



# UFZ-Bericht

Nr. 13/2003

---

## Entwicklung von Aptameren für Biosensoren

---

Dr. Regina Stoltenburg und Dr. Beate Strehlitz

UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH  
Umwelt- und Biotechnologisches Zentrum /  
Department Umweltbiotechnologie

**Ergebnisbericht zum Forschungs- und Entwicklungsvorhaben:**

## **Entwicklung von Aptameren für Biosensoren**

**Autor:** Dr. Regina Stoltenburg

**Durchführende Institution:** Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH  
- Umwelt- und Biotechnologisches Zentrum (UBZ) /  
Dep. Umweltbiotechnologie -  
Permoserstr. 15  
04318 Leipzig

**Projektleiter:** Dr. Beate Strehnitz



*Archiv*

gefördert durch Sächsisches Staatsministerium für Umwelt und Landwirtschaft,  
vertreten durch das Sächsische Landesamt für Umwelt und Geologie,  
Sachgebiet: Bio- und Gentechnik  
(AZ 13-8811.61/93)

Projektlaufzeit: 1.4.2001 - 31.5.2003

**Leipzig, September 2003**

UFZ-Umweltforschungszentrum  
Leipzig-Halle GmbH  
Zentralbibliothek  
Permoserstraße 15  
04318 Leipzig

03-1373

# INHALTSVERZEICHNIS

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1. ZIELSETZUNG UND ABLAUFPLANUNG.....</b>	<b>5</b>
<b>2. METHODISCHE UMSETZUNG.....</b>	<b>9</b>
<b>2.1. Präparation von Schimmelpilzsporen .....</b>	<b>9</b>
<b>2.2. Allgemeine Nukleinsäuretechniken .....</b>	<b>9</b>
2.2.1. Quantifizierung von Nukleinsäuren .....	9
2.2.2. Ethanolfällung von Nukleinsäuren.....	11
2.2.3. Gelelektrophorese von Nukleinsäuren .....	11
2.2.4. Gelelution von Nukleinsäuren .....	12
<b>2.3. <i>In vitro</i> Selektion zur Gewinnung von ssDNA Aptameren.....</b>	<b>13</b>
2.3.1. Targetmoleküle .....	14
2.3.2. Random DNA-Oligonukleotid Bibliothek und Primer .....	14
2.3.3. SELEX-Prozess.....	15
<b>2.4. Klonierung selektierter Aptamer-DNA .....</b>	<b>21</b>
2.4.1. Klonierung der selektierten DNA nach der letzten SELEX-Runde.....	21
2.4.2. Überprüfung der Transformanten mittels Kolonie-PCR.....	22
2.4.3. Präparation von pDNA aus <i>E. coli</i> nach Sambrook et al. (2001).....	24
2.4.4. Präparation von pDNA aus <i>E. coli</i> mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit.....	25
2.4.5. Restriktion der pDNA .....	25
<b>2.5. Sequenzanalyse individueller Aptamer-Klone .....</b>	<b>26</b>
2.5.1. Sequenzierung .....	26
2.5.2. Analyse der Primär- und Sekundärstruktur .....	26
<b>2.6. IAsys - Affinitätssensor .....</b>	<b>27</b>

<b>3. ERGEBNISSE UND PERSPEKTIVEN</b> .....	<b>30</b>
<b>3.1. <i>In vitro</i> Selektion zur Gewinnung von Aptameren für Schimmelpilzsporen</b>	<b>30</b>
3.1.1. SELEX-Prozess.....	30
<b>3.2. <i>In vitro</i> Selektion zur Gewinnung von Aptameren für Streptavidin-MB</b> .....	<b>33</b>
3.2.1. SELEX-Prozess.....	33
3.2.2. Klonierung und Sequenzanalyse .....	37
3.2.3. Bindungsversuche mit individuellen StrepAp Klonen .....	41
3.2.4. Charakterisierung der Streptavidin-MB spezifischen Aptamer-Klone .....	49
<b>3.3. IAsys - Affinitätssensor</b> .....	<b>59</b>
3.3.1. Modellsystem: DNA/DNA-Hybridisierung .....	59
3.3.2. Anwendung von Aptameren im IAsys-Affinitätssensor .....	64
<b>4. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>66</b>
<b>5. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>69</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A.dest.	Aqua destillata
b	Basen
bp	Basenpaar
BS <sup>3</sup>	Bis (sulfosuccinimidyl) suberat
BSA	Bovine serum albumin
CMD	Carboxymethyl-Dextran
DMS	Dimethyl suberimidat
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DSC	Disuccinimidyl carbonat
dsDNA	double stranded DNA
DSO	Disuccinimidyl oxylat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
HEGL	Hexaethylenglycol
NHS	N-Hydroxysuccinimide
nt	Nukleotide
<i>P. expansum</i>	<i>Penicillium expansum</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction
pDNA	Plasmid-DNA
PDITC	1,4-Phenylen diisothiocyanat
RNA	Ribonucleic Acid
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
ssDNA	single stranded DNA
StrepAp Klone	selektierte Aptamer-Klone aus dem SELEX-Prozess mit Streptavidin-MB als Target
Streptavidin-MB	Streptavidin-Magnetic Beads
Taq DNA Polymerase	Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜN	über Nacht
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactosid

## 1. Zielsetzung und Ablaufplanung

Ziel des vorliegenden Projektes ist die Etablierung einer gentechnologischen Methode zur Entwicklung von Aptameren und deren Erschließung als neuartige Werkzeuge zur Detektion umweltrelevanter Analyte. Aptamere sind kurze einzelsträngige Nukleinsäure-Oligomere (ssDNA- oder RNA-Moleküle), die sich durch die Ausbildung einer spezifischen, komplexen dreidimensionalen Struktur auszeichnen. Aufgrund dieser Eigenschaft können Aptamere entwickelt werden, die analog zu einer Antigen-Antikörper-Bindung „passgenau“ nukleinsäurefremde Moleküle mit hoher Affinität und Spezifität binden (Abb.1).

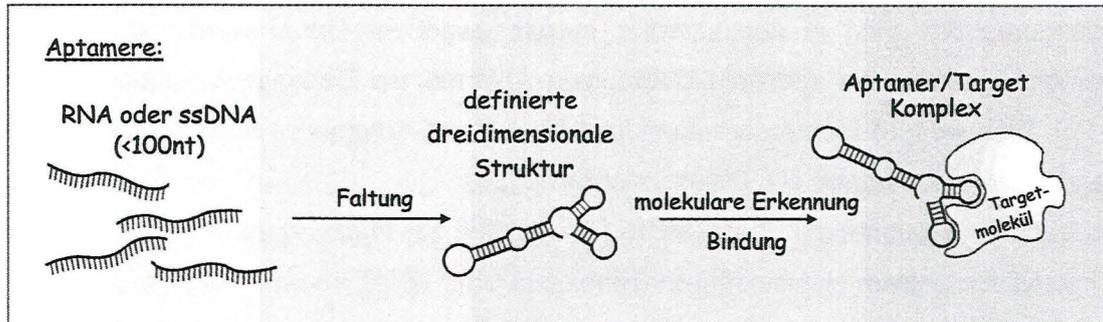


Abb. 1 allgemeine Funktionsweise von Aptameren

Mit Hilfe des SELEX-Verfahrens (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment), einer *in vitro* Selektions- und Amplifikations-Technik, werden aus einem großen Pool von Oligomeren mit variablen Sequenzabfolgen (synthetische random DNA-Oligonukleotid Bibliothek) nur diejenigen Oligonukleotide (Aptamere) selektiert und angereichert, die besonders gut an das vorgegebene Zielmolekül binden. Diese Technik wurde erstmals 1990 von Tuerk and Gold beschrieben und seither weiterentwickelt und verfeinert, sowie an die verschiedensten Zielmoleküle angepasst [1]. Neben spezifischen und gereinigten Zielmolekülen, wie Nukleotide, Aminosäuren, Polysaccharide, Lektine, Antibiotika, Peptide oder Proteine wurden auch komplexe Zielstrukturen, wie z. B. Viren, Bacillus-Sporen, Trypanosomen oder Zellen bzw. Gewebe höherer Eukaryoten für die Aptamergewinnung eingesetzt [2-16]. Die SELEX-Technologie zur Herstellung von Aptameren spielt überwiegend eine Rolle in der molekularbiologischen Grundlagenforschung sowie in der medizinisch/pharmakologischen Forschung mit Fokus auf neue Möglichkeiten für Therapie und Diagnostik [17]. Darüber hinaus bieten die Aptamere ein großes Potential als molekulare Erkennungswerkzeuge in analytischen Systemen zur Detektion oder Isolation spezifischer Zielmoleküle in komplexen Proben. Beispiele zum Einsatz von Aptameren in der Flowcytometrie, Affinitätschromatografie, Kapillarelektrochromatografie und Affinitätskapillarelektrophorese wurden bereits beschrieben [18-21]. Aufgrund ihrer positiven Eigenschaften werden Aptamere auch eine zunehmende Rolle als neuartige, biologische Rezeptorkomponenten in Biosensoren spielen [22]. Im Gegensatz zur Antikörperproduktion kommt die *in vitro* ablaufende Aptamer-Selektion ohne Tierversuche oder Zellkulturen aus.

Die Selektionsparameter können entsprechend den gewünschten Aptamereigenschaften (Affinität, Selektivität, Stabilität, Probenmatrix) angepasst werden. Darüber hinaus können die Aptamere selbst modifiziert werden, beispielsweise durch die Einführung chemischer Gruppen in das Nukleinsäuremolekül, um die Stabilität oder die Immobilisierungseigenschaften zu verbessern, oder durch das Ankoppeln von Reporter-molekülen für die Detektion. Bereits selektierte Aptamere können jederzeit chemisch synthetisiert werden, wodurch deren Verfügbarkeit und Reproduzierbarkeit gewährleistet ist. Attraktiv für Biosensoranwendungen ist außerdem die Regenerierbarkeit der Aptamer-Target-Bindung. Einige Arbeiten zur Biosensorapplikation von Aptameren mit zumeist optischer Detektion der Bindungsreaktion sind in der Literatur bereits gegeben. Dabei wurde sowohl ein anti-Thrombin Aptamer, als auch ein L-Adenosin Aptamer als Rezeptorkomponente eingesetzt [23-25]. Eine weitere Biosensorentwicklung basiert auf Aptameren für humanes IgE und der Quarzkristall-Mikrowaage als Detektionsprinzip [26].

Eine auch für Biosensoren interessante Perspektive zur Nutzung von Nukleinsäuren stellen die katalytisch aktiven Nukleinsäuren (Ribozyme oder DNAzyme mit zumeist Nuklease- oder Ligaseaktivität) mit allosterischen Eigenschaften dar, bei denen die katalytische Aktivität durch die Bindung eines Effektors reguliert wird [27]. Ein Beispiel sind die sogenannten Aptazyme, die sich durch eine Kombination von Aptamer und katalytisch aktiver Nukleinsäure (z.B. Ribozym) auszeichnen. Das Besondere hierbei ist, dass die Strukturänderung im Nukleinsäurekonstrukt, bedingt durch die spezifische Aptamer-Target-Bindung, zu einer Aktivierung (oder Inhibition) der katalytischen Eigenschaft der Ribozymkomponente führt. Dabei kann die katalytische Aktivität, beispielsweise eine Nukleaseaktivität, durch das An- bzw. Ausschalten eines Fluoreszenzsignals vermittelt werden [28;29].

Gegenstand des vorliegenden Projektes ist die Etablierung der Methode zur Aptamerselektion am UbZ (UFZ) für die Entwicklung einer neuen Biosensor-Generation, den Aptamer-Sensoren, speziell für die Umweltanalytik oder Lebensmittelanalytik. Die Schwerpunkte liegen dabei in der Erarbeitung und targetspezifischen Modifizierung der SELEX-Technologie und deren Anwendung zur Herstellung von DNA Aptameren. Als Zielmoleküle wurden zunächst die Sporen des Schimmelpilzes *Penicillium expansum* ausgewählt. Schimmelpilzsporen sind weit verbreitet und allgegenwärtig und stellen somit ein umweltrelevantes Target dar, da z. B. ein erhöhter Befall in Innenräumen (Wohn- oder Arbeitsbereich) ein enormes gesundheitliches Gefährdungspotential für den Menschen aufweist (von Allergien bis zu schweren Pilzinfektionen). *P. expansum* ist ein typischer Vertreter der Innenraumluft und auch bekannt als Verursacher der Lagerfäule des Apfels (Grünfäule) sowie als Mykotoxinbildner (z. B. Patulin). Vor diesem Hintergrund haben Kontrollen der Innenraumluft große Bedeutung für die Gesundheit und Lebensqualität des

Menschen [30]. Ein flexibles Biosensorsystem zur Vor-Ort Analyse könnte schnelle und kostengünstige Aussagen zur Sporenbelastung ermöglichen. Aus diesem Grund liegt im Rahmen einer Firmenkooperation ein weiterer Schwerpunkt des Projektes in der Erarbeitung technischer Lösungsansätze (insbesondere bezüglich der optischen Detektionseinheit) für eine spätere Biosensorentwicklung, basierend auf den gewonnenen Aptameren.

Während der Projektbearbeitung zeigte sich jedoch, dass Schimmelpilzsporen kein geeignetes Target für die Etablierung einer neuen Methode, dem SELEX-Verfahren, darstellen. Schimmelpilzsporen sind komplexe Moleküle mit undefinierter und variabler Oberflächenstruktur. Aufgrund ihrer besonderen Beschaffenheit, insbesondere auch in ihrer Funktion als Überdauerungsorgan ergaben sich Schwierigkeiten für die Aptamerselektion. Dies bedingt weitere Voruntersuchungen zu den Schimmelpilzsporen selbst. Daher wurde ein weiteres Target, Streptavidin-Magnetic Beads (Streptavidin-MB), für den SELEX-Prozess in den Arbeitsplan des Projektes aufgenommen. Streptavidin-MB sind kommerziell erhältliche magnetische Polystyren Partikel, auf deren Oberfläche Streptavidin immobilisiert wurde.

Entsprechend den Zielsetzungen des Projektes wurden im Arbeitsplan folgende Schwerpunkte für die Projektlaufzeit definiert:

- Etablierung der in vitro Selektions- und Amplifikationsmethode zur Gewinnung von ssDNA Aptameren und Optimierung der einzelnen Teilschritte; Anpassung des SELEX-Verfahrens an das spezielle Targetmolekül (Schimmelpilzsporen, *Streptavidin-MB*)
- Anwendung des SELEX-Verfahrens und dessen weitere Modifizierung zur Gewinnung sporenspezifischer DNA Aptamere bzw. *Streptavidin-MB* spezifischer DNA Aptamere.  
Charakterisierung gewonnener Aptamere: Klonierung, Sequenzanalyse, Bindungsstudien mit individuellen Aptamer Klonen
- Untersuchungen zur Anwendung von Aptameren in Biosensoren am Beispiel des IAsys-Affinitätssensors:
  - Nutzung der DNA/DNA-Hybridisierung als Modell zum Kennenlernen des Messprinzips, für Tests zur Immobilisierung von DNA sowie zur Stabilität und Regenerierbarkeit der Sensoroberfläche, für Bindungsstudien am Beispiel der Hybridisierungsreaktion

- Verwendung der gewonnenen Aptamere für die Untersuchung der Kopplungsreaktion mit dem entsprechenden Targetmolekül im IAsys-System (Einfließen der Erfahrungen mit dem DNA/DNA-Hybridisierungsmodell)
  
- Partner: Ingenieurbüro für Verpackung (IBV)
  - Erarbeitung eines optischen Messprinzips zur Detektion von Bindungskomplexen, mit dem Ziel einer späteren gerätetechnischen Neuentwicklung eines einfach handhabbaren und flexibel einsetzbaren Sensorsystems  
(die Ergebnisse wurden im vorliegenden Bericht nicht aufgeführt)

## 2. Methodische Umsetzung

### 2.1. Präparation von Schimmelpilzsporen

Die Kultivierung der Schimmelpilze erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Department Expositionsforschung des UFZ (Frau Müller), da hier langjährige Erfahrungen im Umgang mit Schimmelpilzen bestehen und auf eine entsprechende Stammsammlung zurückgegriffen werden kann.

Für die Aptamerherstellung wurde der Pilz *P. expansum* (Typstamm DSM1282) auf DG18 - Medium bei RT für ca. 3 Wochen in Gewebekulturflaschen kultiviert. Nach Ausbildung eines geschlossenen Pilzrasens auf der Agaroberfläche und ausreichender Sporulation wurden die Sporen mit 10-15ml Tween 20-A.dest. (0,1% Tween 20) vorsichtig durch Hin- und Herschwenken von der Oberfläche abgeschwemmt. Die Konzentration der gewonnenen Sporensuspension wurde im Phasenkontrastmikroskop mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Für die Lagerung der Sporen wurde der Suspension steriles Glycerin zu einer Endkonzentration von 10 - 15% zugesetzt. Aliquote dieser Sporensuspension zu je 0,5-1ml pro Eppendorfgesäß wurden zunächst bei -20°C eingefroren und später zu -70°C überführt. Eine Lagerung der Sporen über mehrere Monate sollte unter diesen Bedingungen möglich sein.

Für jede SELEX-Runde wurde die entsprechende Sporenmenge unmittelbar vor Beginn aufgetaut. Durch die Aliquotierung wurden mehrere Tau- und Gefrierzyklen und somit eine Zerstörung der Sporen bzw. eine Veränderung der Sporenoberfläche vermieden.

