

5 DISKUSSION

5.1 HALBAUTOMATISCHE *IN VITRO*-SELEKTION

Aptamere haben aufgrund ihrer Eigenschaft, unterschiedlichste Moleküle mit hoher Affinität und Spezifität zu binden, ein immenses Anwendungspotenzial. Die Methode der SELEX, die zur Isolierung von Aptameren genutzt wird, ist jedoch ein repetitiver und normalerweise sehr zeitaufwändiger Prozess. Um diesen zu beschleunigen, wurden unterschiedliche Varianten der *in vitro*-Selektion entwickelt, beispielsweise die CE (*capillary electrophoresis*)-SELEX (Mendonça & Bowser 2004a, b; Mosing *et al.* 2005; Mallikaratchy *et al.* 2006; Tang *et al.* 2006) und, vor allem, die Automatisierung. Letztere wurde erstmalig von Cox *et al.* für die Selektion von RNA-Aptameren an magnetischen Partikeln beschrieben (Cox *et al.* 1998). Dieser Prozess wurde von verschiedenen Gruppen modifiziert und optimiert (Cox & Ellington 2001; Blind *et al.* 2002; Cox *et al.* 2002a; Cox *et al.* 2002b; Rajendran & Ellington 2003). Ein automatisierter Selektionsprozess, der nicht auf magnetischen Partikeln beruht, wurde sowohl für RNA (Eulberg *et al.* 2005a) als auch für DNA (Zhang *et al.* 2000) beschrieben.

Eine Selektion an magnetischen Partikeln bietet zahlreiche Vorteile: So haben die hier verwendeten Beads mit einem Durchmesser von etwa 10 µm ein günstiges Verhältnis von Oberfläche zu Volumen, wodurch das Zielmolekül der Selektion in hoher Dichte präsentiert werden kann. Sie sind einfach handhabbar und für eine Automatisierung gut geeignet. Durch eine solche wird eine Parallelisierung, Beschleunigung und Reproduzierbarkeit ermöglicht, die manuelles Arbeiten nicht gewährleisten kann. Wird das Target über Biotin an Streptavidin-Beads immobilisiert, ist außerdem eine einfache Übertragung auf andere Anwendungen wie Biacore (siehe 4.3.5.1) oder Mikrotiterplatten-Assays (siehe 4.2.1 und 4.3.5.2) möglich.

Da im Zuge dieser Arbeit Aptamere gegen Daunorubicin isoliert werden sollten, die später zu Analyse von Abwasser oder Serumproben eingesetzt werden könnten, wurde die Selektion mit einzelsträngiger DNA durchgeführt. Diese ist, im Vergleich zu RNA, aufgrund der fehlenden 2'-OH-Gruppe resistenter gegenüber nukleolytischem Abbau und somit stabiler. RNA bietet durch die zusätzliche Hydroxylgruppe zwar möglicherweise eine größere Strukturvielfalt, kann jedoch bei biologischen Proben nur nach chemischer Modifikation (Green *et al.* 1995; Jellinek *et al.* 1995; Lin *et al.* 1996; Kubik *et al.* 1997; Pagratis *et al.* 1997; Schmidt *et al.* 2004; Burmeister *et al.* 2005; Burmeister *et al.* 2006) oder unter Anwendung alternativer Strategien, beispielsweise der Spiegelmer-Technologie (Klussmann *et al.* 1996; Nolte *et al.* 1996), verwendet werden.

Während dieser Arbeit wurde die *in vitro*-Selektion an magnetischen Partikeln für DNA-Aptamere an den Roboter BioSprint 15 angepasst. Dieses Gerät transferiert ausschließlich die Beads zwischen den einzelnen Reaktionsgefäßen und nicht die Beadsuspension, wodurch Aerosolbildung und eine dadurch verursachte Kreuzkontamination verhindert werden. Da außerdem die targetbindenden DNA-Moleküle zusammen mit den magnetischen Partikeln übertragen werden, können solche DNA-Spezies entfernt werden, die unspezifisch an die Plastikoberfläche der Reaktionsgefäße binden.

