskapazität von Neutravidin-HRP ist mit 5 μ g Biotin/mg Protein angegeben, was 20,5 pmol Biotin pro μ g Protein entspricht. Die Kopplung wurde 30 min bei RT und 100 rpm im Dunkeln durchgeführt. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend viermal mit jeweils 300 μ l BP-T gewaschen, das Daunorubicin-Neutravidin-HRP-Konjugat zugegeben und 1 h bei 100 rpm und RT auf einem Schwenkschüttler inkubiert. Nach erneutem Waschen (viermal mit jeweils 300 μ l BP-T) wurden jeweils 200 μ l ABTS zugegeben und die Färbung nach etwa 5-minütiger Inkubation bei 405 nm in einem Mikrotiterplatten-Spektrophotometer vermessen.

3.5.4 Nitrocellulose-Teststreifen

Zum Nachweis von Daunorubicin in Lösungen wurde ein kompetitiver Schnelltest entwickelt, bei dem der Nachweis des Anthracyclins über ein laterales Flusssystem geschieht.

Das Testsystem wurde auf Nitrocellulosestreifen aufgebaut. Diese Streifen bestehen aus einem flexiblen Kunststoffstreifen, auf dem die verschiedenen Komponenten des Testsystems fixiert sind (Abbildung 13). In Fließrichtung am Anfang des Streifens befindet sich das Eintauchvlies, das für den Probenlauf in Pufferlösung getaucht wird. Daran schließt sich das Probenvlies an, auf welches enzymmarkiertes Aptamer bzw. Aptamer-Daunorubicin-Gemisch aufgetragen wird. Dahinter folgt die Nitrocellulosemembran. Hierauf sind, in Fließrichtung nacheinander, zwei Banden aufgetragen. In der ersten Bande (Probenfeld) ist der biotinylierte Analyt Daunorubicin an die Membran gebunden. Wandern freie Aptamere an dieser Bande vorbei, werden sie dort gebunden und führen zu einer Färbung. Bereits mit freiem Daunorubicin besetzte Aptamere werden weiter über die Membran transportiert. Daraus folgt, dass je stärker die Probenbande erscheint, desto geringer ist die Konzentration an Analyten in der Probe. In der zweiten Bande (Kontrollfeld) ist ein zur Aptamersequenz komplementäres Oligonukleotid immobilisiert, das als interne Kontrolle für einen erfolgreichen Probenlauf dient. Hier muss zur Auswertbarkeit des Tests immer eine Färbung auftreten. In Fließrichtung hinter der Membran befindet sich das Saugvlies. Hier wird die durch die Membran gezogene Lösung aufgesaugt, damit ein größeres Volumen über die Membran gezogen werden kann. Der Nachweis erfolgte enzymatisch durch Umsatz von 4-Chloro-1-Naphthol (Sambrook & Russell 2001).

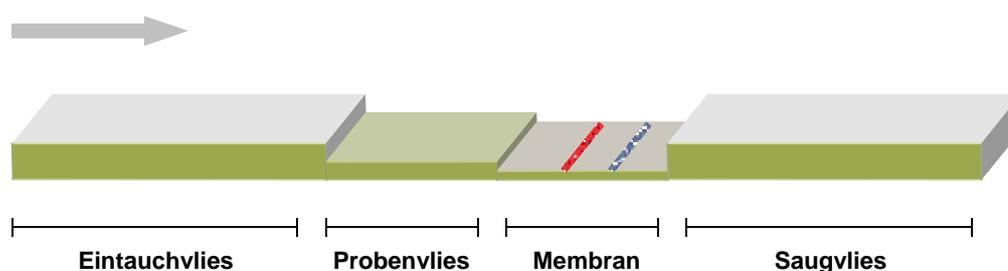


Abbildung 13: Aufbau des Nitrocellulose-Teststreifens. Die Fließrichtung verläuft von links nach rechts. Auf dem Membranabschnitt findet sich in Laufrichtung vorne das Probenfeld (rot), gefolgt vom Kontrollfeld (blau).

Zunächst wurden jeweils 100 pmol biotinyliertes Daunorubicin und 100 pmol biotinylierter Primer C in einem Volumen von 5 μ l BP-T an 100 pmol Neutravidin gekoppelt (30 min, RT). Bei Primer C handelt es sich um eine zum 5'-Ende des Aptamers komplementäre Sequenz. Die Daunorubicin- und Primer C-Neutravidin-Konjugate wurden in zwei Banden (Proben- bzw. Kontrollfeld) auf den Nitrocellulosemembranbereich des Teststreifens aufgetragen. Zur Kontrolle, dass das Aptamer nicht unspezifisch an immobilisiertes Protein bindet, wurde ein zusätzlicher Teststreifen vorbereitet, bei dem

im Probenfeld 100 pmol ungekoppeltes Neutravidin aufgetragen wurden. Die getrockneten Teststreifen wurden ÜN in 1x Rotiblock geblockt, anschließend dreimal 10 min in 20 ml BP-T gewaschen und im Brutschrank getrocknet (90 min, 37°C). Parallel wurden 50 pmol 5'-biotinyliertes Daunorubicin-Aptamer in einem Volumen von 5 µl BP-T an 50 pmol Neutravidin-HRP gekoppelt (30 min, RT). Zu Aptameren, mit deren Hilfe Daunorubicin detektiert werden sollte, wurde Anthracyclin-Lösung gegeben – für den *proof of principle* wurden 50 pmol in einem Gesamtvolumen von 10 µl BP-T eingesetzt, was einem Verhältnis von 1:1 von Aptamer zu Daunorubicin entspricht. Nach 15-minütiger Inkubation wurden die Aptamere bzw. das Aptamer-Daunorubicin-Gemisch als Streifen auf das Probenvlies aufgetragen. Anschließend wurde das Eintauchvlies des Teststreifens 20 s senkrecht in BP-T gehalten und der Streifen für den Probenlauf flach auf die Tischplatte gelegt. Nachdem die Lauffront mindestens drei Viertel des Saugvlies durchwandert hatte, wurde die Nitrocellulosemembran ausgeschnitten, durch vorsichtiges Fönen getrocknet und in 1 ml 4-Chloro-1-Naphthol-Arbeitslösung inkubiert, bis ein deutlicher Farbumschlag sichtbar war (20 s - 1 min). Überschüssiges Substrat wurde durch Spülen mit Wasser entfernt.