### 2.2. Allgemeine Nukleinsäuretechniken

#### 2.2.1. Quantifizierung von Nukleinsäuren

##### *Quantifizierung von ssDNA mittels UV-Absorptionsspektrometrie*

Die Konzentration einer Nukleinsäurelösung kann über die Messung der optischen Dichte bei 260nm bestimmt werden. Eine  $OD_{260nm}$  von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 33µg/ml ssDNA (bzw. 50µg/ml dsDNA). Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei ~5µg/ml ssDNA. Zusätzlich können über die Bestimmung des Quotienten  $A_{260nm}/A_{280nm}$  Aussagen über die Reinheit (Vorhandensein von Phenol- oder Proteinresten) der Nukleinsäurelösung getroffen werden. Das Verhältnis sollte bei 1,7-1,8 für DNA-Lösungen liegen.

### *Quantifizierung von ssDNA mittels OliGreen*

OliGreen ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der speziell für die Quantifizierung von unmarkierter ssDNA in Lösung geeignet ist (OliGreen ssDNA Quantitation Kit; Molecular Probes). Freier Farbstoff zeigt keine Fluoreszenz, während nach dessen spezifischer Bindung an ssDNA eine ausgeprägte Fluoreszenz nachweisbar ist. Dagegen werden freie Nukleotide, dsDNA oder RNA nicht erfasst. Die OliGreen-Messung kann in Küvetten oder Mikrotiterplatten mit einem entsprechenden Fluorometer bei Standard-Fluorescein-Anregungs- und Emissionswellenlängen (485nm/535nm) durchgeführt werden. Die Fluoreszenz steigt proportional der ssDNA Konzentration der Lösung.

In der vorliegenden Arbeit wurden die OliGreen-Messungen in Mikrotiterplatten (96 well, PP, schwarz; NUNC) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die vorbereiteten Proben wurden in die wells der Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des gleichen Volumens an OliGreen Arbeitslösung. Nach einer kurzen Inkubation des Ansatzes für 3-5min wurde die Fluoreszenz gemessen (Wallac 1420 Victor<sup>2</sup>V Multilabel Counter; PerkinElmer Wallac; Messbedingungen: prompt fluorometry, Wellenlänge Ex 485nm/Em 535nm, Messzeit 1s, CW-Lampenenergie 9728, Probenvolumen 200µl). Die Bestimmung der DNA Konzentration in den Proben erfolgte über eine Eichkurve, die mit der random DNA-Oligonukleotid Bibliothek (BANK) in einem Konzentrationsbereich von 1ng/ml bis 800ng/ml unter gleichen Bedingungen aufgenommen wurde. Die Nachweisgrenze liegt hier bei 5-10ng/ml ssDNA (entspricht 1-2ng/Messvolumen).

### *Quantifizierung von Fluorescein-markierter ssDNA mittels Fluoreszenzmessung*

Über die Einführung einer Fluoreszenzmarkierung am 5'-Ende der ssDNA ist deren direkte Quantifizierung in Proben mit Hilfe eines Fluorometers möglich. Ein Zusatz spezieller Lösungen ist hier nicht notwendig, so dass die Proben nach der Messung weiter bearbeitet werden können. Die Markierung der DNA erfolgt in der PCR mittels eines modifizierten Primers, der am 5'-Ende ein Fluoresceinmolekül trägt. Die relevante ssDNA wird anschließend aus dem doppelsträngigen PCR Produkt gereinigt (s. Kap.2.3.3.). Analog zur OliGreen Quantifizierung wurden die Messungen in Mikrotiterplatten bei einem Messvolumen von 100µl durchgeführt (96 well Platten aus PP, schwarz; NUNC; Wallac 1420 Victor<sup>2</sup>V Multilabel Counter; PerkinElmer Wallac; Messbedingungen: prompt fluorometry, Fluorescein Wellenlänge Ex 485nm/Em 535nm, Messzeit 1s, CW-Lampenenergie 9728). Für die Bestimmung der DNA Konzentration in den Proben erfolgte auch hier die Aufnahme einer Eichkurve mit definierten Mengen an markierter ssDNA (10ng/ml - 1000(4000)ng/ml). Die Nachweisgrenze liegt unter den angewandten Bedingungen bei 10-50ng/ml markierter ssDNA (entspricht 1-5ng/Messvolumen).

### 2.2.2. Ethanolfällung von Nukleinsäuren

Da bei der Aptamerherstellung mit sehr geringen DNA Mengen und kleinen ssDNA Fragmenten (<100nt) gearbeitet wird, muss auch die Ethanolpräzipitation diesen Erfordernissen angepasst werden. In der Literatur wird der Zusatz verschiedener Carrier empfohlen, wie z.B. Glycogen, tRNA oder Heringssperma DNA. Gaillard und Strauss (1990) beschreiben den erfolgreichen Einsatz von linearem Polyacrylamid, als einen sehr effizienten und neutralen Carrier für die Präzipitation geringer DNA Mengen (pg-Bereich) mit Ethanol [31].

In der vorliegenden Arbeit wird der zu fällenden DNA Lösung 6µl 0,25%-iges lineares Polyacrylamid, 1/10 Volumen Na-acetat [pH 5,2] und 2,5 Volumen Ethanol (96%) zugesetzt. Die Fällung erfolgt bei -70°C für 30min (oder ÜN). Nach einer Zentrifugation bei 12.000rpm für 15min (4°C) wird das erhaltene Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend im Rotationsverdampfer für 10-15min getrocknet. Die DNA kann dann in entsprechendem Puffer aufgenommen und weiter bearbeitet werden.

### 2.2.3. Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

#### *Agarose-Gelelektrophorese*

Im Falle von kleinen dsDNA-Fragmenten mit  $\leq 100$ bp (PCR-Produkte bzw. Spaltprodukte) erfolgte die Agarose-Gelelektrophorese unter Verwendung von 2% DNA-Agar von Serva (bzw. 2,5% Agarose LE von Promega) in 1x TBE-Puffer (90mM Tris, 90mM Borsäure, 2mM Na-EDTA). Zur Visualisierung der aufgetrennten DNA Banden unter UV-Licht wurde dem Gel Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5µg/ml zugesetzt [32;33]. Sämtliche Proben wurden vor der Elektrophorese mit Probenpuffer (5x GLB = 50% Glycerin, 1x TE pH7,4, 0,2% SDS, 0,25% Orange G (bzw. eine Kombination aus Bromphenolblau, Xylencyanol oder Orange G) in reinst Wasser; Endkonz. 1x GLB) gemischt. Zur Abschätzung der Größe der DNA Fragmente wurde außerdem ein DNA Marker mitaufgetragen (25bp DNA Ladder von Invitrogen GmbH; 0,5µg/Slot).

#### *Polyacrylamid-Gelelektrophorese*

Für die Untersuchung der ssDNA wurde die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) unter stark denaturierenden Bedingungen durchgeführt [32;33].

Das Polyacrylamidgel setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen: 10% Acrylamid/ N,N'-Methylenbisacrylamid (9,5:0,5), 1x TBE, 7M Harnstoff, 20% Formamid. Die Polymerisierung wird nach Zugabe von APS (0,05%) und TEMED (0,05%) gestartet. Als Laufpuffer wird analog zur Agarose-Gelelektrophorese 1x TBE verwendet. Sämtliche Proben

werden unmittelbar vor der Elektrophorese 1:1 mit Formamid-Farbmarker (2x FF = 98% Formamid, 20mM Na-EDTA, 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Orange G) versetzt und 5min bei 94°C inkubiert mit nachfolgender Abkühlung auf Eis. Der DNA Marker (25bp DNA Ladder von Invitrogen GmbH; 0,75µg/Slot) zur Größenbestimmung der Fragmente im Gel wird entsprechend den Proben behandelt.

Für die Visualisierung der Banden nach der Elektrophorese wird das Gel in einer Ethidiumbromidlösung (1µg/ml Ethidiumbromid in 1x TBE) gefärbt und kann anschließend unter UV-Licht ausgewertet werden.

Da Ethidiumbromid eine stark mutagene Wirkung hat, kann für kritische Proben, bei denen die Intaktheit der DNA für deren Weiterverarbeitung gewährleistet bleiben muss, die Methode des UV-Shadowing eingesetzt werden [34]. Hierfür wird das ungefärbte Gel in Cellophanfolie eingeschlagen und auf eine Kieselgelplatte mit integrierten Fluoreszenzfarbstoff (TLC-Platte Kieselgel60F254, Merck) gelegt. Nach Bestrahlung des Gels mit UV-Licht (254nm) erscheinen die DNA Banden als dunkle Schatten gegen einen gleichmäßig fluoreszierenden Hintergrund. Die UV-Bestrahlung sollte nur kurzzeitig erfolgen, da sonst ebenfalls Schäden an der DNA entstehen können.

Bei gelelektrophoretischer Auftrennung von Fluorescein-markierter ssDNA ist die Visualisierung unter UV-Licht durch die Eigenfluoreszenz der markierten DNA möglich. Auch hier sollte die UV-Bestrahlung möglichst gering gehalten werden.

#### **2.2.4. Gelelution von Nukleinsäuren**

Zur Wiedergewinnung von ssDNA aus denaturierenden Polyacrylamidgelen wurde die entsprechende Bande unter UV-Licht markiert (über Visualisierung mittels UV-Shadowing bzw. der Eigenfluoreszenz Fluorescein-markierter ssDNA) und anschließend mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die gewonnenen Gelstücke wurden in ein Eppendorfgefäß überführt, zerquetscht und in 5fachen Volumen Elutionspuffer (PAGE-EB: 2mM Na-EDTA, 300mM Na-acetat [pH 7,8]) suspendiert. Die passive Elution der DNA aus dem Gel erfolgte während einer Inkubation bei 80°C und 1400rpm für 45min [32;33]. Zum Abschluss wurde die Suspension durch silanisierte Glaswolle filtriert und die DNA gefällt.

### 2.3. *In vitro* Selektion zur Gewinnung von ssDNA Aptameren

Basierend auf der Eigenschaft von Nukleinsäuren, komplexe dreidimensionale Strukturen zu bilden, die auch mit nukleinsäurefremden Molekülen interagieren, wurde eine *in vitro* Selektions- und Amplifikationstechnik (SELEX-Verfahren) entwickelt, um aus einem großen Pool von synthetischen Oligomeren (RNA bzw. ssDNA) mit variablen Sequenzabfolgen diejenigen zu selektieren (Aptamere), die aufgrund ihrer Struktur hohe Affinitäten zu einer vorgegebenen Zielstruktur haben [1;11;35]. Das SELEX-Verfahren ist jedoch keine festgeschriebene und einfach übertragbare Methode. Vielmehr unterscheiden sich die einzelnen Arbeitsschritte je nach Selektion von RNA Aptameren oder ssDNA Aptameren. Darüber hinaus muss das Verfahren den konkreten Gegebenheiten, wie z. B. der Wahl der random DNA-Oligonukleotid Bibliothek und der Zielmoleküle oder dem angestrebten Einsatz der Aptamere, angepasst werden.

Ein Schwerpunkt dieses Projektes war die methodische Etablierung des SELEX-Prozesses zur Gewinnung von ssDNA Aptameren mit allen Teilschritten und dessen Anpassung an das spezielle Zielmolekül (Kap.2.3.1.). In Einzelexperimenten wurde zunächst die Handhabung der Zielmoleküle untersucht, um beispielsweise in den verschiedenen Phasen des SELEX-Prozesses eine effiziente und verlustfreie Abtrennung der Zielmoleküle vom umgebenden Puffermilieu zu erreichen. Weitere Vorversuche betrafen die Reaktionsbedingungen (Puffersystem, Temperatur, Zeit, Konzentration an ssDNA und Zielmolekül) für die Bindung zwischen ssDNA und Zielmolekül sowie für die Elution gebundener ssDNA vom Zielmolekül. Darüber hinaus wurde mit zwei random DNA-Oligonukleotid Bibliotheken experimentiert, was auch die Testung einiger Amplifikationsparameter (Konzentration an Primer, dNTP und MgCl<sub>2</sub>; Annealingtemperatur und -zeit, Elongationszeit) zum Auffinden geeigneter PCR-Bedingungen einschloss. Für die Reinigung der relevanten ssDNA aus dem doppelsträngigen PCR-Produkt wurden ebenfalls mehrere Methoden getestet. Schließlich wurden verschiedene SELEX-Versuche durchgeführt. Aus deren Verlauf ergaben sich Ansatzpunkte bzw. Notwendigkeiten für eine Modifikation und Optimierung der Reaktionsparameter, die ständig in den SELEX-Prozess eingearbeitet wurden. Der Prozess der Methodenetablierung wird hier jedoch nicht weiter aufgeführt, so dass im vorliegenden Ergebnisbericht nur die aktuellen SELEX-Parameter und deren Anwendung in den letzten beiden SELEX-Versuchen beschrieben werden.

### 2.3.1. Targetmoleküle

Für die Etablierung und Anwendung der in vitro Selektions- und Amplifikationsmethode zur Gewinnung von ssDNA Aptameren wurden zwei verschiedene Targets gewählt:

1. *komplexe Zielstrukturen mit unbekanntem Oberflächeneigenschaften als umweltrelevante Targets*

Sporen des Schimmelpilzes *P. expansum* (Typstamm DSM 1282; Sporengroße  $\varnothing$  3,5 $\mu$ m)

2. *definierte Zielstrukturen als Modellsystem für den SELEX-Prozess und die Biosensorapplikation von Aptameren*

Dynabeads M-280 Streptavidin (magnetische Polystyren Partikel mit immobilisiertem Streptavidin auf der Oberfläche; Größe  $\varnothing$  2.8 $\mu$ m;  $6.7 \times 10^8$  Beads/ml von der Firma Dynal Biotech GmbH, Hamburg) bzw. micromer Streptavidin-Beads (Polystyren Partikel mit immobilisiertem Streptavidin auf der Oberfläche; Größe  $\varnothing$  3 $\mu$ m von der Firma micromod Partikeltechnologie GmbH, Rostock)

Beide Zielstrukturen sind in Größe, Form und Handhabbarkeit vergleichbar, was eine Voraussetzung für die Wahl der Streptavidin-Beads als Modellsystem darstellte.

### 2.3.2. Random DNA-Oligonukleotid Bibliothek und Primer

In Anlehnung an die Arbeiten von Crameri and Stemmer (1993) wurde eine random DNA-Oligonukleotid Bibliothek (BANK-A) mit einer Gesamtlänge von 96 Basen für die hier dargestellten SELEX-Experimente genutzt [36]. Diese Oligomere haben einen internen variablen Bereich von 60 Basen, welcher am 5'-Ende und 3'-Ende jeweils von einer spezifischen Sequenz flankiert wird. Diese definierten Regionen, bestehend aus je 18 Basen, dienen als Primerbindungsstellen in der PCR zur Amplifikation der Oligomere (Abb.2).

Die random DNA-Oligonukleotid Bibliothek (BANK-A) wurde kommerziell von der Firma Invitrogen GmbH bezogen (chemische Synthese, PAGE gereinigt). Für die PCR wurden neben den unmodifizierten Primern AP10 und AP20 (Invitrogen) weitere Primer mit speziellen Modifikationen am 5'-Ende bzw. 3'-Ende eingesetzt (Abb.2). Diese Modifikationen dienen einerseits der Markierung eines DNA-Stranges mit Fluorescein für dessen Quantifizierung (AP60; Invitrogen) und andererseits der Reinigung von ssDNA aus dem doppelsträngigen PCR-Produkt mittels verschiedener Methoden (TER-AP20, AP20Ribo; IBA).



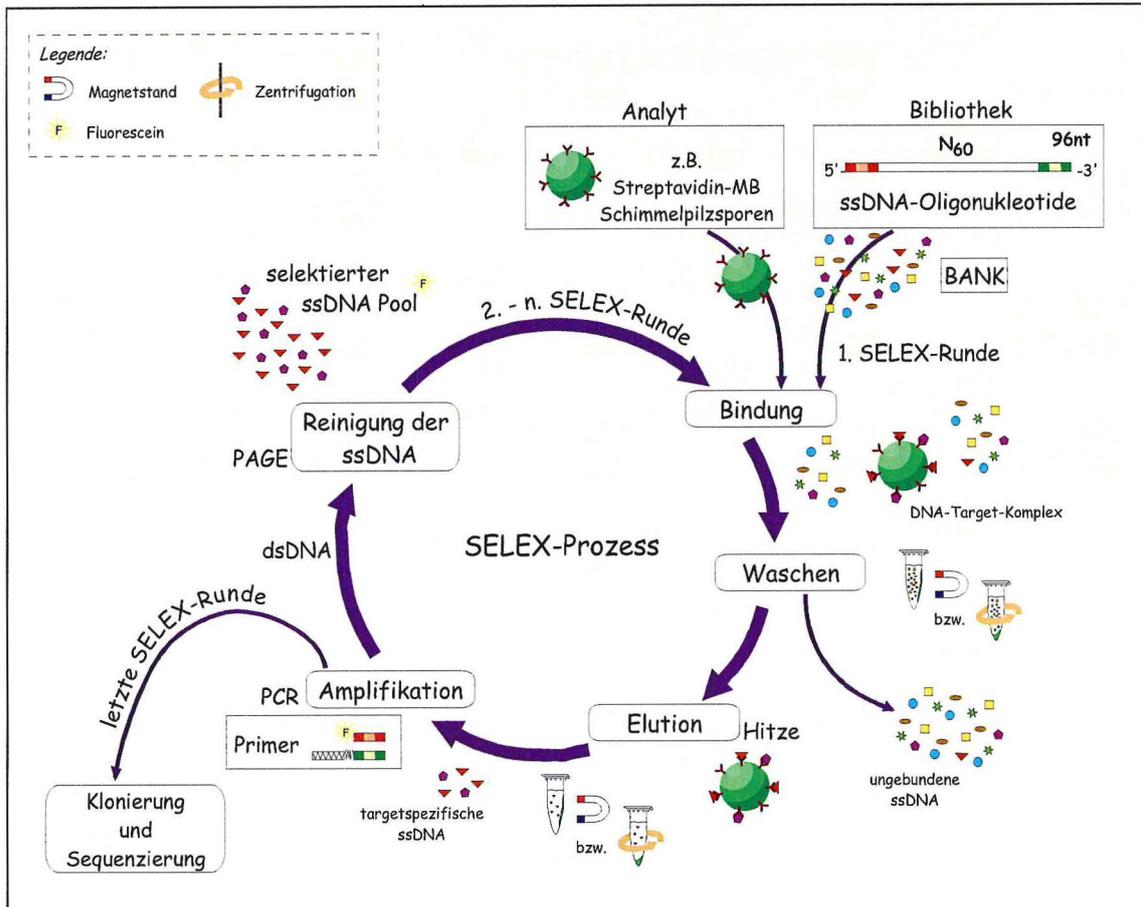


Abb. 3 allgemeine Darstellung des SELEX-Prozesses zur Gewinnung von ssDNA Aptameren für Streptavidin-MB bzw. Schimmelpilzsporen

Die nachfolgenden Ausführungen beschreiben detaillierter die einzelnen Schritte einer Runde im SELEX-Prozess.