Andere Selektionsverfahren, sowohl manuelle als auch automatisierte, werden häufig in einem einzigen Reaktionsgefäß durchgeführt. Dabei können Plastikbinder angereichert werden, die die bindenden Spezies verdrängen. Außerdem können bei Ein-Reaktionsgefäß-Verfahren Probleme durch Kreuzkontamination aufgrund unzureichender Entfernung des Überstands auftreten (Eulberg *et al.* 2005a).

Die für die Selektion verwendete einzelsträngige DNA wurde vor dem Einsatz in die Selektion hitzedenaturiert und anschließend sofort für einige Minuten auf Eis gestellt. Diese Behandlung bewirkt die Ausbildung einheitlicher Strukturen, während langsames Abkühlen zu einer Mischung verschiedener Formen führt (Baldrich *et al.* 2004).

Nach der Kopplung der Streptavidin-Beads mit biotinyliertem Daunorubicin wurden die möglicherweise noch freien Bindungsstellen mit Biotin geblockt. Diese offenen Biotin-Bindungstaschen stellen aufgrund ihrer Struktur ein potentiell gutes Target für Aptamere dar (Srisawat & Engelke 2001) und ständen bei der Selektion daher in Konkurrenz zum eigentlichen Zielmolekül.

Durch die Kopplung von Daunorubicin an Biotin über einen Linker mit Disulfidbrücke kann die üblicherweise bei der *in vitro*-Selektion durchgeführte kompetitive oder unspezifische Elution umgangen werden. Während bei einer kompetitiven Elution sehr gute Binder eventuell nicht eluiert werden können, stellt bei der unspezifischen Elution die Anreicherung von Hintergrundbindern ein großes Problem dar. Anders als Proteine werden Nukleinsäuren nicht durch reduzierende Agenzien beeinträchtigt. Deshalb ist, durch Reduktion der Spacer-Disulfidbrücke mit DTT, eine spezifische Elution von Bindern (im Komplex mit dem Targetmolekül) möglich. Auf diese Weise können Aptamere mit sehr guten Dissoziationskonstanten isoliert werden.

Durch die Fällungsschritte nach der Elution oder PCR werden niedermolekulare Substanzen wie DTT, Nukleotide oder $MgCl_2$, die im Reaktionsmix in großen Mengen vorhanden sind und die Interaktion von Aptamer und Targetmolekül in der nächsten Selektionsrunde stören könnten, entfernt.

Die Wahl der Verhältnisse von DNA zu Target orientierte sich an der Selektion von DNA-Aptameren gegen das His-Tag (Doyle & Murphy 2005). Zu Beginn der Selektion wurde ein großer (zehnfacher) Überschuss an DNA zu Daunorubicin eingesetzt, das Verhältnis im Zuge der Runden jedoch bis zu einem Verhältnis von 2:1 angenähert. Andere Gruppen haben hinsichtlich der gewählten Verhältnisse gegensätzliche Strategien beschrieben und dabei einen Überschuss an Target verwendet (Vater *et al.* 2003; de Zwart *et al.* 2005; Eulberg *et al.* 2005b).

5.2 NICHT-RADIOAKTIVES MONITORING

Um den Verlauf einer Selektion zu untersuchen, werden die Nukleinsäuren üblicherweise radioaktiv markiert. Hierbei handelt es sich um eine empfindliche Methode, die die Detektion von minimalen Mengen an Nukleinsäuren erlaubt. Nachteilig ist jedoch, dass eine behördliche Genehmigung für radioaktives Arbeiten vorliegen muss, die Versuche nur unter entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen ausgeführt werden dürfen und die eingesetzten markierten Nukleotide relativ teuer sind.

Im Zuge dieser Arbeit wurden zwei Methoden entwickelt, um den Verlauf der Selektion auf nicht radioaktive Art und Weise zu verfolgen, der *Fluorescence dye-linked aptamer assay* (FLAA) bzw. der *Diversity assay for nucleic acids* (DANA). Während bei FLAA die Anreicherung von bindenden Sequenzen untersucht wird, kann man mit Hilfe von DANA die Abnahme der Diversität des Pools beobachten.

Eine Möglichkeit, Fluoreszenz zum Beobachten des Selektionsverlaufs zu nutzen, haben Stoltenburg *et al.* mit der FluMag-SELEX präsentiert (Stoltenburg *et al.* 2005), indem sie über PCR in die DNA eingebaute Fluoreszenzmarker zum Nachweis der Anreicherung in der Selektion nutzten. Da direkter Einbau von Fluoreszenzmarkierungen jedoch teuer ist und außerdem die Bindungseigenschaften der Nucleinsäuren verändern könnte (Nutiu & Li 2004), wurde FLAA entwickelt, der die Vorteile von Fluoreszenz nutzt, jedoch ohne invasiv zu sein.

Zwar wird die Anreicherung nicht direkt während der Selektion gemessen, jedoch ist mit FLAA ein Vergleich der Anreicherungsdaten aus den verschiedenen Runden möglich, da die gleichen Bedingungen für jede Probe verwendet werden. Bei direkter Markierung der Nucleinsäuren ist das Signal hingegen stark abhängig vom Verhältnis von Nucleinsäure zu Target, das für die jeweilige Selektionsrunde gewählt wird, wobei für die gleiche Probe bei größerem Target-Überschuß eine stärkere Anreicherung nachweisbar ist. Da das Verhältnis im Zuge der Selektion jedoch variiert wird, um stringenter Bedingungen zu schaffen, ist die Bestimmung der absoluten Anreicherung auf diese Art und Weise schwierig. Ein weiterer Vorteil gegenüber direkter Markierung liegt bei FLAA darin, dass nicht die Gesamtheit der eluierten Nucleinsäuren analysiert wird, bei der im Falle einer unspezifischen Elution auch unspezifische Binder enthalten sind, sondern auch Informationen über die tatsächlichen Bindungseigenschaften des Aptamerpools erhalten werden.

Mit DANA hingegen kann das Fortschreiten der Selektion anhand der Abnahme der Diversität des Nucleinsäurepools untersucht werden. Die Abnahme der Diversität, die aus der Untersuchung der Daunorubicin-Selektion über DANA hervorgeht, deckt sich mit dem Anstieg an bindenden Sequenzen, der aus den FLAA-Analysen erhalten wurde. DANA liefert zwar keine direkten Aussagen über die Qualität der Aptamere, in Kombination mit Bindungsassays wie FLAA kann er jedoch ein Entscheidungskriterium für den Abbruch einer Selektion liefern: Ist die Diversität stark reduziert, eine Bindung jedoch nicht nachweisbar, sollte die Selektion als nicht erfolgreich abgebrochen werden. Ist dagegen eine Bindung zu sehen, jedoch keine weitere Veränderung in der Diversität, kann mit der Vereinzelung der Aptamersequenzen begonnen werden.

Auf Grundlage dieser Testergebnisse wurde die Selektion von DNA-Aptameren gegen Daunorubicin nach zehn Runden beendet und mit der Klonierung des angereicherten Pools begonnen.

5.3 CHARAKTERISIERUNG DER APTAMERE

Die 24 isolierten Aptamere aus der Selektion gegen Daunorubicin wiesen starke Sequenzhomologien auf und ließen sich anhand dieser in sieben Gruppen einteilen, innerhalb derer die Sequenzen

identisch waren oder sich durch maximal zwei Punktmutationen unterschieden. Gruppenübergreifend konnte bei allen Klonen ein guaninreiches Motiv von 18 - 22 Nukleotiden Länge identifiziert werden, bei dem Gruppen von zwei bis fünf Guaninen durch ein bis vier andere Nukleotide getrennt wurden. Ihrer Sequenz nach lassen sich die isolierten Aptamere demnach der Gruppe der *guanine-rich oligonucleotides* (GRO) zuordnen, einzelsträngigen DNAs die als grundlegende Struktureinheit G-Quadruplexe aufweisen (Smirnov & Shafer 2000; Que-Gewirth & Sullenger 2007). Zu diesen GRO gehören beispielsweise das ATP/Adenosin-Aptamer (Huizenga & Szostak 1995), das Thrombin-Aptamer (Macaya *et al.* 1993) oder das Nukleolin-bindende Aptamer AS1411, ein unmodifiziertes 26mer Oligodesoxynukleotid, das sich zur Zeit in Phase I für Lungen- und Nierenkrebs befindet (Thiel 2004; Que-Gewirth & Sullenger 2007).