➤ **Hauptschritte einer Runde im SELEX-Prozess (SELEX-Protokoll)**

	Puffersystem	- Bindungspuffer / Waschpuffer: BB+(KC) <sub>0,02%</sub> T (100mM NaCl, 20mM Tris/HCl [pH 7,6], 2mM MgCl <sub>2</sub> , 5mM KCl, 1mM CaCl <sub>2</sub> , 0,02% Tween 20)  - Elutionspuffer: EB+(3) (40mM Tris/HCl [pH 8], 3,5M Harnstoff, 0,02% Tween 20)
①	Waschen des Zielmoleküls (Streptavidin-MB bzw. Sporen)	8x in je 500µl BB+(KC) <sub>0,02%</sub> T (Abtrennung im Magnetstand bzw. durch Zentrifugation bei 5000rpm für 1,5min)
②	Bindungsreaktion	in 500µl BB+(KC) <sub>0,02%</sub> T mit (1x 10 <sup>7</sup> ) - 1x 10 <sup>8</sup> Streptavidin-MB bzw. Sporen und mit min. 2nmol (1. Runde) bzw. gesamte selektierte ssDNA aus der Vorrunde (ab 2. Runde) → 30min bei 21°C und 800rpm

③	Trennung des DNA-Zielmolekül-Komplexes von ungebundener ssDNA	5x waschen in je 500µl BB+(KC) <sub>0.02%T</sub> (Abtrennung im Magnetstand bzw. durch Zentrifugation bei 5000rpm für 1,5min)
④	Elution der am Zielmolekül gebundenen ssDNA	2x in 200µl EB+(3) → je 7min bei 80°C und 800rpm mit anschließender Fällung → Ethanol-fällung der eluierten ssDNA und Aufnahme der DNA in BB+(KC) <sub>0.02%T</sub>
⑤	Quantifizierung der ssDNA in den SELEX-Fractionen	Konzentrationsbestimmung der ssDNA in den SELEX-Fractionen mittels Fluoreszenzmessung (direkt über die Fluorescein-Markierung oder mittels OliGreen bei unmarkierter ssDNA)
⑥	Amplifikation	Amplifikation der gesamten eluierten bzw. selektierten ssDNA in 15 PCR Ansätzen (je 100µl) Zusammenführung der PCR-Produkte und Einengung des Volumens durch Ethanol-fällung
⑦	Generierung eines neuen Pools an selektierter ssDNA (Ausgangsmaterial für eine erneute Bindungsreaktion)	Reinigung des relevanten (+) Stranges aus dem doppelsträngigen PCR-Produkt mittels denaturierender PAGE und Gelelution

#### Bindungsreaktion und Waschschritte (① - ③)

Die Zielmoleküle wurden vor Beginn jeder SELEX-Runde mit BB+(KC)<sub>0.02%T</sub> gewaschen. Die Abtrennung der Zielmoleküle vom umgebenden Puffermilieu erfolgte mittels eines Magnetstandes im Falle der Streptavidin-MB (Abscheidung an der Gefäßwand) bzw. durch Zentrifugation im Falle der Schimmelpilzsporen (Ausbildung eines Pellets am Gefäßboden). Beim letzten Waschschritt wurde die Zahl der Zielmoleküle mittels einer Neubauer-Zählkammer im Phasenkontrastmikroskop bestimmt und die entsprechende Menge in das Bindungsgefäß überführt. Die Zielmoleküle wurden in einer Menge von zunächst 10<sup>7</sup> Beads bzw. Sporen pro Runde eingesetzt, welche ab der 6. bzw. 5. Runde auf 10<sup>8</sup> erhöht wurde. Parallel zu den Waschschritten wurde die DNA-Lösung in BB+(KC)<sub>0.02%T</sub> für die Bindung (Ausgangs-DNA) vorbereitet. In der ersten SELEX-Runde kamen ~3,3nmol der random DNA-Oligonukleotid Bibliothek direkt zum Einsatz, in jeder weiteren Runde 200pmol bzw. die gesamte, selektierte ssDNA der Vorrunde. Unmittelbar vor der Bindungsreaktion erfolgte die thermische Equilibrierung der ssDNA bei 90°C für 10min mit anschließender Inkubation auf Eis für 15min und bei RT für 6-12min. Die Bindung wurde gestartet nach Suspendierung der gewaschenen Zielmoleküle in der ssDNA-Lösung. Die Bindungsreaktion, sowie alle weiteren Arbeiten mit der ssDNA wurden in silikonisierten Eppendorfgefäßen und mit silikonisierten Spitzen durchgeführt, um die unspezifische Adsorption der ssDNA an Glas- oder Kunststoffoberflächen zu minimieren.

Nach der Bindungsreaktion wurde die ungebundene ssDNA abgenommen (Nichtbinderfraktion NB) und der DNA-Target-Komplex mehrfach mit  $\text{BB}+(\text{KC})_{0.02\%T}$  gewaschen (einzelne Waschfraktionen WB gesammelt).

#### *Elution (④)*

Für die Elution der am Zielmolekül gebundenen ssDNA wurde der DNA-Target-Komplex in  $\text{EB}+(3)$  aufgenommen und zusätzlich einer Hitzebehandlung unterzogen. Die auf diese Weise eluierte ssDNA wurde gesammelt und anschließend mittels Ethanol gefällt. Die Resuspendierung erfolgte in einem geringeren Volumen  $\text{BB}+(\text{KC})_{0.02\%T}$  (45µl in Runde 1, 100-300µl ab Runde 2).

#### *Quantifizierung (⑤)*

Die vom Zielmolekül eluierte ssDNA wurde zusammen mit der ssDNA aus den anderen SELEX-Fractionen (Ausgangs-ssDNA, Nichtbinderfraktion und Waschfraktionen) der aktuellen Runde über eine Fluoreszenzmessung im Multilabel Counter (1420 Victor<sup>2</sup>V; PerkinElmer Wallac) quantifiziert (Kap.2.2.1.). Dies erfolgte ab der 2. SELEX-Runde direkt, da die eingesetzte ssDNA am 5'-Ende mit Fluorescein markiert ist. In der 1. SELEX-Runde war es dagegen notwendig einen für ssDNA spezifischen Fluoreszenzfarbstoff (OliGreen) einzusetzen. In beiden Fällen konnte die DNA Menge in den SELEX-Fractionen mittels einer Eichkurve bestimmt werden. Bei beiden Methoden ist zu beachten, dass bestimmte Komponenten in der Messlösung die Intensität des Fluoreszenzsignals mehr oder weniger stark beeinflussen. Daher sollten die Messbedingungen, insbesondere die Pufferzusammensetzung und das Messvolumen, immer gleich gewählt und ebenso auf die Aufnahme der Eichkurve angewendet werden.

Zur Kontrolle wurde außerdem die ssDNA Konzentration der Ausgangs-ssDNA und der Nichtbinderfraktion über die Bestimmung der optischen Dichte ( $\text{OD}_{260\text{nm}}$ ) ermittelt.

#### *Amplifikation (⑥)*

Die Amplifikation der gesamten, selektierten ssDNA erfolgte nach deren Quantifizierung im präparativen Maßstab (15 PCR-Ansätze zu je 100µl). Alle Komponenten und die PCR-Bedingungen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Die Taq DNA Polymerase mit dem entsprechenden Reaktionspuffer (10x; 500mM KCl, 100mM Tris/HCl [pH 9] 1% Triton X-100) und der  $\text{MgCl}_2$ -Lösung wurde von der Firma Promega GmbH bezogen. Durch die Anwendung der Hot-Start-Methode (separate Zugabe der Taq Polymerase bei 80°C nach dem fünfminütigen Denaturierungsschritt) wurden unspezifische Hybridisierungen der Primer in der Vorheizphase vermieden.

PCR Komponenten	Konz. der Stammlösung	Volumen / Ansatz (100µl)	Konz. im Ansatz (100µl)
(+) Primer	100µM	1µl	1µM
(-) Primer	100µM	1µl	1µM
dNTP	5mM	4µl	0,2mM
MgCl <sub>2</sub>	25mM	7,6µl	1,9mM
Puffer	10x	10µl	1x
Taq Polymerase	5U/µl	1µl	5U
selekt. ssDNA bzw. reinst Wasser		75,4µl	

PCR Schritte	Temperatur	Zeit	
Vorheizen	80°C		
Denaturierung	94°C	5min	
Pause	80°C		Zugabe der Taq Pol.
Denaturierung	94°C	1min	} 30 Zyklen
Annealing	47°C	1min	
Elongation	72°C	1min	
A-Überhang	72°C	10min	
Kühlen	4°C		

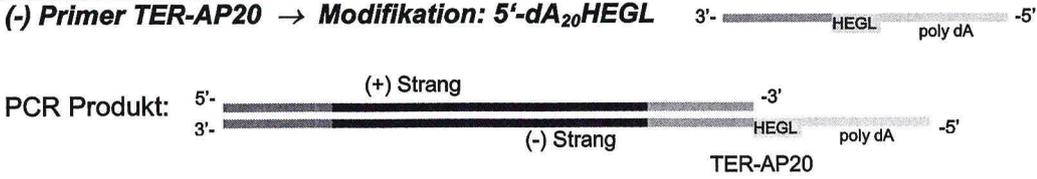
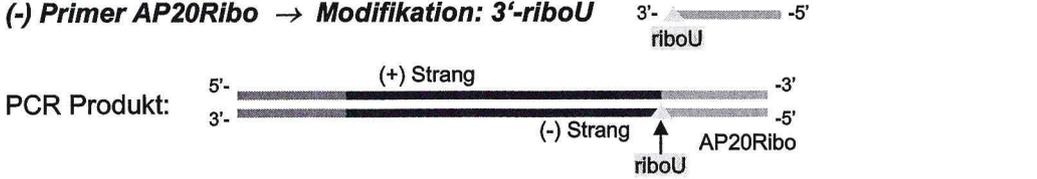
Tab. 1 Komponenten und Bedingungen für die PCR

Als PCR-Primer wurden 5'-modifizierte Primer eingesetzt (Kap.2.3.2.). Einerseits erfolgte die Markierung des relevanten (+) Stranges mit Fluorescein durch Einsatz des (+) Primers AP60 (5'-Fluorescein). Andererseits wurde für die Synthese des Gegenstranges ein spezieller (-) Primer (TER-AP20) eingesetzt, der für die größenabhängige Auftrennung beider Stränge in einer denaturierenden PAGE genutzt wird (s. unten).

Nach Beendigung der PCR wurden die Produkte in einer Agarose-Gelelektrophorese (2µl je Ansatz) kontrolliert. Anschließend erfolgte die Ethanol-fällung der PCR Produkte und die Aufnahme der gefällten DNA in insgesamt 100µl TE (10mM Tris/HCl [pH 7,4], 1mM Na-EDTA).

#### *Reinigung der relevanten ssDNA (⑦)*

Da die PCR doppelsträngige Produkte liefert muss der relevante (+) Strang aus der dsDNA gereinigt werden, um für eine erneute SELEX-Runde zur Verfügung zu stehen. Hierfür wurden verschiedene Methoden hinsichtlich ihrer Handhabung und Effizienz getestet. Diese Methoden basieren in der Regel auf dem Einsatz eines speziellen Primers in der PCR und einer Nachfolgereaktion. Zwei Methoden haben sich dabei herauskristallisiert, die sich sehr gut für die Reinigung von ssDNA aus PCR-Produkten in der vorliegenden Arbeit eignen. Die nachfolgende Tabelle erklärt die Funktionsweise der beiden Methoden (Tab.2).

<p><b>1. (-) Primer TER-AP20 → Modifikation: 5'-dA<sub>20</sub>HEGL</b></p>	 <p>Nachfolgereaktion: keine  → der Primer TER-AP20 trägt am 5'-Ende einen Hexaethylenglycol-Spacer und eine polyA-Verlängerung (dA<sub>20</sub>);  der HEGL-Spacer wirkt als Terminator für die Taq Polymerase, so dass die Elongation des (+) Stranges hier abbricht, der (-) Strang bleibt somit um 20 Nukleotide länger und kann in der denaturierenden PAGE eindeutig abgetrennt werden [37]</p>
<p><b>2. (-) Primer AP20Ribo → Modifikation: 3'-riboU</b></p>	 <p>Nachfolgereaktion: alkalische Hydrolyse (in 0,25M NaOH, 30min bei 80°C) → dadurch erfolgt die selektive Spaltung des (-) Stranges an der riboU Position (Ribosebindung), resultierend in einer Verkürzung dieses Stranges um 18 Nukleotide [38;39];  in der nachfolgenden denaturierenden PAGE können beide Stränge aufgrund des Größenunterschiedes eindeutig getrennt werden</p>

Tab. 2 Methoden zur Reinigung von ssDNA aus PCR-Produkten

Im SELEX-Prozess wurde TER-AP20 als Gegenstrangprimer in der PCR eingesetzt, so dass die PCR-Produkte nach deren Fällung direkt in der denaturierenden PAGE aufgetrennt werden konnten. Aufgrund des Größenunterschiedes beider Stränge konnte der relevante (+) Strang eindeutig identifiziert und eluiert werden (Kap.2.2.4.). Nach erneuter Ethanol-fällung der geleuierten ssDNA und Aufnahme in BB+(KC)<sub>0,02%T</sub> steht ein neuer, selektierter ssDNA Pool für die nächste SELEX-Runde zur Verfügung.

Im Falle einer erfolgreichen Anreicherung targetspezifischer ssDNA (Aptamere) über mehrere SELEX-Runden wurde der SELEX-Prozess nach der PCR (hier mit unmodifizierten Primern AP10 und AP20) der letzten Runde abgebrochen. Die PCR-Produkte wurden kloniert und individuelle Aptamer Klone analysiert.

➤ weiterführende Schritte nach Beendigung des SELEX-Prozesses

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Klonierung</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Klonierung der selektierten ssDNA aus der letzten SELEX-Runde in den Vektor pCR2.1-TOPO und Transformation in <i>E. coli</i> TOP10</li> <li>- Analyse der Transformanten (Kolonie-PCR, pDNA Präparation und Restriktionsspaltung)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sequenzierung</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- pDNA Präparation und Auftragssequenzierung einzelner Aptamer-Klone</li> </ul>

<ul style="list-style-type: none"> <li>Sequenzanalyse</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Größe und Basenzusammensetzung</li> <li>- Sequenzvergleiche</li> <li>- Sekundärstrukturanalyse</li> </ul>
<i>weitere Charakterisierung individueller Aptamer-Klone entsprechend den Zielsetzungen der Gewinnung von Aptameren für ein spezielles Zielmolekül</i>	

## 2.4. Klonierung selektierter Aptamer-DNA

### 2.4.1. Klonierung der selektierten DNA nach der letzten SELEX-Runde

Nach erfolgreicher Anreicherung spezifischer ssDNA wurden die PCR-Produkte der letzten SELEX-Runde in einen geeigneten Vektor kloniert und in *E. coli* transformiert. Hierfür wurde der TOPO TA Cloning Kit von INVITROGEN (#K4500-01) gewählt, da er eine direkte und effiziente Klonierung von PCR-Produkten erlaubt (Abb.4).

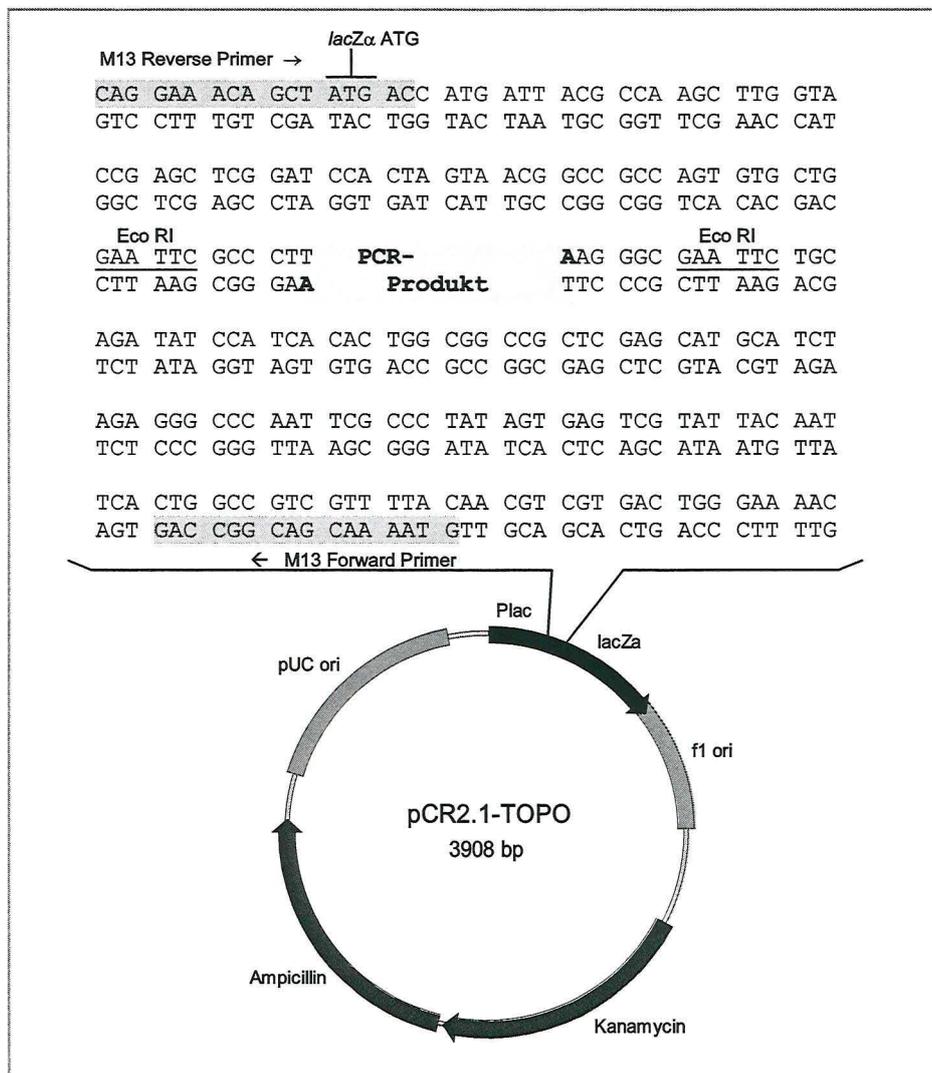


Abb. 4 Vektorkarte von pCR2.1-TOPO mit Multicloning Site

Die Methodik basiert auf der Eigenschaft der Taq Polymerase als terminale Transferase zu fungieren und somit templateunabhängig ein einzelnes Deoxyadenosin (A) an die 3'-Enden der PCR-Produkte zu addieren. Dies ermöglicht die direkte Insertion der PCR-Produkte in den linearisierten und mit einem 3'-T-Überhang (Thymidin) modifizierten Vektor (pCR2.1-TOPO) mittels Topoisomerase I. Außerdem sind in dem Kit die chemisch kompetenten Zellen von *E. coli* TOP10 für die anschließende Transformation enthalten.

Die Klonierungsreaktion und die Transformation wurden entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt (Manual „TOPO TA Cloning“ Version N). Aus jedem Transformationsansatz wurden 1x 50µl und 2x 100µl der Zellen auf Selektivplatten (LB Agar Platten mit 50µg/ml Ampicillin; LB-Agar = LB Agar, Powder (Lennox L Agar) von GIBCO BRL) ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert. Vor der Transformation wurden auf die Selektivplatten außerdem je 40µl X-Gal (40mg/ml) aufgebracht, um später über ein „blue/white screening“ positive Transformanten mit einem rekombinanten Plasmid zu identifizieren. Diese Methode beruht auf der Expression einer funktionellen  $\beta$ -Galaktosidase. Das Plasmid pCR2.1-TOPO enthält in der Klonierungsregion ein Teil des *lacZ* Gens von *E. coli* (*lacZ $\alpha$* ). Wenn ein DNA-Fragment in diese Region eingebaut wird, kommt es zur Unterbrechung des Leserahmens von *lacZ $\alpha$*  und eine funktionelle  $\beta$ -Galaktosidase kann nicht mehr gebildet werden. Dieser Vorgang kann mittels X-Gal im Kulturmedium und einer Farbreaktion sichtbar gemacht werden. X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactosid) ist ein farbloses Substrat für die  $\beta$ -Galaktosidase. Es wird durch das Enzym zu einem blauen Produkt (5-Brom-4-chlorindigo) umgesetzt. Dementsprechend bilden positive Transformanten keine funktionelle  $\beta$ -Galaktosidase, so dass X-Gal nicht umgesetzt wird und weiße Kolonien wachsen. Blaue Kolonien repräsentieren hiernach negative Transformanten.

#### **2.4.2. Überprüfung der Transformanten mittels Kolonie-PCR**

Nach der Transformation ist es notwendig die positiven Transformanten hinsichtlich der Korrektheit der Plasmid-DNA (pDNA) bzw. des eingebauten Inserts (PCR-Produkt) zu überprüfen. Für eine schnelle Analyse einer relativ großen Anzahl von Transformanten eignet sich die Kolonie-PCR sehr gut [40]. Hierbei wird wenig Zellmaterial aus einer Kolonie ohne Vorbehandlung direkt in den PCR Ansatz gegeben. Der anfängliche Denaturierungsschritt von 10min 95°C bei der PCR ist ausreichend, um die *E. coli* Zellen aufzuschließen und die DNA freizusetzen. Wichtig bei dieser Analyse ist die Wahl der Primer, die aus einer Kombination aus plasmidspezifischem Primer und insertspezifischem Primer bestehen sollte. Auf diese Weise liefern nur die Transformanten ein PCR-Produkt

bestimmter Größe, die das Plasmid mit dem relevanten Insert enthalten. Außerdem kann die Einbaurichtung des Inserts bestimmt werden.

➤ **Vorgehensweise:**

- Zunächst wurden zwei PCR-Mastermixe hergestellt, die sämtliche Komponenten entsprechend der zu analysierenden Koloniezahl enthielten, jedoch keine Template-DNA (Tab.3). Je 50µl dieser Mastermixe wurde auf PCR-Gefäße verteilt und bis zum Start der PCR auf Eis (4°C) gestellt.

PCR Komponenten	je PCR Ansatz	
	Endk.	Vol.
Template	Zellmaterial	
Primer AP10 [100µM]	50pmol 1µM	0,5 µl
Primer M13FOR bzw. M13REV [je 100µM]	50pmol 1µM	0,5 µl
dNTP [5mM]	10nmol 0,2mM	2 µl
10x Puffer	1x	5 µl
MgCl <sub>2</sub> [25mM]	1,9mM	3,8 µl
Taq DNA Pol. [5U/µl]	2,5U	0,5 µl
A.bidest.		37,7 µl
Ansatzvol.		50 µl

} Multiplizieren entsprechend der Probenanzahl

PCR Bedingungen		
Vorheizen	80°C	Pause
Denaturieren	94°C	10min
Denaturieren	94°C	1min
Annealing	50°C	1min
Elongation	72°C	1min
A-Überhang	72°C	10min
Kühlen	4°C	Ende

} 30 Zyklen

Tab. 3 PCR Komponenten und Bedingungen für die Kolonie-PCR

Mastermix #1 enthielt die Primerkombination AP10/M13REV und Mastermix #2 AP10/M13FOR. AP10 stellt den insertspezifischen Primer dar und entspricht dem Primer AP60 aus dem SELEX-Prozess (Kap. 2.3.2.), jedoch ohne Modifikation. Die Primer M13REV bzw. M13FOR entsprechen Regionen aus der Plasmid-DNA-Sequenz und flankieren den Einbauort des PCR-Produktes (Abb.4). Beide Primerkombinationen sind notwendig, da vorab die Einbaurichtung der PCR-Produkte nicht bekannt ist.

- Mit einem sterilen Zahnstocher wurde Zellmaterial aus einer weißen Transformanten-Kolonie entnommen und zunächst auf eine Selektivplatte (LB Agar Platte mit 50µg/ml Ampicillin) ausgestrichen und anschließend direkt in den vorbereiteten PCR Ansatz suspendiert (je Kolonie zwei PCR Ansätze mit Mastermix #1 bzw. #2). Nachdem die Beladung aller PCR Ansätze mit Zellmaterial abgeschlossen war, wurde die PCR gestartet.
- Zur Visualisierung und Bewertung der amplifizierten DNA-Fragmente wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (2% DNA-Agar; Einsatz von 4µl je PCR Ansatz und Slot).

- Die Selektivplatte mit den Zellausstrichen wurde ÜN bei 37°C inkubiert und diente später als Ausgangsmaterial für die Kultivierung einzelner Klone in größeren Volumina für die pDNA Präparation.

### 2.4.3. Präparation von pDNA aus *E. coli* nach Sambrook et al. (2001)

Die Präparation von pDNA aus den *E. coli* Transformantenzellen (von verschiedenen Aptamer Klonen) wurde in Anlehnung an die von Sambrook et al. (2001) beschriebene Methode der alkalischen Lyse durchgeführt [32].

#### ➤ schrittweise Vorgehensweise:

- ansetzen einer 12ml ÜN-Kultur in LB + Ampicillin [50µg/ml] bei 37°C  
(LB-Medium = LB Broth Base, Powder (Lennox L Broth Base) von GIBCO BRL)
- 2ml der Kultur mit sterilem Glycerin zu einer Endkonz. von 10-15% versetzen und für die Stammhaltung bei -80°C einfrieren
- Rest der Zellen abzentrifugieren bei 6'000rpm für 10min (20°C)
- Zellen in 200µl Lysemedium (25mM Tris/HCl pH8, 10mM Na-EDTA, 50mM Glucose) aufnehmen und in ein 1.5ml Eppendorfgefäß überführen (gut homogenisieren durch vortexen) und 20min im Eisbad inkubieren
- Zugabe von 450µl alkalischer SDS-Lösung (1% SDS, 0.2M NaOH), mischen durch mehrmaliges Umdrehen des Eppendorfgefäßes (nicht vortexen) und max. 5min im Eisbad inkubieren
- Zugabe von 350µl 3M Na-acetat [pH 4.8], mischen durch mehrmaliges Umdrehen (nicht vortexen) und 20min im Eisbad inkubieren
- 15min zentrifugieren bei 12'000rpm, 20°C
- Überstand vorsichtig in ein neues 2ml Eppendorfgefäß abnehmen (mit Pipette) und 1Vol. Isopropanol (RT) zugeben
- 30min bei RT inkubieren (oder ÜN bei -20°C)
- zentrifugieren für 10min bei 10'000rpm, 20°C
- Überstand verwerfen und Pellet gut abtropfen lassen
- Pellet in 500µl TE [pH 8] (10mM Tris/HCl, 1mM Na-EDTA) + 20µg/ml RNase A aufnehmen und 30min (bis 1h) bei 37°C im Wasserbad inkubieren
- Zugabe von 1Vol. Phenol/Chloroform (1:1), vortexen und 10min zentrifugieren bei 10'000rpm, 20°C
- obere wässrige Phase abnehmen und evtl. Phenol/Chloroform Behandlung wiederholen
- obere wässrige Phase abnehmen und Zugabe von 1Vol. Chloroform, Zentrifugation siehe oben

- obere wässrige Phase abnehmen und Zugabe von 2Vol. 96% Ethanol (RT), vortexen
- 30min bei RT inkubieren (oder ÜN bei -20°C)
- 15min bei 12'000rpm zentrifugieren, 4°C
- Pellet mit 70% Ethanol (RT) waschen und im Vakuum-Concentrator trocknen (~10min)
- pDNA in 50µl TE [pH8] aufnehmen (statt TE auch reinst Wasser verwenden oder 5mM Tris/HCl [pH8,5] siehe unten)

Nach der Präparation wurde die Konzentration der pDNA mittels Messung der optischen Dichte bei  $OD_{260nm}$  bestimmt ( $1OD_{260} = 50\mu g/ml$  dsDNA). Außerdem wurde zur Kontrolle der pDNA eine Agarose-Gelelektrophorese (0,8% Agarose) durchgeführt.

#### **2.4.4. Präparation von pDNA aus *E. coli* mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit**

Für die Sequenzierung des klonierten Inserts wurde die pDNA mittels eines käuflichen Kit's von MACHEREY NAGEL (NucleoSpin® Plasmid) isoliert. Dieser Kit erlaubt eine schnelle Minipräparation von sehr reiner pDNA, die für eine erfolgreiche Sequenzierung gefordert ist. Die Präparation erfolgte entsprechend den Herstellerangaben (Manual von MACHEREY NAGEL). Zum Abschluss wurde auch hier die Konzentration der pDNA mittels Messung der optischen Dichte bei  $OD_{260nm}$  bestimmt ( $1OD_{260} = 50\mu g/ml$  dsDNA) und eine Agarose-Gelelektrophorese (0,8% Agarose) durchgeführt.

#### **2.4.5. Restriktion der pDNA**

Neben der Kolonie-PCR zur Bewertung der Transformanten, wurden auch die Ergebnisse aus den Spaltungen der aus den Transformanten isolierten pDNA herangezogen. Für die Spaltung wurde das Restriktionsenzym Eco RI mit dem entsprechenden Reaktionspuffer von THERMO-HYBAID eingesetzt. Der Vektor pCR2.1-TOPO enthält zwei Eco RI-Spaltorte, die in unmittelbarer Nachbarschaft den Klonierungsort der PCR-Fragmente flankieren (Abb.4). Demnach sollten zwei Spaltprodukte entstehen, wobei ein ~3,9kb Fragment den Vektor repräsentiert und ein ~100-120bp Fragment das Insert.

➤ **Vorgehensweise:**

- Herstellung des Spaltansatzes:

pDNA	2 - 3µg
10x Puffer	1,5µl
reinst Wasser	xµl
Eco RI (10U/µl)	0,3µl (3U)
<hr/>	
Gesamtvolumen	15µl

- Der Spaltansatz wurde im Wasserbad bei 37°C ÜN inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 4µl 5fach konzentriertem Probenpuffer GLB[OrangeG] wurden die entstandenen Spaltprodukte in der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (2% DNA-Agar). Mithilfe eines DNA-Markers (25bp DNA Ladder von INVITROGEN) konnte die Größe des herausgespaltenen Inserts bestimmt werden.

## **2.5. Sequenzanalyse individueller Aptamer-Klone**

### **2.5.1. Sequenzierung**

Die Sequenzierung der pDNA, speziell des klonierten PCR-Fragmentes, wurde als Auftrag an die Firma AGOWA Gesellschaft für molekularbiologische Technologie mbH vergeben. Hierbei wurde die Einstrang-Sequenzierung mit dem Universalprimer M13-24 Forward gewählt (Kap.2.4.1.). Als Template kam die pDNA aus der Präparation mit dem NucleoSpin® Plasmid Kit von MACHEREY NAGEL zum Einsatz. Zur Kontrolle der erhaltenen Sequenzen wurde anschließend auch der Gegenstrang sequenziert.

### **2.5.2. Analyse der Primär- und Sekundärstruktur**

Aus den erhaltenen Plasmid-Sequenzen der verschiedenen Klone konnte die relevante Aptamersequenz anhand der bekannten Primerbindungsstellen eindeutig identifiziert und mit Hilfe des Programmes Vector NTI Suite 8 (InforMax Inc.) bearbeitet werden. Die Analyse der Primärstruktur beinhaltete die Bestimmung der Größe und Basenzusammensetzung, sowie Vergleiche der Sequenzen verschiedener Klone (paarweise Vergleiche oder multiple Sequenzvergleiche), um mögliche konservierte Bereiche zu finden. Hierfür wurden außerdem frei zugängliche Tools im Internet genutzt (z. B. [http://decypher.stanford.edu/index\\_by\\_algo.shtml](http://decypher.stanford.edu/index_by_algo.shtml), <http://genome.cs.mtu.edu/align/align.html>, <http://www.genomatix.de/cgi-bin/dialign/dialign.pl>, <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/#>). Die Analyse der Sekundärstruktur (Ausbildung von Loops, Stems oder Bulges bei der Faltung der ssDNA) erfolgte ebenfalls über das Internet mithilfe des Programms *mfold* (<http://www.bioinfo.rpi.edu/>) [41].

## 2.6. IAsys - Affinitätssensor

### Funktionsweise

Der IAsys-Affinitätssensor wird kommerziell von der Firma Thermo Labsystems vertrieben und dient der markierungsfreien Untersuchung biomolekularer Interaktionen. Das Biosensorgerät ist als ein offen zugängliches, gerührtes Mikroküvetten-system aufgebaut. Die Messung der biomolekularen Wechselwirkungen beruht auf dem Prinzip der Resonant-Mirror-Spektroskopie [42;43]. Dabei wird ein Bindungspartner (Ligand) auf der Sensoroberfläche (Boden der Mikroküvette) immobilisiert, während der andere Partner in Lösung vorliegt. Die Bindung zwischen beiden Molekülen wird als Massezuwachs in der Sensorschicht und damit einhergehender Änderung des Brechungsindex detektiert. Für verschiedene Anwendungen werden Küvetten mit unterschiedlich funktionalisierten Sensoroberflächen (CMD, Amino, Carboxylat, Biotin, Hydrophob) angeboten. Die nachfolgende Abbildung vermittelt einen Eindruck von dem IAsys-Biosensor und der Probenküvette, und zeigt außerdem den Querschnitt durch eine Küvette mit den optischen Komponenten (Abb.5).