Der guaninreiche Abschnitt des im FLAA als besten Binder identifizierten Klons 10.10 entspricht dabei der allgemeinen Formel $G_{3+}N_{1-7}G_{3+}N_{1-7}G_{3+}N_{1-7}G_{3+}$, die für einmolekulare G-Quadruplexe beschrieben wurde (Huppert & Balasubramanian 2005, 2007). 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. Mit Quadparser (Huppert & Balasubramanian 2005) und QGRS Mapper (Kikin *et al.* 2006) stehen jedoch Programme zur Verfügung, die zumindest Sequenzabschnitte von putativen G-Quadruplexen in DNAs identifizieren.

Im Zuge dieser Arbeit wurden für den guaninreichen Abschnitt von Klon 10.10 nach dem von Davis (Davis 2004) beschriebenen Schema für einmolekulare Quadruplexe mögliche Strukturen postuliert. Um die tatsächliche Struktur, vor allem im Komplex mit Daunorubicin, zu bestimmen, sind jedoch weitere experimentelle Studien nötig, wie beispielsweise CD-Spektroskopie, NMR (Mazzini *et al.* 1998) oder Röntgenkristallographie (Wang *et al.* 1987; Clark *et al.* 2003). Auch eine Exonuklease I-Hydrolyse (Yao *et al.* 2007) könnte für die Untersuchung der Stabilisierung der G-Quadruplex durch kleine Moleküle hilfreich sein.

Bei den übrigen Daunorubicin-Aptamer-Klonen, die im FLAA ebenfalls alle als Binder identifiziert wurden, sind die G-Cluster verkürzt, so dass häufig nur zwei Guanine anstelle von dreien für eine Quadruplexbildung zur Verfügung stehen. In der Literatur wurden für Aptamere mit solch verkürzten Motiven ebenfalls einmolekulare Quadruplexstrukturen postuliert (Purschke *et al.* 2006); jedoch wäre auch die Ausbildung einer bimolekularen Tetraplex-Struktur möglich, wie sie für das Thrombin-Aptamer in wässriger Lösung beschrieben wurde (Fialova *et al.* 2006). Das Thrombin-Aptamer ist ein DNA-15mer mit der Sequenz d(GGTTGGTGTGGTTGG) und weist somit ein ähnliches Guanin-Muster wie die Daunorubicin-Aptamere mit Ausnahme von Klon 10.10 auf.

Um die Charakterisierung der Aptamerbindung, welche die Grundlage für künftige Anwendungen des Aptamers ist, möglichst umfassend durchführen zu können, wurde der beste Daunorubicin-Binder, Klon 10.10, für die anschließenden Versuche sowie die Assay-Entwicklung ausgewählt.

Die für dieses Aptamer über Oberflächenplasmonenresonanz bestimmte Dissoziationskonstante von 20 nM zeigt, dass die über halbautomatische Selektion isolierten DNA-Aptamere hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften mindestens vergleichbar mit, wenn nicht gar überlegen zu manuell

selektierten DNA-Aptameren gegen kleine Moleküle sind. In einer Arbeit von Huizenga und Szostak wurde beispielsweise ein Aptamer gegen Adenosin beschrieben, das eine K_D von 6 μM aufwies (Huizenga & Szostak 1995). Vianini *et al.* identifizierten ein L-Tyrosinamid-bindendes Aptamer mit einer K_D von 45 μM (Vianini *et al.* 2001). Gegen Ethanolamin wurden von Mann *et al.* Aptamere mit Dissoziationskonstanten im Bereich von 6 - 19 nM beschrieben (Mann *et al.* 2005). Shoji *et al.* isolierten ein Aptamer gegen (R)-Thalidomid (Shoji *et al.* 2007) mit einer K_D von 1 μM . Außerdem wurden Aptamere gegen das Steroid Cholinsäure mit K_D s zwischen 6 und 68 μM (Kato *et al.* 2000) und gegen anionische Porphyrine mit K_D s im submikromolaren Bereich (Li *et al.* 1996) isoliert.

Sowohl die FLAA- als auch die Biacore-Experimente zeigen, dass die Primerregionen für die Bindung des Aptamers von Bedeutung sind. Zwar wird die Assoziationsrate durch Entfernen der Sequenzen nicht beeinflusst, die Dissoziationsrate wird jedoch um das zehnfache beschleunigt; die Dissoziationskonstante für das verkürzte Aptamer beträgt nur noch 272 nM gegenüber 20 nM für das vollständige. Die Primerregionen sind demnach bei der Bindung involviert oder haben zumindest stabilisierende Funktion für die Aptamerstruktur, ein Phänomen, das bereits bei anderen Aptameren beschrieben wurde (Nieuwlandt *et al.* 1995; Wiegand *et al.* 1996; Bell *et al.* 1998).

Wie FLAA-Experimente gezeigt haben, ist die spezifische und hoch affine Bindung des Aptamers nicht auf die natürliche Affinität von DNA zu Daunorubicin zurückzuführen. Die Dissoziationskonstante K_D liegt bei 20 μM für dsDNA bzw. 225 μM für ssDNA (Cheng *et al.* 2005) und somit tausend- bzw. zehntausendfach höher als die des Aptamers (20 nM). Für doppelsträngige DNA ließ sich, unabhängig von der Sequenz, im FLAA keine Aptamerbindung nachweisen. Wurde der doppelsträngige Daunorubicin-Aptamer-Klon vor dem Test hitzedenaturiert, konnte jedoch eine minimale Bindung an Daunorubicin detektiert werden. Diese lässt sich dadurch erklären, dass ein Teil der dsDNA nach Denaturierung und Inkubation auf Eis einzelsträngig bleibt und die für die Bindung nötige dreidimensionale Struktur ausbilden kann. Dieser Teil könnte dann tatsächlich an das immobilisierte Daunorubicin binden und detektiert werden.

Außerdem wurde die Abhängigkeit der Aptamerbindung von der Anwesenheit verschiedener Salze untersucht, da angenommen wurde, dass die Quadruplexstruktur das strukturbildende Element des Aptamers darstellt und bekannt ist, dass Quadruplexe durch monovalente Kationen wie K^+ und Na^+ stabilisiert werden (Davis 2004). Die Ergebnisse der FLAA-Experimente legen nahe, dass die Bindungseigenschaft des Aptamers nicht abhängig von bestimmten Ionen ist. Das Fehlen der Salze K^+ , Mg^{2+} und Ca^{2+} veränderte die Bindung des Aptamers nicht signifikant. Nur wenn Na^+ aus dem Puffer entfernt wurde, war die Bindung nachweislich reduziert. Da der Bindungspuffer Na^+ in hohen Konzentrationen von 140 mM enthält (im Gegensatz zu 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2 und 1 mM CaCl_2), könnte die reduzierte Bindung durch eine erhöhte elektrostatische Abstoßung der DNA verursacht werden, da die positiv geladenen Gegenionen fehlen. Scheinbar beeinflusst nur die Ionenstärke, nicht die Art der Kationen die Aptamerbindung. Daher kann angenommen werden, dass die verschiedenen Kationen im Bindungspuffer keine bestimmte Funktion für die Aptamerstruktur erfüllen.

Dies wiederum legt nahe, dass die für die hochaffine Bindung nötige definierte Struktur des Aptamers durch Ligandenbindung induziert oder zumindest stabilisiert wird. Es wurden bereits Moleküle

identifiziert, die an G-Quadruplexe binden und diese stabilisieren (Mergny *et al.* 2002; Eckel *et al.* 2003). Da die Sequenz des Daunorubicin-Aptamers der einer einmolekularen Quadruplex entspricht, könnte Daunorubicin diese Funktion bei der Aptamerbindung ausführen.