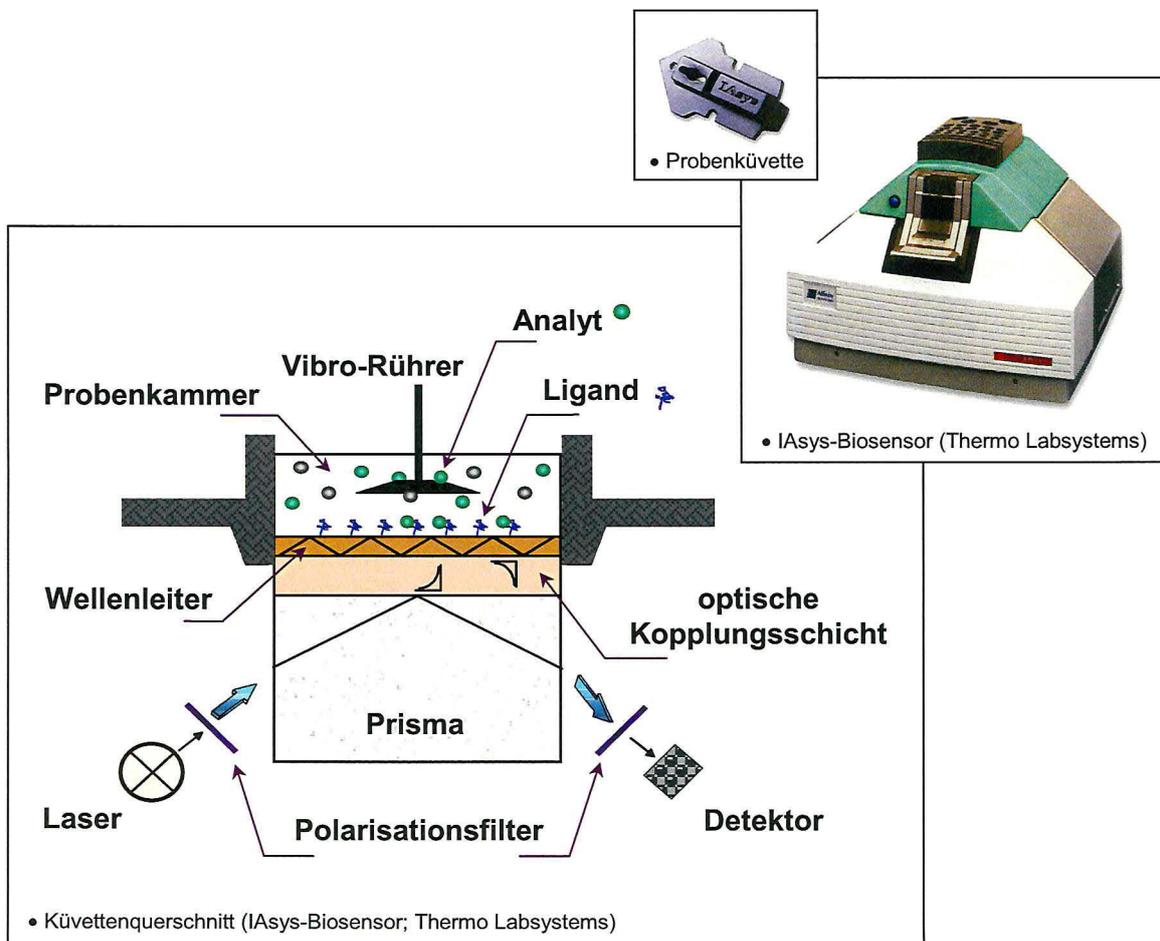


Abb. 5 IAsys-Biosensor und Probenküvette (Quelle: Produktkatalog von Thermo Labsystems); Querschnitt durch eine Küvette mit optischen Komponenten

## Voruntersuchungen zu Bindungsstudien am IAsys-Biosensor anhand des Modellsystems: DNA/DNA-Hybridisierung

Die DNA/DNA-Hybridisierung ist ein geeignetes und relativ einfaches Modellsystem, um das Messprinzip des IAsys-Biosensors kennenzulernen und die methodischen Grundlagen aufzubauen. Deshalb wurden als Modellsystem kurze Oligonukleotide (ssDNA) mit spezifischer Sequenz gewählt, wobei ein Bindungspartner am 5'-Ende biotinyliert ist und dadurch als Rezeptor auf der Sensoroberfläche immobilisiert werden kann. Der andere Bindungspartner, ein komplementäres Oligonukleotid, liegt in Lösung vor. Die Hybridisierung beider ssDNA Oligonukleotide kann nun als markierungsfreie Bindungsreaktion mit dem IAsys-Biosensor nachgewiesen werden.

Oligonukleotidname	Sequenz
AP3 (Rezeptor-Oligonukleotid)	5`-BIO-GGG AGA CAA GAA TAA ACG CTC AA-3`
AP2REV (komplementäres Oligonukleotid)	5`-TTG AGC GTT TAT TCT TGT CTC CC-3`
AP2 (negative Kontrolle)	5`-GGG AGA CAA GAA TAA ACG CTC AA-3`

Tab. 4 Oligonukleotide für die Messung der DNA/DNA-Hybridisierung mit dem IAsys-Biosensor

Alle Reaktionen (Immobilisierung, Bindung/Dissoziation und Regeneration) wurden in PBST Puffer (1,47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,137M NaCl, 2,7mM KCl, 0,05% Tween 20; pH 7,4), bei 21°C und bei einer Rührrate von 80% (gerätespezifische Angabe) sowie einer „sampling rate“ von 1sec pro Datenpunkt durchgeführt. Die Messdaten werden kontinuierlich aufgenommen und grafisch dargestellt. Eine Signaländerung wird in Winkelsekunden (arc sec) angegeben.

### ➤ Immobilisierung der DNA auf der Sensoroberfläche

Für die Immobilisierung von ssDNA wurden planare Biotin-Küvetten genutzt. Die Sensoroberfläche wurde zunächst durch die Anbindung von Streptavidin funktionalisiert:

- waschen der Küvette mit 200µl PBST (4-5x) und anschließend 100µl PBST vorlegen
- Erfassung der Basislinie für ~3min
- Zugabe von 10µl Streptavidin (1mg/ml in A.bidest. → Endkonz. 0,1mg/ml)  
Bindungszeit 10min
- waschen der Küvette mit 200µl PBST (4-5x)
- Erfassung der neuen Basislinie für ~3min
- Zugabe von 8µl des biotinylierten Oligonukleotids AP3 (100µM → Endkonz. ~4µM)  
Bindungszeit 5min → *Immobilisierung*

- waschen der Küvette mit 200µl PBST (4-5x)
- Erfassung der neuen Basislinie für ~3min

(gegebenenfalls die Oberfläche mit 100µl 10mM NaOH für 1min behandeln und anschließend mit PBST waschen um nochmals alle ungebundenen bzw. nicht korrekt gebundenen Moleküle zu entfernen)

#### ➤ Bindung/Dissoziation

Nach erfolgreicher Immobilisierung des biotinylierten Rezeptor-Oligonukleotids war die Sensoroberfläche einsatzbereit für Hybridisierungsversuche mit einem komplementären Oligonukleotid:

- 200µl PBST in der Küvette vorlegen
- Erfassung der Basislinie für 3min
- Zugabe von 10µl des komplementären Oligonukleotids AP2REV (verschiedene Endkonzentrationen 0,5nM - 0,25µM), Hybridisierungszeit 5min → *Bindung*
- waschen der Küvette mit 200µl PBST (4-5x) → *Dissoziation*
- Erfassung der neuen Basislinie für ~3min

#### ➤ Regeneration der Sensoroberfläche

Nach der Bindungsreaktion schließt sich die Regeneration (Denaturierung des DNA-Doppelstranges) der Sensoroberfläche für eine erneute Bindung an:

- Oberfläche mit 100µl 10mM NaOH für 1min inkubieren → *Regeneration*
- waschen der Küvette mit 200µl PBST (4-5x)
- Erfassung der Basislinie für ~3min

Darüber hinaus ist es auch möglich, die Sensoroberfläche vollständig zu regenerieren, wobei die Streptavidin-Biotin-Kopplung zerstört wird. Das Ergebnis ist wieder eine planare Biotin-Oberfläche, die für eine erneute Anbindung von Streptavidin und die Immobilisierung eines biotinylierten Moleküls zur Verfügung steht:

- Oberfläche mit 100µl 10M KOH für 1min inkubieren → *vollständige Regeneration*
- ausgiebiges waschen der Küvette mit 200µl PBST (insges. 30x)
- Erfassung der Basislinie für ~3min

Die Lagerung bereits benutzter Küvetten erfolgt unter Abschluss bei 4°C, wobei die Sensoroberfläche mit min. 100µl Puffer überschichtet wird.

### 3. Ergebnisse und Perspektiven

#### 3.1. *In vitro* Selektion zur Gewinnung von Aptameren für Schimmelpilzsporen

Das erarbeitete SELEX-Verfahren wurde in verschiedenen SELEX-Versuchen mit den Sporen des Schimmelpilzes *P. expansum* als Zielmolekül angewendet. Dabei wurden die gesammelten Erfahrungen in den jeweils nachfolgenden Versuchen eingearbeitet. Diese betrafen beispielsweise Modifikationen im Puffersystem, in der random DNA-Oligonukleotid Bibliothek mit den entsprechenden Primern und PCR-Bedingungen, sowie in der Reinigung von ssDNA aus PCR-Produkten. Aus diesen Versuchen kristallisierte sich das aktuelle SELEX-Protokoll (Parameter und Ablauf) heraus, welches im Methodenteil ausführlich beschrieben wurde und im nachfolgend dargestellten SELEX-Experiment zur Anwendung kam.

##### 3.1.1. SELEX-Prozess

Das aktuelle Sporen-SELEX-Experiment wurde parallel und unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, wie das im Kap. 3.2. beschriebene SELEX-Experiment mit Streptavidin-MB (Modellanalyt) als Zielmoleküle. Die Tabelle 5 zeigt die angewandten SELEX-Parameter im Überblick.

###### > SELEX-Parameter

A) Zielmolekül	<ul style="list-style-type: none"><li>- Sporen des Schimmelpilzes <i>P. expansum</i> (Typstamm DSM 1282; Lagerung in Aliquoten bei -70°C in ~11% Glycerin)</li><li>- Einsatz von <math>\sim 1 \times 10^7</math> Sporen in Runde 1-4 bzw. <math>\sim 1 \times 10^8</math> Sporen ab Runde 5</li></ul>
B) eingesetzte ssDNA	<ul style="list-style-type: none"><li>- 1. Runde: Einsatz von 3,3nmol der random DNA-Oligonukleotid Bibliothek BANK-A (96nt)</li><li>- ab 2. Runde: Einsatz von 200pmol bzw. der gesamten eluierten ssDNA aus der Vorrunde (<math>\sim 100</math>-300pmol)</li></ul>
C) Puffersystem	<ul style="list-style-type: none"><li>- Bindungspuffer / Waschpuffer: BB+(KC)<sub>0,02%</sub>T (100mM NaCl, 20mM Tris/HCl [pH 7,6], 2mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM KCl, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 0,02% Tween 20)</li><li>- Elutionspuffer: EB+(3) (40mM Tris/HCl [pH 8], 3,5M Harnstoff, 0,02% Tween 20)</li></ul>

Tab. 5 angewandte SELEX-Parameter im aktuellen Sporen-SELEX-Experiment

Die Ergebnisse der SELEX-Runden 2 - 13 wurden nachfolgend sowohl in einer Tabelle zusammengefasst, als auch grafisch dargestellt (Tab.6, Abb.6). Die Ergebnisse der Runde 1 wurden nicht mitaufgeführt, da hier eine andere, indirekte Methode zur Konzentrationsbestimmung (mittels OliGreen; Kap.2.2.1.) der ssDNA in den SELEX-Fractionen genutzt

wurde und somit ein direkter Vergleich mit Werten aus den weiteren Runden problematisch war. Ab Runde 2 wurde mit Fluorescein-markierter ssDNA gearbeitet, so dass erst ab dieser Runde die Konzentrationsbestimmung über die direkte Fluoreszenzmessung der DNA möglich war. Die Quantifizierung erfolgte hier mittels einer Eichkurve, aus unselektierter, Fluorescein-markierter BANK-A ssDNA.

SELEX-Runde	eingesetzte Sporenzahl	eingesetzte ssDNA		eluierte ssDNA		Anzahl eluierter ssDNA Moleküle/Spore
		[µg]	[pmol]	[ng]	[pmol]	
2	9,0E+06	5,0	159	0,00	0,00	0,0E+00
3	7,0E+06	3,3	106	1,26	0,04	3,4E+03
4	5,0E+06	7,5	240	0,63	0,02	2,4E+03
5	1,0E+08	7,5	240	3,77	0,12	7,0E+02
6	1,0E+08	3,9	125	0,00	0,00	0,0E+00
7	9,7E+07	5,8	184	4,39	0,14	8,7E+02
8	1,1E+08	10,0	318	0,00	0,00	0,0E+00
9	9,5E+07	7,4	237	1,88	0,06	3,8E+02
10	9,4E+07	7,9	253	1,88	0,06	3,9E+02
11	9,6E+07	6,5	207	0,0094	0,0003	1,9E+00
12	9,3E+07	6,7	213	3,14	0,10	6,5E+02
13	9,1E+07	6,6	209	0,2354	0,0075	5,0E+01

Tab. 6 Ergebnisse des aktuellen SELEX-Experimentes mit Pilzsporen von *P. expansum* als Target: Ausbeute an sporeneluierter, selektierter ssDNA

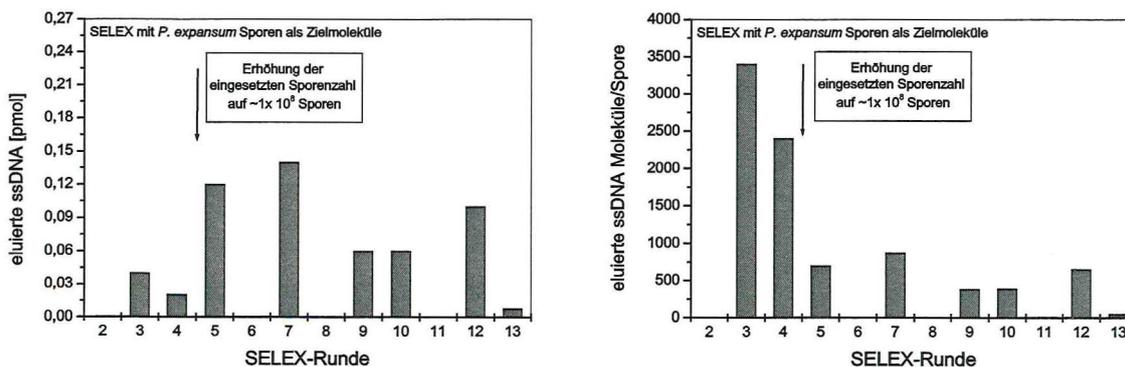


Abb. 6 Ausbeute an eluierter, selektierter ssDNA je SELEX-Runde: Darstellung als ssDNA Menge in pmol bzw. als Molekülzahl/Spore

Die Menge an sporeneluierter ssDNA in den 13 SELEX-Runden unterlag großen Schwankungen, ein anhaltender ansteigender Trend konnte nicht beobachtet werden. Die Ausbeute pro Runde lag zwischen 0pmol - 0,14pmol ssDNA, was weniger als 0,1% der jeweils eingesetzten Menge an ssDNA entspricht. Diese Werte bewegen sich um das Nachweislimit der Quantifizierungsmethode über direkte Fluoreszenzmessung. In einigen Fällen kam es daher auch zu einem Nullwert für die sporeneluierte ssDNA. Entsprechend

diesen Ergebnissen konnte sporenspezifische ssDNA bisher nicht selektiert werden. Aus diesem Grund wurde der SELEX-Prozess nach der 13. Runde abgebrochen. Vorhergehende SELEX-Versuche zeigten ähnliche Ergebnisse und wurden nach der 8. bzw. 10. Runde abgebrochen.

### *Perspektiven*

In der Regel werden in einem SELEX-Experiment in den ersten Runden, in denen mit einem noch undifferenzierten ssDNA Pool gearbeitet wird, ca. 0,1% der eingesetzten Menge wiedergewonnen. Ab der 6. Runde sollte es jedoch zu einer Differenzierung des DNA Pools kommen und somit zu einer deutlichen Anreicherung targetspezifischer ssDNA. Wie viele SELEX-Runden letztendlich für eine Aptamergewinnung notwendig sind, kann sehr unterschiedlich sein und hängt wesentlich von dem speziellen Zielmolekül und den SELEX-Bedingungen ab. Dies kommt insbesondere bei ungewöhnlichen Zielmolekülen, wie z. B. komplexen Strukturen, zum Tragen. Schimmelpilzsporen können zu dieser Kategorie gezählt werden. Die Gewinnung von Aptameren für intakte Sporen ist neu und somit kann auch nicht auf Erfahrungswerte zurückgegriffen werden.

Aus den bisherigen SELEX-Experimenten mit *P. expansum* Sporen als Target zeigte sich, dass ein kritischer Faktor die heterogene Beschaffenheit der Sporenoberfläche ist, wodurch auch die Art und Anzahl möglicher Rezeptoren für Aptamere unbestimmt ist. Möglicherweise sind jedoch intakte Sporen, insbesondere durch ihre Funktion als Überdauerungsorgane, nicht als Target im SELEX-Prozess geeignet. Daher wurden im Wesentlichen zwei abgewandelte Strategien erarbeitet, um dennoch Aptamere für den Nachweis von Sporen zu gewinnen. Einerseits betrifft dies eine Vorbehandlung der Sporen. Die Auswahl der Bedingungen für diese Sporenbehandlung soll dabei in Anlehnung an Literaturdaten von Arbeiten erfolgen, die sich mit der Produktion von Antikörpern gegen Mycel und Sporen von Schimmelpilzen beschäftigen. Oftmals wird in diesen Arbeiten ein Aufbrechen der äußeren Sporenwand (z. B. durch Schwellen der Sporen oder Hitzebehandlung) beschrieben und eine Bindung der Antikörper an Strukturen der inneren Sporenwände [44]. Außerdem sollte nach alternativen bzw. empfindlicheren Methoden für den Nachweis der Bindung zwischen ssDNA und Spore während des SELEX-Prozesses gesucht werden, da durch den komplexen Aufbau der Sporenoberfläche die Menge eines möglichen Rezeptors je Spore eher gering ist und die Bindung der ssDNA daher nicht erfasst wird.

Andererseits könnten statt intakter Sporen definierte Sporenwandbestandteile als Zielmoleküle im SELEX-Prozess zum Einsatz kommen. Wichtige Kriterien für solche Bestandteile wären die uneingeschränkte Verfügbarkeit, unkomplizierte Handhabbarkeit und Immobilisierbarkeit. Umfangreiche Recherchen haben ergeben, dass verschiedene Zuckermoleküle (z. B.  $\beta(1\rightarrow3)$ -Glucan oder  $\beta(1\rightarrow5)$ -Galaktofuranose-Einheiten) als relevante

Targets geeignet wären [45-48]. Die grundsätzliche Möglichkeit der Gewinnung von Aptameren für Zuckerstrukturen ist aus der Literatur belegt, z. B. anhand von Cellobiose oder Chitin [6;16].

Im Rahmen einer Promotionsarbeit am UFZ werden beide Strategien intensiv weiterverfolgt, um ssDNA Aptamere für den Nachweis von Schimmelpilzsporen zu selektieren.

### 3.2. *In vitro* Selektion zur Gewinnung von Aptameren für Streptavidin-MB

Neben den Schimmelpilzsporen von *P. expansum* wurde in dem vorliegenden Projekt ein weiteres Target im SELEX-Prozess eingesetzt. Hierbei handelt es sich um Streptavidin-Magnetic Beads (Streptavidin-MB), die in Größe, Form und Handhabbarkeit den Sporen vergleichbar sind. Der besondere Vorteil bei diesen Beads liegt jedoch in der homogenen, aus nur einer Molekülart (Streptavidin) bestehenden Partikeloberfläche (gleichförmige Latexpartikel mit immobilisiertem Streptavidin auf der Oberfläche). Das Ziel bestand darin, mittels der Streptavidin-MB als modellhaftes Zielmolekül die etablierten SELEX-Bedingungen und die technische Herangehensweise für eine erfolgreiche Aptamerselektion zu testen.

#### 3.2.1. SELEX-Prozess

Dieser SELEX-Prozess mit Streptavidin-MB als Target wurde parallel zu dem Sporen-SELEX-Experiment (Kap.3.1.) mit gleicher Vorgehensweise durchgeführt. Die Tabelle 7 zeigt die angewandten SELEX-Parameter im Überblick.

##### ➤ SELEX-Parameter

A) Zielmolekül	<ul style="list-style-type: none"> <li>- micromer Streptavidin-Beads (micromod Partikeltechnologie GmbH); Abtrennung vom Puffermilieu durch Zentrifugation → Einsatz in Runde 1-3</li> <li>- magnetische Streptavidin-Beads: Dynabeads M-280 (DynaL Biotech GmbH); Abtrennung vom Puffermilieu im Magnetstand → Einsatz ab Runde 4</li> <li>- Einsatz von <math>\sim 1 \times 10^7</math> Beads in Runde 1-5 bzw. <math>\sim 1 \times 10^8</math> Beads ab Runde 6</li> </ul>
B) eingesetzte ssDNA	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1. Runde: Einsatz von 3,3nmol der random DNA-Oligonukleotid Bibliothek BANK-A (96nt)</li> <li>- ab 2. Runde: Einsatz von 200pmol bzw. der gesamten eluierten ssDNA aus der Vorrunde (<math>\sim 130</math>-<math>210</math>pmol)</li> </ul>

C) Puffersystem	- Bindungspuffer / Waschpuffer: BB+(KC) <sub>0.02%T</sub> (100mM NaCl, 20mM Tris/HCl [pH 7,6], 2mM MgCl <sub>2</sub> , 5mM KCl, 1mM CaCl <sub>2</sub> , 0,02% Tween 20)  - Elutionspuffer: EB+(3) (40mM Tris/HCl [pH 8], 3,5M Harnstoff, 0,02% Tween 20)
-----------------	--

Tab. 7 angewandte SELEX-Parameter im aktuellen Streptavidin-MB-SELEX-Experiment

Die Ergebnisse der SELEX-Runden 4 - 13 wurden sowohl in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst, als auch grafisch dargestellt (Tab.8, Abb.7). In den Runden 1 - 3 wurden micromer Streptavidin-Beads (micromod Partikeltechnologie GmbH, Rostock) verwendet. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Abtrennung der Beads vom Puffermilieu problematisch war. Durch eine Zentrifugation entstand kein festes, kompaktes Pellet wie beispielsweise bei den Sporen, wodurch bei der Abnahme des Überstandes Verluste auftraten. Effiziente Trennschritte sind jedoch beim SELEX-Prozess äußerst wichtig. Da in den ersten Runden nur sehr wenig ssDNA an die Streptavidin-Beads bindet, können einerseits schon geringe Bead-Verluste bei den Waschschrritten dazu führen, dass auch die relevanten ssDNA Fragmente verloren gehen. Andererseits müssen unspezifische ssDNA Fragmente aus dem Prozess gründlich herausgewaschen werden, da sie sonst ebenfalls mit angereichert werden. Aus diesem Grund wurden ab der 4. Runde dieses SELEX-Experimentes die Dynabeads M-280 Streptavidin (DynaL Biotech GmbH, Hamburg) eingesetzt. Da es sich hierbei um magnetische Partikel handelt, lassen sie sich mit Hilfe eines Magnetstandes sehr gut an der Gefäßwand abscheiden. Eine verlustfreie Abnahme des Puffers (Überstandes) ist anschließend möglich.

Die Bestimmung der Beadzahl erfolgte analog zu den Sporen mittels einer Zählkammer unter dem Mikroskop. Auch hier zeigte sich, dass sich die micromer Streptavidin-Beads schlechter handhaben ließen. Durch starke Verklumpungen war eine genaue Auszählung bei diesen Beads, im Gegensatz zu den Dynabeads nicht möglich.

Die genannten Gründe erschwerten schließlich die Auswertung dieser SELEX-Runden hinsichtlich der Ausbeute an bead-gebundener ssDNA, so dass erst ab Runde 4 verlässliche Werte für die Menge an Fluorescein-markierter ssDNA in den einzelnen SELEX-Fraktionen gemessen wurden.

Die Konzentrationsbestimmung der ssDNA in den einzelnen SELEX-Fraktionen erfolgte auch hier ab der 2. Runde über die direkte Fluoreszenzmessung der markierten DNA und anschließender Quantifizierung mittels einer Eichkurve aus unselektierter, Fluorescein-markierter BANK-A ssDNA.

SELEX-Runde	eingesetzte Beadzahl	eingesetzte ssDNA		eluierte ssDNA		Anzahl eluierter ssDNA Moleküle/Bead
		[µg]	[pmol]	[ng]	[pmol]	
4	9,2E+06	6,1	195	0,0	0,00	0,0E+00
5	9,2E+06	6,4	205	0,0	0,00	0,0E+00
6	1,1E+08	6,6	209	4,7	0,15	8,0E+02
7	1,1E+08	6,1	195	194,3	6,19	3,4E+04
8	1,1E+08	4,0	128	401,8	12,80	7,0E+04
9	8,6E+07	5,4	173	408,1	13,00	9,0E+04
10	8,2E+07	6,5	206	388,6	12,38	9,1E+04
NS R11	1,1E+08 Tosyl-MB	5,9	188	1,6	0,05	2,7E+02
11	1,2E+08			460,5	14,67	7,4E+04
NS R12	1,1E+08 Tosyl-MB	6,5	206	0,0	0,00	0,0E+00
12	1,3E+08			448,6	14,29	6,8E+04
NS R13	1,2E+08 Tosyl-MB	3,2	102	0,9	0,03	1,6E+02
13	1,2E+08			311,1	9,91	5,0E+04

Tab. 8 Ergebnisse des aktuellen SELEX-Experimentes mit Streptavidin-MB als Target: Ausbeute an bead-eluierter, selektierter ssDNA

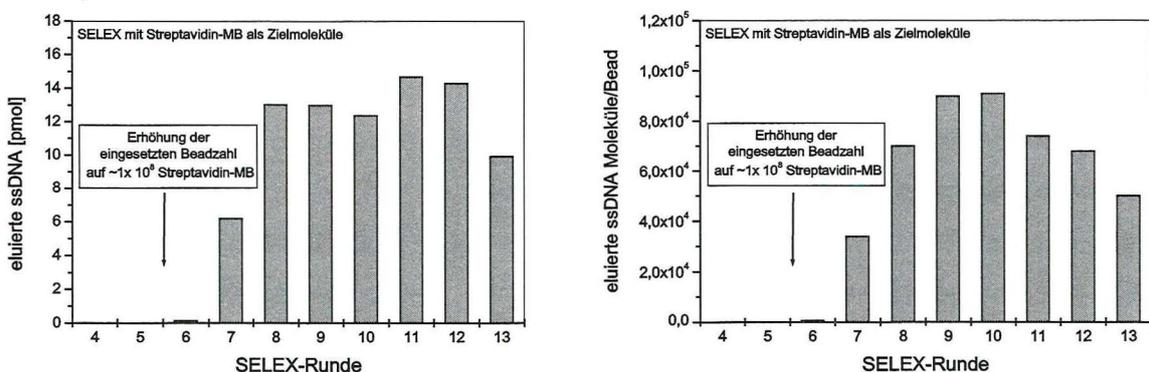


Abb. 7 Ausbeute an eluierter, selektierter ssDNA je SELEX-Runde: Darstellung als ssDNA Menge in pmol bzw. als Molekülzahl/Bead

Die Ergebnisdaten zeigen, dass bis Runde 6 kein signifikanter Anstieg der bead-eluierten ssDNA festgestellt werden konnte. Die Ausbeuten lagen hier im Bereich von 0 - 0,15pmol ssDNA (<0,1% von der jeweils eingesetzten ssDNA). Dies entsprach den Ergebnissen aus dem Sporen-SELEX-Experiment über die gesamten 13 Runden hinweg (Kap.3.1.).

In den Runden 7 und 8 kam es dagegen zu einem deutlichen und schnellen Anstieg in der Menge der bead-eluierten ssDNA, die sich in den nachfolgenden Runden jedoch nicht mehr wesentlich erhöhte, sondern eher auf einem Niveau von 12,4 - 14,7pmol blieb. Die Schwankungen in der eluierten ssDNA in den Runden 8 - 12 wurden durch Unterschiede in der Menge der eingesetzten ssDNA bzw. in der verwendeten Streptavidin-MB-Anzahl verursacht. Unter den angewandten SELEX-Bedingungen konnte somit eine Bindungskapazität der Streptavidin-MB von 7 - 9x 10<sup>4</sup> ssDNA Moleküle/Bead erreicht

werden. Die Bindungskapazität ist dabei abhängig vom Verhältnis zwischen eingesetzter DNA Menge und Beadzahl.

In den Runden 11 - 13 wurde der SELEX-Prozess außerdem durch eine vorgeschaltete Negativselektion (NS) modifiziert. Hierfür wurde vor der eigentlichen Bindungsreaktion mit Streptavidin-MB die ssDNA zunächst mit Tosyl-MB für 30min bei 21°C und 800rpm inkubiert. Ziel dieser Modifikation war die Entfernung von DNA Molekülen aus dem bereits angereicherten Pool, die unspezifisch an das Beadmaterial binden. Tosyl-MB sind ebenfalls magnetische Partikel (Dynabeads M-280 Tosylactivated; Dynal Biotech GmbH), die aus dem selben Material wie die Streptavidin-MB bestehen, deren Oberfläche jedoch durch p-Toluensulfonchlorid aktiviert wurde. Den Herstellerangaben zufolge werden standardmäßig diese Tosyl-MB als Ausgangsmaterial für die Immobilisierung von Streptavidin zur Herstellung der Streptavidin-MB genutzt. Nach der Inkubation wurde die ungebundene ssDNA direkt in die Bindungsreaktion mit den Streptavidin-MB überführt. Die Tosyl-MB wurden entsprechend dem SELEX-Protokoll weiterbehandelt, um nach der Elution Aussagen zu den Mengen an gebundener ssDNA treffen zu können. Danach konnten in den drei Runden jeweils 0 - 0,05pmol ssDNA von den Tosyl-MB wieder eluiert werden (Tab.8). Dies ist ein äußerst geringer Anteil der eingesetzten ssDNA pro Runde, wobei die Werte eher typisch für die ersten Runden eines SELEX-Experimentes sind, in denen noch mit einem unselektierten ssDNA Pool gearbeitet wird. Eine Anreicherung unspezifischer ssDNA, die an Beadmaterial bindet, kann demnach ausgeschlossen werden.

Nach der 13. Runde wurde der SELEX-Prozess mit Streptavidin-MB als Target nach der PCR (mit unmodifizierten Primern) abgebrochen, um den bisher selektierten Aptamer-Pool zu charakterisieren. Außerdem wurde in dieser letzten Runde nur die Hälfte der einsatzfähigen ssDNA genutzt, um noch SELEX-Material für spätere Versuche zur Verfügung zu haben.

Die weitere Vorgehensweise nach einem erfolgreichen SELEX-Experiment beinhaltet die Klonierung der selektierten DNA nach der letzten Runde und die Sequenzierung/Sequenzanalyse einzelner Klone. Weiterhin können definierte Klone hinsichtlich Spezifität und Sensitivität zum Zielmolekül in Bindungsversuchen charakterisiert werden. Die Ergebnisse diesbezüglich unter Verwendung des Streptavidin-MB spezifischen ssDNA Aptamere werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

### *Perspektiven*

Die Ergebnisse aus diesem SELEX-Experiment mit Streptavidin-MB als Target zeigen, dass mit der technischen Herangehensweise, einschließlich der etablierten SELEX-Bedingungen, die erfolgreiche Selektion von DNA Aptameren für ein bestimmtes Zielmolekül möglich ist. Es konnten Streptavidin-MB spezifische ssDNA Moleküle aus einem komplexen unspezifischen

Pool innerhalb von 13 Runden selektiert und angereichert werden. Durch das Einfügen eines negativen Selektionsschrittes in den letzten 3 Runden wurde das Vorhandensein unspezifischer DNA im angereicherten Aptamer-Pool ausgeschlossen.

Die magnetischen Partikel (Dynabeads) sind grundsätzlich sehr gut als Immobilisierungsmatrix für relevante Zielmoleküle bei der Aptamer Selektion geeignet. Diese Partikel sind mit verschiedenen funktionalisierten Oberflächen (Amino-Gruppen, Carboxyl-Gruppen, Epoxy-Gruppen, tosylaktiviert) kommerziell erhältlich, so dass sich eine Vielzahl verschiedener Moleküle immobilisieren lassen. So fließen die in diesem Projekt gesammelten Erfahrungen bereits in einer Promotionsarbeit ein, bei der Epoxy-Dynabeads als Immobilisierungsmatrix für Zellwandbestandteile von Schimmelpilzsporen (Zuckermoleküle) dienen und im SELEX-Prozess eingesetzt werden. Die hier gezeigten Ergebnisse weisen außerdem daraufhin, dass min.  $1 \times 10^8$  Beads in jeder SELEX-Runde verwendet werden sollten, um im Falle einer Selektion spezifischer ssDNA in einen gut messbaren Bereich für die Fluorescein-markierte DNA zu kommen.

Darüber hinaus können die Streptavidin-MB spezifischen DNA Aptamere als Modellsystem für die Biosensorapplikation von Aptameren genutzt werden. So ist es möglich anhand dieser Aptamere verschiedene Nachweismethoden für die Bindung zwischen Aptamer und Target zu testen bzw. zu entwickeln oder ihren Einsatz mit bereits vorhandener Gerätetechnik zu untersuchen.

### **3.2.2. Klonierung und Sequenzanalyse**

Die 13. Runde des SELEX-Prozesses mit Streptavidin-MB als Target wurde nach der Amplifikation der eluierten ssDNA mittels PCR beendet. Statt der Reinigung des relevanten Einzelstranges wurden anschließend die erhaltenen PCR-Fragmente in einen geeigneten Vektor (pCR2.1-TOPO; INVITROGEN) kloniert und dieser in *E. coli* TOP10 transformiert. Insgesamt wurden 50 der Transformanten mittels Kolonie-PCR hinsichtlich des Plasmids und dem eingebauten Insert (selektierte ssDNA = Aptamere) kontrolliert. Darüber hinaus wurde die pDNA dieser Transformanten präpariert und das Insert mit der Restriktionsendonuklease Eco RI herausgespalten, um in der anschließenden Agarose-Gelelektrophorese die Größe des Inserts zu prüfen.