Bei der Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Aptamerbindung bei pH-Werten von pH 2,0 bis pH 10,0 wurde eine Optimumskurve erhalten, wobei die beste Bindung bei pH 6,0 nachgewiesen wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass ein weiter pH-Bereich für die Aptamerbindung toleriert wird und die Effizienz sogar bei extremeren pH-Werten nur teilweise reduziert ist. Dass das Bindungsoptimum bei pH 6,0 und nicht bei pH 7,4 lag, bei dem die Selektion durchgeführt wurde, könnte dadurch erklärt werden, dass die sekundäre Aminogruppe des immobilisierten Daunorubicin-Biotin-Konjugats bei pH 6,0 protoniert vorliegt. Dadurch käme die Komponente der elektrostatischen Anziehung zur Aptamer-Target-Wechselwirkung hinzu. Bei niedrigeren pH-Werten nimmt die Neutralisation des Phosphatrückgrads zu, was Einfluss auf die Konformation des Aptamers und daher seine Bindungseigenschaften hat. Derselbe Effekt kann bei stärker alkalischen pH-Werten beobachtet werden, bei denen Nukleinsäurestrukturen ebenfalls aufgelöst werden.

Da sich eine Immobilisierung möglicherweise störend auf die Aptamerbindung auswirken kann (Potyrailo *et al.* 1998; Lee & Walt 2000; Baldrich *et al.* 2004; Nutiu & Li 2004), wurden die Bindungseigenschaften des immobilisierten Aptamers in ELAA-Experimenten überprüft. Obwohl mit dem bloßen Auge eine deutliche Bindung des Aptamers anhand eines starken Signals erkennbar war, lagen die gemessenen Absorptionswerte relativ niedrig. Gemäß der Herstellerangabe (und den vorhandenen Filtern) wurden die Messungen bei 405 nm ausgeführt. In der Literatur wurden jedoch auch andere Wellenlängen für die ABTS-Detektion beschrieben, beispielsweise bei 734 nm (Gallati 1979; Porstmann *et al.* 1981; Arts *et al.* 2004), was möglicherweise zu besseren Ergebnissen führen könnte.

In kompetitiven FLAA-Experimenten wurde außerdem die Spezifität des Aptamers überprüft. Das Aptamer band weder an Tetracyclin noch an Chloramphenicol, was seine Spezifität zeigt. Das Daunorubicin-Derivat Doxorubicin zeigte jedoch eine stärkere Affinität zum Aptamer als das ursprüngliche Zielmolekül Daunorubicin. Ein ähnlicher Vorzug für Doxorubicin wurde für monoklonale Antikörper beschrieben, die gegen Daunorubicin selektiert wurden (Fujiwara *et al.* 2007). Doxorubicin unterscheidet sich von Daunorubicin durch eine zusätzliche Hydroxylgruppe am C-14. Durch den Austausch des C-14 Wasserstoffatoms des Daunorubicins durch eine Hydroxylgruppe können zusätzliche Wasserstoffbrücken unter Einbezug des umgebenden Mediums ausgebildet werden (Smith *et al.* 1995). Wasserstoffbrücken spielen eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung von Komplexen, was darauf hindeutet, dass das tetrazyklische Ringsystem (Daunomycinon) und besonders die funktionelle Gruppe am C-14 bei der Komplexbildung von Aptamer und Anthracyclin eine wichtige Rolle spielt.

Außerdem zeigt der kompetitive FLAA, dass die Affinität für das freie Daunorubicin mindestens ebenso hoch ist wie für die biotinylierte und immobilisierte Form. Dies ist besonders interessant, da die Selektion ausschließlich gegen immobilisiertes Daunorubicin durchgeführt und die Elution nicht

kompetitiv sondern mit DTT bewerkstelligt wurde. Diese Art der Elution eignet sich offensichtlich gut für die Isolation von hoch affinen Aptameren.

5.4 ANWENDUNG UND AUSBLICK

Aufgrund ihrer hohen Affinität und Spezifität besitzen Aptamere, analog zu monoklonalen Antikörpern, ein großes Potenzial für diagnostische Anwendungen. Gegenüber Antikörpern bieten sie jedoch diverse Vorteile: Sie können chemisch in großer Reinheit und großen Mengen hergestellt werden. Die chemische Synthese ermöglicht auch die gezielte Einführung von Modifikationen, insbesondere von Reporter-molekülen, wodurch ein Einsatz in der Diagnostik deutlich vereinfacht werden kann. So wurden Aptamere erfolgreich in verschiedenartigen Biosensorsystemen (inklusive Arrays) eingesetzt (siehe 1.1.3). Auch ELISA-ähnliche Assays in Kombination mit Antikörpern (ELONA) wurden beschrieben (Drolet *et al.* 1996; Drolet *et al.* 1998), wobei ein immobilisiertes Aptamer als Fängermolekül, ein markierter Antikörper als Detektormolekül eingesetzt wird.

Der in dieser Arbeit etablierte kompetitive FLAA liefert ein neues, schnelles und einfaches Format zum empfindlichen Nachweis von Daunorubicin. Dieser Test ermöglicht die Quantifizierung von 15 nM der Anthracycline Daunorubicin und Doxorubicin, wobei die obere Messgrenze bei 0,76 µM liegt. Der mittlere Assaybereich, bei etwa 40 nM Daunorubicin, liefert den besten Messbereich.

Da die applizierte Konzentration für therapeutische Anwendungen sowohl für Daunorubicin als auch für Doxorubicin bei etwa 1 µM liegt (Wiese 2001), liegt die Empfindlichkeit des Testsystems somit in einem für therapeutisches Monitoring relevanten Bereich. Dabei wäre selbst eine fünfzigfache Verdünnung der Probe möglich, um Enzyme und andere Störfaktoren zu reduzieren. FLAA-Experimente, die in 10 % fötalem Kälberserum durchgeführt wurden, zeigten, dass das Aptamer auch nach einer Stunde Inkubation noch voll funktionsfähig ist. Eine Modifikation des Aptamers zur Erhöhung der Plasmastabilität, beispielsweise durch 3'-Biotinylierung (Dogan *et al.* 2000), ist demnach nicht nötig. Der kompetitive FLAA bietet also eine Möglichkeit, Patientenproben schnell und ohne teure Instrumentierung auf ihre Daunorubicin-Konzentration hin zu untersuchen und ist damit ein viel versprechender Schritt in Richtung der personalisierten Medizin.

Prinzipiell eignet sich der kompetitive FLAA auch zur Abwasseranalyse, wobei das System im Hinblick auf die Sensitivität noch optimiert werden müsste. Literaturangaben zu Folge liegt der relevante Detektionsbereich für Daunorubicin bei 0,29 µg/l, für Doxorubicin bei 0,26 - 1,35 µg/l (Mahnik *et al.* 2007) und damit um etwa eine Größenordnung unter der bisher bestimmten Nachweisgrenze.

Ein weiteres Anwendungsgebiet für Daunorubicin-Detektionssysteme ist die Arbeitsplatzsicherheit. Diverse Studien belegen, dass die Inkorporation durch den Umgang mit Daunorubicin am Arbeitsplatz ein nicht zu unterschätzendes Risiko darstellt, das zu Schädigungen des Organismus führen kann (Schreiber 2002; Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen "Otto von Guericke" e.V. (AiF) 2005; Nickisch-Hartfiel 2005). Aus diesem Grund wurden Projekte zur Etablierung eines

einfachen Schnelltests gefördert (Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen "Otto von Guericke" e.V. (AiF) 2005; Nickisch-Hartfiel 2005).