Aus den Ergebnissen lässt sich zusammenfassen, dass alle untersuchten 50 Transformanten das Plasmid pCR2.1-TOPO enthielten, in welches ein DNA-Fragment aus dem erwarteten Größenbereich eingebaut wurde. Aus der Kolonie-PCR ging außerdem hervor, dass es eine bevorzugte Einbaurichtung der DNA-Fragmente gab (47:3). Bei vier der Transformanten traten nach der Restriktion der pDNA zwei Insert-Banden auf, was eventuell auf das Vorhandensein von zwei Plasmiden (von zwei Transformanten aus einer Kolonie)

hindeutet. In diesem Fall wäre auch eine Sequenzierung nicht erfolgreich. Unterschiede zwischen den einzelnen Klonen bestanden auch in der konkreten Größe der eingebauten Aptamer-DNA, was insbesondere nach der Sequenzierung sichtbar wurde. Danach bestanden 35 der Aptamer-Klone aus 91 - 97nt, während 9 Klone mit 70 - 79nt wesentlich kleiner waren. Einen Überblick über die untersuchten Aptamer-Klone gibt die Tabelle 9.

Klon	Eigenschaften	Klon	Eigenschaften
StrepAp S6R13/...	Größe; S = Sequenzdaten vorhanden; ...	StrepAp S6R13/...	Größe; S = Sequenzdaten vorhanden; ...
#2/1	Doppelbande im Agarosegel -> keine Sequenz	#12/31	96nt; S;
#2/2	96nt; S;	#12/32	95nt; S;
#2/3	96nt; S;	#12/33	95nt; S;
#2/4	76nt; S;	#12/34	95nt; S;
#2/5	95nt; S;	#12/35	96nt; S;
#2/6	96nt; S;	#12/36	73nt; S;
#2/7	93nt; S;	#12/37	96nt; S;
#2/8	95nt; S;	#12/38	97nt; S;
#2/9	94nt; S;	#12/39	96nt; S;
#2/10	96nt; S;	#12/40	keine Sequenz erhalten
#6/11	Doppelbande im Agarosegel -> keine Sequenz	#15/41	75nt; S;
#6/12	96nt; S;	#15/42	96nt; S;
#6/13	96nt; S;	#15/43	75nt; S;
#6/14	77nt; S;	#15/44	93nt; S;
#6/15	96nt; S;	#15/45	91nt; S;
#6/16	97nt; S;	#15/46	95nt; S;
#6/17	96nt; S;	#15/47	95nt; S;
#6/18	95nt; S;	#15/48	70nt; S;
#6/19	96nt; S;	#15/49	94nt; S;
#6/20	96nt; S;	#15/50	95nt; S;
#9/21	Doppelbande im Agarosegel -> keine Sequenz		
#9/22	Doppelbande im Agarosegel -> keine Sequenz		
#9/23	79nt; S;		
#9/24	77nt; S;		
#9/25	72nt; S;		
#9/26	96nt; S;		
#9/27	94nt; S;		
#9/28	kein Wachstum auf Ausstrichplatte -> keine Sequenz		
#9/29	95nt; S;		
#9/30	94nt; S;		

Tab. 9 Übersicht über die Streptavidin-MB spezifischen Aptamer-Klone und Abbildung einer Vektorkarte: Plasmid mit klonierter Aptamer DNA (Klon #6/15) in bevorzugter Einbaurichtung (r> Bezeichnung der Primerregionen)

Für die Sequenzierreaktion wurde speziell präparierte pDNA der einzelnen Klone eingesetzt, wobei ein Primer gewählt wurde, der die Sequenzierung des relevanten Stranges mit der Aptamer-DNA erlaubte. Zur Absicherung der erhaltenen Daten wurde anschließend auch der entsprechende Gegenstrang sequenziert. Durch die bekannten Primerbindungsregionen (AP10, AP20<sub>komplementär</sub>) am 5'- und 3'-Ende der Aptamer-DNA, konnten diese in der

ermittelten Basenabfolge der einzelnen Klone eindeutig identifiziert werden. Insgesamt wurden von 44 Klone Sequenzdaten erhalten (Abb.8).

AP10 Aptamer (Primerbindungsregion)		Aptamer (Kernregion)	AP20 (komplementär) Aptamer (Primerbindungsregion)
	ATACCAGCTTATTCAATT	--GGAGTGGGGATGGGAAGTGGAGTATGGAGTTGGTAGGGCTGATCGTGTATTGTTGTTGGAGATAGTAAGTGCAATCT	#9/29
①	ATACCAGCTTATTCAATT	--GGGCTGGGGATTGGAAGTGGAGTATGGAGTTGGTAGGGCTGATCGTGTATTGTTGTTGGAGATAGTAAGTGCAATCT	#12/32
	ATACCAGCTTATTCAATT	GGGCTGGGGATTGGAAGTGGAGTATGGAGTTGGTAGGGCTGATCGTGTATTGTTGCTGGTTAGATAGTAAGTGCAATCT	#6/16
	ATACCAGCTTATTCAATT	--GGGCTGGGGATTGGAAGTGGAGTATGGAGTTGGTAGGGCTGATCGTGTATTGTTGTTGGAGATAGTAAGTGCAATCT	#15/50
	ATACCAGCTTATTCAATT	--GGGTAAAGTGGAGTTGGATGAATTGAGGGTCACTGGTTAAGTATACGTTTTTGGTGGTGGAGATAGTAAGTGCAATCT	#6/15
②	ATACCAGCTTATTCAATT	--GGGTAAAGTGGAGTTGGATGAATTGAGGGTCACTGGTTAAGTATACGTTTTTGGTGGTGGAGATAGTAAGTGCAATCT	#2/19
	ATACCAGCTTATTCAATT	---GGGGTGGAGTTGGATGAATTGAGGGTCACTGGTTAAGTATACGTTTTTGGTGGTGGAGATAGTAAGTGCAATCT	#2/7
	ATACCAGCTTATTCAATT	--GCGGTGGCTGCTTTACTTAAATTTAGGTTTGGGATAGATGGGTTTCTGTGTGGTGGCTGTAGATAGTAAGTGCAATCT	#2/6
③	ATACCAGCTTATTCAATT	--GGGTGGCTGCTTTACTTAAATTTAGGTTTGGGATAGATGGGTTTCTGTGTGGTGGCTGTAGATAGTAAGTGCAATCT	#6/13
	ATACCAGCTTATTCAATT	--GGGTGGCTGCTTTACTTAAATTTAGGTTTGGGATAGATGGGTTTCTGTGTGGTGGCTGTAGATAGTAAGTGCAATCT	#6/20
	ATACCAGCTTATTCAATT	--TCGCGTGATTGGTCAAAAATTTGATGATCCGGTGTCTGCAAGTGTGGTGTCTCTCAAGATAGTAAGTGCAATCT	#2/2
④	ATACCAGCTTATTCAATT	--TCGCGTGATTGGTCAAAAATTTGATGATCCGGTGTCTGCAAGTGTGGTGTCTCTCAAGATAGTAAGTGCAATCT	#6/17
	ATACCAGCTTATTCAATT	--TCGCGTGATTGGTCAAAAATTTGATGATCCGGTGTCTGCAAGTGTGGTGTCTCTCAAGATAGTAAGTGCAATCT	#12/39
	ATACCAGCTTATTCAATT	--GTTACAGCCACCTACATTGCAGGTTTTATAATACTACGCGCCGTTGCGAGGCTAGTTAGATAGTAAGTGCAATCT	#2/10
⑤	ATACCAGCTTATTCAATT	--GATGACGCCACCTACATTGCAGGTTTTATAATACTACGCGCCGTTGCGAGGCTAGTTAGATAGTAAGTGCAATCT	#9/26
	ATACCAGCTTATTCAATT	--GTTGACGCCACCTACATTGCAGGTTTTATAATACTACGCGCCGTTGCGAGGCTAGTTAGATAGTAAGTGCAATCT	#15/42
⑥	ATACCAGCTTATTCAATT	--ACAATGTCGCTCTCCGCCGAGGAGCATTGTCTGTCTTTATGCTTCTCTTTTTTGGTGCAGATAGTAAGTGCAATCT	#2/8
	ATACCAGCTTATTCAATT	--ACAATGTCGCTCTCCGCCGAGGAGCATTGTCTGTCTTTATGCTTCTCTTTTTTGGTGCAGATAGTAAGTGCAATCT	#12/33
⑦	ATACCAGCTTATTCAATT	---GGGTGGGTGTATAGAATGGGGATGCTGTGTTCGGGATAAGAATTTGTTGCTGGCTGTGTAGATAGTAAGTGCAATCT	#9/27
	ATACCAGCTTATTCAATT	---GCGTGGGTGTATAGAATGGGGATGCTGTGTTCGGGATAAGAATTTGTTGCTGGCTGTGTAGATAGTAAGTGCAATCT	#15/49
⑧	ATACCAGCTTATTCAATT	--GCGGAGTGGGTATATGAATTTGTTGTTGGTGGTTCATTTCTTCGGTGAAGCGGTTGCGAGATAGTAAGTGCAATCT	#12/35
	ATACCAGCTTATTCAATT	--GCGGAGTGGGTATATGAATTTGTTGTTGGTGGTTCATTTCTTCGGTGAAGCGGTTGCGAGATAGTAAGTGCAATCT	#12/37
	ATACCAGCTTATTCAATT	--CCCGACTCTACAAGCCCCCTGCTTACAGTCTCAGGTCATCGTTGCATTAGTTTGTGTTGATAGTAAGTGCAATCT	#2/3
	ATACCAGCTTATTCAATT	--GGGGTCCGTTAGGGATGGTAGTGGCTGGTGGCTGTAGATTTGTCTGTGGGTGGCTGGAGATAGTAAGTGCAATCT	#2/5
	ATACCAGCTTATTCAATT	--GCGTGGATGCGAGGGGGGATTTGAAGGAATTTGGTCTTGGAGTATGGTTGCTGGTTAGATAGTAAGTGCAATCT	#6/18
	ATACCAGCTTATTCAATT	---GCACTTCGACCGTCCGAGTATAGAGTTGGTTTGGCTTTGGGGAGTGTAGTTTGGGAGATAGTAAGTGCAATCT	#2/9
	ATACCAGCTTATTCAATT	--GGTGGCTGCAACGCGTAGTCTAGGTTCTTGTCTAAATGGGTTTGTGTGCTGCGTGTGAGATAGTAAGTGCAATCT	#6/12
	ATACCAGCTTATTCAATT	---CGGGGGTACGTGCCCGTGTGCTCGGGGGCCCCCTCGCTTATTTTTGTTGTCCTTTAGATAGTAAGTGCAATCT	#9/30
	ATACCAGCTTATTCAATT	--CTATACTCCACTTTGCTATTTCTCGTTCCCTCACGCGCGATGCGAGGCTGATGAATTGAGATAGTAAGTGCAATCT	#12/31
	ATACCAGCTTATTCAATT	--CACCGAACCCACCCAGTTACTCGTCCCAACAGATTCGCTATTTTTTACCAGGTTGATAGTAAGTGCAATCT	#12/34
	ATACCAGCTTATTCAATT	--GGGGCGCATGGACACACCGGATTTAACAACCCCTGCAGTCTCCCCACTATCCCGTGGAGATAGTAAGTGCAATCT	#12/38
	ATACCAGCTTATTCAATT	---CGTGGGGGATGCAATGTGATATGGATGGATTGCTAGTTCTCGAGGTCGTCATGGAGATAGTAAGTGCAATCT	#15/44
	ATACCAGCTTATTCAATT	--CGGGGGTGGCTGTAAGTGGATTGTTTTTCTATCATTGCTATTCGGGGCTGCTATTTGAGATAGTAAGTGCAATCT	#15/46
	ATACCAGCTTATTCAATT	-----GGGTGGTGGGGCTATAAATGAAGTAGTTTATTGTGCTGGAGTGGCTGTATGAGATAGTAAGTGCAATCT	#15/45
	ATACCAGCTTATTCAATT	--CCAGTGACGGTCCGTCTTCGATATTTATTCTTTGTTCTGTTGGTGGCTGCGGTGAGATAGTAAGTGCAATCT	#15/47
⑨	ATACCAGCTTATTCAATT	-----CGACGAGAACCCTATTGTGATACATTTTGTCTTCCGTTGGAGATAGTAAGTGCAATCT	#15/41
	ATACCAGCTTATTCAATT	-----CGACGAGAACCCTATTGTGATACATTTTGTCTTCCGTTGGAGATAGTAAGTGCAATCT	#15/43
	ATACCAGCTTATTCAATT	-----CAGCAGTGAAGGTTCCAATGGATTGTCAATTTCCCTGTTGAGATAGTAAGTGCAATCT	#2/4
	ATACCAGCTTATTCAATT	-----GCAGGCTCCGTCAGGGATTTGTAGTATTGCGTCTTCCGTTGAGATAGTAAGTGCAATCT	#6/14
	ATACCAGCTTATTCAATT	-----AAGGAATGGACTCGCCTCGGGTTGGTTTTTGTCTAGTTTCCGTTGAGATAGTAAGTGCAATCT	#9/23
	ATACCAGCTTATTCAATT	-----CCCACAGAGCTTCAATGTTCTGTTTTAGGTCGTTGGCCGATAGTAAGTGCAATCT	#9/24
	ATACCAGCTTATTCAATT	-----GAGCGACAGGACTACCAGCTTATTCAATTCCTGTGAGATAGTAAGTGCAATCT	#9/25
	ATACCAGCTTATTCAATT	-----CAAGCGACCAAGTTGGTGTACTTTTCTGTGCTGTTGAGATAGTAAGTGCAATCT	#12/36
	ATACCAGCTTATTCAATT	-----CCACAGGTTGTATGGGCATAAGTGGTGGCGGATAGTAAGTGCAATCT	#15/48

Abb. 8 Sequenzen von 44 Aptamer-Klone aus dem SELEX-Experiment mit Streptavidin-MB als Target

Durch den Sequenzvergleich der Kernregionen der 44 StrepAp Klone konnte festgestellt werden, dass der selektierte, Streptavidin-MB spezifische Aptamer-Pool aus einer Reihe unterschiedlicher Oligomere besteht. Eine konservierte Sequenzabfolge, die den Klonen gemeinsam ist, konnte nicht identifiziert werden. Dennoch kristallisierten sich 9 Gruppen heraus, von denen eine Gruppe aus 4 Klonen mit weitgehender Sequenzübereinstimmung und jeweils vier Gruppen aus 3 Klonen bzw. aus 2 Klonen besteht. Diese Gruppen sind sowohl untereinander, als auch zum Rest der Einzelklone verschieden.

Eine weitere Möglichkeit zur Charakterisierung und Einteilung der StrepAp Klone bietet die Basenzusammensetzung der Aptamer-Kernregion (Tab.10). Danach wurden überwiegend T-reiche bzw. G/T-reiche Aptamere selektiert.

Basenzusammensetzung der Aptamer Kernregion (ohne Primer)											
Klon StrepAp S6R13/...	Basenzahl					ges.	Anteil in %				Base mit >30% Anteil
	A	C	G	T	A		C	G	T		
#2/8	7	16	12	24	59	11,9	27,1	20,3	40,7	T	
#12/33	7	16	12	24	59	11,9	27,1	20,3	40,7		
#2/2w	10	12	16	22	60	16,7	20,0	26,7	36,7	T	
#6/17w	10	12	16	22	60	16,7	20,0	26,7	36,7		
#12/39	10	12	16	22	60	16,7	20,0	26,7	36,7		
#9/24	5	11	10	15	41	12,2	26,8	24,4	36,6	T	
#12/36	6	7	11	13	37	16,2	18,9	29,7	35,1	T	
#15/41	8	8	10	13	39	20,5	20,5	25,6	33,3	T	
#15/43	8	8	10	13	39	20,5	20,5	25,6	33,3		
#2/4	9	8	10	13	40	22,5	20,0	25,0	32,5	T	
#2/6	8	6	22	24	60	13,3	10,0	36,7	40,0	G + T	
#6/13	8	5	22	25	60	13,3	8,3	36,7	41,7		
#6/20	8	5	23	24	60	13,3	8,3	38,3	40,0		
#15/46	7	9	19	24	59	11,9	15,3	32,2	40,7	G + T	
#15/47	5	11	19	24	59	8,5	18,6	32,2	40,7	G + T	
#6/14	5	8	13	15	41	12,2	19,5	31,7	36,6	G + T	
#9/23	6	7	14	16	43	14,0	16,3	32,6	37,2	G + T	
#6/12	7	11	21	21	60	11,7	18,3	35,0	35,0	G + T	
#2/5	5	5	30	19	59	8,5	8,5	50,8	32,2	G + T	
#9/29	10	2	29	18	59	16,9	3,4	49,2	30,5	G + T	
#12/32	9	3	28	19	59	15,3	5,1	47,5	32,2		
#6/16w	9	4	28	20	61	14,8	6,6	45,9	32,8		
#15/50	9	3	28	19	59	15,3	5,1	47,5	32,2		
#6/18	10	4	26	19	59	16,9	6,8	44,1	32,2		
#15/45	9	3	24	19	55	16,4	5,5	43,6	34,5	G + T	
#9/27	10	4	25	19	58	17,2	6,9	43,1	32,8	G + T	
#15/49	10	5	24	19	58	17,2	8,6	41,4	32,8		
#12/35	9	6	24	21	60	15,0	10,0	40,0	35,0	G + T	
#12/37	9	6	24	21	60	15,0	10,0	40,0	35,0		
#6/15	13	5	22	20	60	21,7	8,3	36,7	33,3	G + T	
#2/7	10	5	23	19	57	17,5	8,8	40,4	33,3		
#2/19	13	5	22	20	60	21,7	8,3	36,7	33,3		
#2/9	8	7	22	21	58	13,8	12,1	37,9	36,2	G + T	
#9/30	2	18	19	19	58	3,4	31,0	32,8	32,8	C + G + T	

Fortsetzung der Tab. 10 s. unten

Basenzusammensetzung der Aptamer Kernregion (ohne Primer)											
Klon StrepAp S6R13/...	Basenzahl					ges.	Anteil in %				Base mit >30% Anteil
	A	C	G	T	A		C	G	T		
#12/31	10	18	12	20	60	16,7	30,0	20,0	33,3	C + T	
#2/3	10	19	11	20	60	16,7	31,7	18,3	33,3	C + T	
#15/48	6	6	15	7	34	17,6	17,6	44,1	20,6	G	
#15/44	10	7	24	16	57	17,5	12,3	42,1	28,1	G	
#12/34	12	21	10	16	59	20,3	35,6	16,9	27,1	C	
#12/38	13	20	15	12	60	21,7	33,3	25,0	20,0	C	
#2/10	15	16	12	17	60	25,0	26,7	20,0	28,3	A + C + G + T	
#9/26	15	16	13	16	60	25,0	26,7	21,7	26,7	A + C + G + T	
#15/42	14	16	13	17	60	23,3	26,7	21,7	28,3	A + C + G + T	
#9/25	9	9	9	9	36	25,0	25,0	25,0	25,0	A + C + G + T	

Basenzusammensetzung der Primerbindungsregion											
Primer- bindungsregion	Basenzahl					ges.	Anteil in %				Base mit >30% Anteil
	A	C	G	T	A		C	G	T		
AP10	6	4	1	7	18	33,3	22,2	5,6	38,9	A + T	
AP20 (kompl.)	7	2	4	5	18	38,9	11,1	22,2	27,8	A	

Tab. 10 Basenzusammensetzung der Kernregion und Primerbindungsregion der sequenzierten Aptamer-Klone

### 3.2.3. Bindungsversuche mit individuellen StrepAp Klonen

Nach der Klonierung des selektierten Aptamer-Pools aus dem SELEX-Prozess mit Streptavidin-MB als Target und der Sequenzanalyse mehrerer Klone standen nunmehr 44 StrepAp Klone mit bekannter Nukleotidabfolge für die Weiterbearbeitung zur Verfügung. Unter diesen 44 Klonen waren wiederum nur 29 verschiedene Sequenzen vorhanden, da einige Sequenzen 2fach - 4fach auftraten (Abb.8, Tab.10).