Liu *et al.* präsentierten kürzlich ein aptamerbasiertes Testsystem auf Nitrocellulose-Streifen (*lateral flow device*, „dipstick test“), bei dem sie Aptamere nutzten, um mittels Nanogold empfindlich Adenosin nachzuweisen (Liu *et al.* 2006). Adenosin-Aptamere fungierten dabei als Linker zwischen Nanogoldpartikeln, die mit zum Aptamer komplementären Oligonukleotiden gekoppelt waren. Diese Nanogoldaggregate sind blau und aufgrund ihrer Größe unbeweglich, so dass sie nicht im lateralen Flusssystem auf Nitrocellulosestreifen wandern. Ist in der zu untersuchenden Probe Adenosin vorhanden, bindet das Aptamer, wobei es sich in seine funktionelle dreidimensionale Struktur faltet und nicht mehr als Linker zwischen den Nanogoldpartikeln zur Verfügung steht. Nicht aggregiertes Nanogold ist rot und wandert auf den Teststreifen, bis es, da es zusätzlich mit Biotin gekoppelt ist, von immobilisiertem Streptavidin eingefangen wird. Das Detektionslimit für diesen Test lag bei 20 μM Adenosin.

In dieser Arbeit wurde ebenfalls ein Detektionssystem auf Nitrocellulosestreifen etabliert, dessen Aufbau jedoch auf einem kompetitiven Prinzip beruht. Ähnlich wie beim kompetitiven FLAA bildet das Aptamer mit freiem Daunorubicin in der zu untersuchenden Probe einen stabilen Komplex und kann deshalb nicht mehr an im Probenfeld immobilisiertes Daunorubicin binden; der Komplex wird jedoch im Kontrollfeld von einem immobilisierten komplementären Oligonukleotid eingefangen. Ist kein Daunorubicin in der zu untersuchenden Lösung vorhanden, bindet das Aptamer an das immobilisierte Zielmolekül. Der Nachweis erfolgte für den *proof of principle* enzymatisch durch Umsatz von 4-Chloro-1-Naphthol durch Meerrettich-Peroxidase, die an das Aptamer gekoppelt war. Auf diese Weise konnten 5 μM Daunorubicin detektiert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass ein kompetitiver Test im Nitrocellulosestreifen-Format generell möglich ist, allerdings ist der enzymatische Nachweis, wie er hier verwendet wurde, für eine schnelle Handhabung relativ unkomfortabel. Aus diesem Grunde wurde versucht, die Detektion mit Hilfe von Nanogold zu bewerkstelligen, das aufgrund seiner optischen Eigenschaften eine sehr empfindliche Detektion erlaubt und zur Detektion auf Streifentests bereits angewendet wurde (Brada & Roth 1984; Kalogianni *et al.* 2006; Liu *et al.* 2006). Hierfür sollten biotinylierte Aptamere an streptavidinbeschichtete Nanogoldpartikel gekoppelt werden. Jedoch zeigte sich, dass die Nanogoldpartikel nach Kopplung mit biotinyliertem Aptamer aggregierten. Weitere Experimente müssen daher durchgeführt werden, um dieses Phänomen genauer zu evaluieren. Auch die direkte Kopplung eines Farbstoffs an das Aptamer wurde getestet. Hierfür wurde der Quencher DyQ-661 über einen C6-Spacer an das 5'-Ende des Aptamers gekoppelt. Ein auf diese Weise modifiziertes Aptamer verlor jedoch seine Bindungsfähigkeit und konnte deshalb nicht für dieses Assayformat verwendet werden.

Eine weitere Möglichkeit, den zusätzlichen Schritt der Zugabe von Enzymsubstrat bei der Versuchsdurchführung zu vermeiden, könnte sich aus der Adaption kommerziell etablierter Streifentestformate, wie beispielsweise Schwangerschaftsschnelltests, ergeben. Diese beruhen ebenfalls auf einem kompetitiven Prinzip. Häufig werden Antikörper verwendet, die wie das Aptamer

enzymmarkiert sind; das Substrat wird jedoch nicht zugegeben, vielmehr ist der Teststreifen bereits mit diesem beschichtet (Henderson & Rogerson 2003).

Teststreifen bieten nicht nur eine einfache Handhabung, sie können auch empfindlicher als Detektionssysteme in Lösung sein, da der Hintergrund durch die unterschiedlichen Vorgänge von Bindung, Trennung und Detektion reduziert wird (Liu *et al.* 2006).