Zunächst wurden 7 individuelle StrepAp Klone ausgewählt, um deren Bindungsfähigkeit an Streptavidin-MB in Einzelexperimenten zu testen.

StrepAp Klon 2	(entspr. #2/2)	→	96nt,	Gruppe 4	T-reich
StrepAp Klon 6	(entspr. #2/6)	→	96nt,	Gruppe 3,	G+T-reich
StrepAp Klon 14	(entspr. #6/14)	→	77nt,	Einzelklon,	G+T-reich
StrepAp Klon 15	(entspr. #6/15)	→	96nt,	Gruppe 2,	G+T-reich
StrepAp Klon 26	(entspr. #9/26)	→	96nt,	Gruppe 5,	A+C+G+T
StrepAp Klon 32	(entspr. #12/32)	→	95nt,	Gruppe 1,	G+T-reich
StrepAp Klon 41	(entspr. #15/41)	→	75nt,	Gruppe 9,	T-reich

Dazu war es notwendig, die Aptamer ssDNA dieser Klone zu reinigen. Analog zum SELEX-Prozess wurde die DNA mittels PCR amplifiziert (Template: pDNA des jeweiligen Klons, Primer: AP60 (5'-Fluorescein) für den (+) Strang / TER-AP20 bzw. AP20Ribo für den Gegenstrang) und die relevante ssDNA nach Auftrennung der PCR-Produkte in der

denaturierenden PAGE eluiert (s. Kap.2.3.3.). Im Gegensatz zum Aptamer-Pool ergaben sich jedoch bei der Reinigung der ssDNA von einzelnen Klonen Schwierigkeiten. Dies zeigte sich in einer unsauberen Auftrennung beider Stränge in der denaturierenden PAGE und oftmals im Auftreten mehrere Banden. Diese Probleme traten unter Verwendung des PCR-Primers TER-AP20 stärker auf, so dass in nachfolgenden Versuchen der PCR-Primer AP20Ribo eingesetzt wurde, um die Aptamer ssDNA von individuellen Klonen zu reinigen. Anfangs wurde außerdem versucht, einen biotinylierten PCR-Primer für den Gegenstrang einzusetzen, um die doppelsträngigen PCR-Produkte über die Biotin-Kopplung an Streptavidin-MB zu fixieren. Nach mehreren Waschschritten konnte mittels 0,1M NaOH der Doppelstrang denaturiert und dadurch die relevante ssDNA freigesetzt werden. In nachfolgenden Bindungsversuchen zeigte sich jedoch, dass eine saubere Reinigung der Aptamer ssDNA mit dieser Methode nicht möglich war, da mitgeschleppte Verunreinigungen mit biotinylierter dsDNA die Ergebnisse der Bindungsreaktion zwischen Aptamer und Streptavidin-MB verfälschten.

Die Untersuchungen zur Bindungsfähigkeit individueller StrepAp Klone an Streptavidin-MB erfolgte gemäß den im SELEX-Prozess angewandten Bedingungen. Je Bindungsreaktion wurden  $1 \times 10^7$  Streptavidin-MB und ca. 9pmol (8-12pmol) Fluorescein-markierte Aptamer ssDNA in einem Gesamtvolumen von 200µl eingesetzt. Die Elution der gebundenen ssDNA wurde hier im eigentlichen Bindungs- und Waschpuffer  $BB+(KC)_{0.02\%T}$  ( $2 \times 100\mu l$ ) durchgeführt. Vorversuche haben gezeigt, dass die Hitzebehandlung des Bindungskomplexes allein bereits ausreichend ist für die Denaturierung und Freisetzung der ssDNA. Außerdem konnte auf diese Weise die eluierte ssDNA direkt für die Fluoreszenzmessung und Quantifizierung eingesetzt werden.

Die Ergebnisse der Bindungsversuche mit den oben genannten individuellen StrepAp Klonen sind in den nachfolgenden Abbildungen dargestellt.

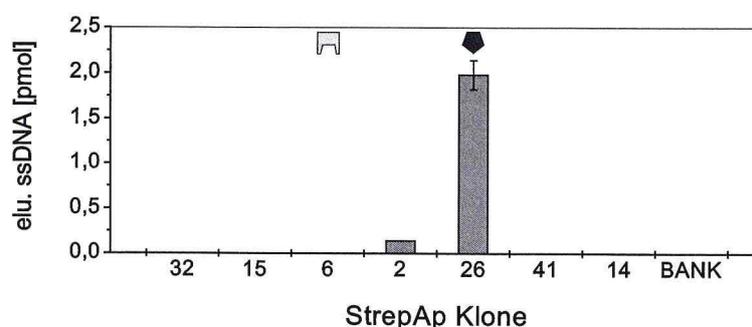


Abb. 9 Bindungsversuche mit individuellen StrepAp Klonen (Streptavidin-MB als Target)

Wie in Abbildung 9 gezeigt, wurde für den StrepAp Klon 26 eine sehr gute Bindungsfähigkeit ( $\sim 1,8-2,1 \text{ pmol}$ ;  $\sim 1-1,5 \times 10^5$  DNA-Moleküle/Bead) an Streptavidin-MB gefunden, für den StrepAp Klon 2 vergleichsweise eine eher schwache Bindungsfähigkeit ( $\sim 0,14 \text{ pmol}$ ;

~8,2x 10<sup>3</sup> DNA-Moleküle/Bead). Überraschenderweise war bei 5 der eingesetzten StrepAp Klone (Klon 32, 15, 6, 41 und 14) keine Bindung an die Streptavidin-MB in den Einzelversuchen nachzuweisen, obwohl sie im SELEX-Prozess mitselektiert wurden. Zum Vergleich wurde eine Bindungsreaktion mit der unselektierten ssDNA-Oligonukleotid Bibliothek (BANK, Fluorescein-markiert) durchgeführt. Das negative Ergebnis entsprach den Erwartungen, da in diesem Pool noch keine Target-spezifische ssDNA angereichert wurde. Um die fehlende Bindungsfähigkeit einiger Klone abzuklären wurden weitere Versuche mit definierten Klon-Mixen durchgeführt (Abb.10).

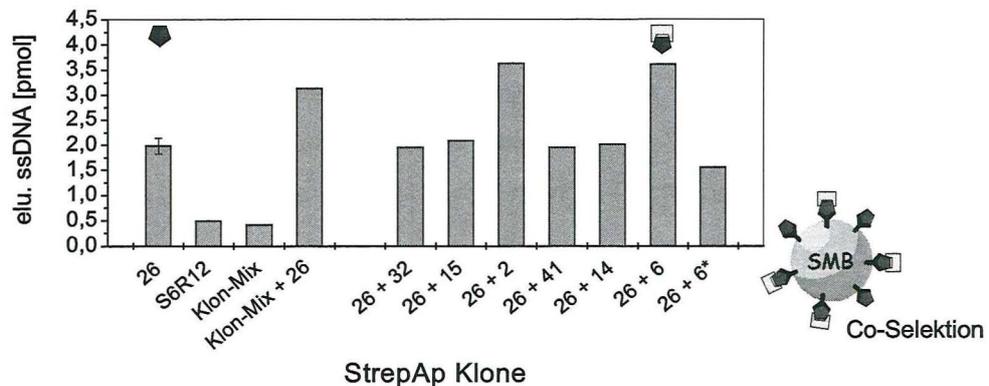


Abb.10 Bindungsversuche mit definierten StrepAp Klon-Mixen (1x 10<sup>7</sup> Streptavidin-MB als Target; Klon-Mix = Klon 32, 15, 6, 2, 41, 14; S6R12 = selektierte ssDNA aus Runde 12 des aktuellen SELEX-Prozesses mit Streptavidin-MB als Target, 6\* = unmarkierte ssDNA von Klon 6, SMB = Streptavidin-MB)

Bei den Klon-Mixen wurde von jedem Klon die gleiche Menge an Aptamer ssDNA (~9pmol, vergleichbar mit den Einzelversuchen) eingesetzt. Außerdem wurde ein Bindungsversuch mit selektierter ssDNA aus Runde 12 (S6R12, ~9pmol) des aktuellen SELEX-Prozesses mit Streptavidin-MB als Target durchgeführt. Im Vergleich zum Einzelexperiment mit StrepAp Klon 26 wurde hier nur wenig ssDNA an die Beads gebunden. Dies liegt darin begründet, dass in diesem Fall ein selektierter ssDNA Pool, mit unbekannter Zusammensetzung eingesetzt wurde. Die Menge der einzelnen Aptamere in diesem Pool ist anscheinend zu gering für eine gute Bindung. Unter Einsatz des definierten Klon-Mixes ohne StrepAp Klon 26 wurde ebenfalls nur wenig ssDNA an die Streptavidin-MB gebunden. Dies bedeutet, dass auch eine Kombination aus nicht bindenden und schwach bindenden Klonen keine wesentliche Verbesserung der Bindungsfähigkeit bewirkt. Sobald jedoch StrepAp Klon 26 im Klon-Mix enthalten ist, kommt es wieder zu einer starken Bindung von ssDNA an die Beads. Die Menge der gebundenen DNA übertrifft sogar jene aus dem Einzelversuch mit Klon 26. Ein vergleichbares Ergebnis wurde teilweise in Bindungsversuchen mit verschiedenen Zweierkombinationen, bestehend aus StrepAp Klon 26 und einem der anderen 6 Klone erreicht. Die Kombinationen Klon 26 / Klon 2 und Klon 26 / Klon 6 zeigten ebenfalls die vermehrte Bindung von ssDNA an die Streptavidin-MB, während bei den anderen

Kombinationen die Menge an gebundener ssDNA etwa auf dem Niveau aus dem Einzelversuch mit Klon 26 blieb.

Die Ergebnisse aus diesen Bindungsversuchen lassen schlussfolgern, dass eine Vielzahl der selektierten Aptamere allein nicht zu einer Bindung an die Streptavidin-MB fähig sind. Erst durch die Bindung eines positiven Klones direkt an die Streptavidin-MB, wie z. B. Klon 26, können einige der eigentlich negativen Klone ebenfalls an die Beads binden (z. B. Klon 26 + Klon 6). Augenscheinlich kam es im aktuellen SELEX-Prozess zu einer ausgeprägten Co-Selektion von Streptavidin-MB spezifischen Aptameren einerseits und unspezifischer ssDNA andererseits, die an die bereits gebundenen Aptamere koppelt. Diese Kopplung könnte durch die Ausbildung von sogenannten „kissing loops“ bedingt sein. Hierbei kommt es zu einer Hybridisierung zwischen einzelsträngigen Bereichen in der dreidimensionalen Struktur (z. B. in Loops) zweier Aptamer-Klone. Eine andere Möglichkeit könnte in der gleichzeitigen Selektion von Aptameren liegen, welche selektiv an bereits vorhandene Aptamer-Target-Komplexe binden.

Im Fall von StrepAp Klon 26 hat die Kopplung von Klon 6 (oder auch Klon 2) anscheinend keinen Einfluss auf die Bindungsfähigkeit von Klon 26 an die Streptavidin-MB. Dies zeigt auch ein weiterer Bindungsversuch mit der Kombination Klon 26 / Klon 6, bei dem jedoch die ssDNA von Klon 6 unmarkiert vorlag. Bei der Auswertung konnte so nur der Klon 26 erfasst werden, bei dem die gebundene DNA Menge im erwarteten Bereich lag (Abb.10). Die leichte Verminderung in der gebundenen DNA Menge lässt sich durch die sterische Hinderung der gekoppelten Aptamere auf der Sensoroberfläche, infolge ihrer größeren räumlichen Ausdehnung erklären.

Da das Ziel dieses SELEX-Prozesses in der Selektion Streptavidin-MB spezifischer Aptamere lag, wurden die 22 weiteren StrepAp Klone mit unterschiedlicher Sequenz auf deren Bindungsfähigkeit zu Streptavidin-MB gescreent. Dazu war es notwendig von jedem dieser Klone Fluorescein-markierte ssDNA zu präparieren (PCR mit pDNA des jeweiligen Klones als Template, Primer: AP60 (5'-Fluorescein) / AP20Ribo; denaturierende PAGE und Gelelution der relevanten ssDNA). Anschließend wurden einzelne Bindungsversuche mit  $1 \times 10^7$  Streptavidin-MB und  $\sim 9$  pmol der präparierten Aptamer ssDNA durchgeführt.

Es stellte sich heraus, dass nur drei weitere Klone (Klon 30, 31 und 33) in der Lage waren ebenfalls an die Streptavidin-MB zu binden. In Abbildung 11 ist nochmals eine Gegenüberstellung der Bindungsfähigkeit aller bisher gefundenen positiven StrepAp Klone dargestellt. Unter den angewandten Versuchsbedingungen (je Ansatz:  $1 \times 10^7$  Streptavidin-MB und  $\sim 9-14,5$  pmol Aptamer ssDNA) zeigten die im Screening gefundenen neuen Klone 30, 31 und 33 eine mit Klon 26 vergleichbare Bindungsfähigkeit. Dabei lieferten die StrepAp Klone 26 und 31 geringfügig bessere Ergebnisse als die Klone 30 und 33.

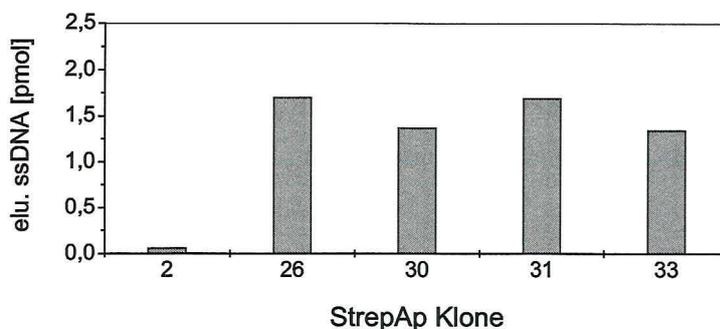


Abb. 11 Vergleich der Streptavidin-MB spezifischen Aptamer-Klone 2, 26, 30, 31 und 33 im einzelnen Bindungsversuch (je Ansatz:  $1 \times 10^7$  Streptavidin-MB, Einsatz von ~9-14,5pmol Aptamer ssDNA, Volumen 200 $\mu$ l)

Somit konnten von 44 untersuchten Klonen aus dem selektierten Aptamer-Pool 29 verschiedene Aptamer-Sequenzen ermittelt werden, von denen wiederum nur 5 StrepAp Klone direkt an die Streptavidin-MB binden konnten. Die nachfolgende Tabelle zeigt die positiven StrepAp Klone im Überblick.

StrepAp Klone 2	(entspr. #2/2)	→ 96nt, Gruppe 4	T-reich	} gute Bindung an Streptavidin-MB
StrepAp Klone 26	(entspr. #9/26)	→ 96nt, Gruppe 5,	A+C+G+T	
StrepAp Klone 30	(entspr. #9/30)	→ 94nt, Einzelklon,	C+G+T-reich	
StrepAp Klone 31	(entspr. #12/31)	→ 96nt, Einzelklon,	C+T-reich	
StrepAp Klone 33	(entspr. #12/33)	→ 95nt, Gruppe 6,	T-reich	
				} schwache Bindung an Streptavidin-MB

Tab. 11 Streptavidin-MB spezifische Aptamer-Klone

Nachdem sich die Anzahl der relevanten Aptamer-Klone auf fünf reduziert hat, wurden diese nochmals hinsichtlich ihrer Sequenz und Struktur analysiert. Zunächst wurden multiple und paarweise Sequenzvergleiche der Kernregion der StrepAp Klone 26, 30, 31 und 33 durchgeführt. Klon 2 wurde nicht mit einbezogen, da seine Bindungsfähigkeit weitaus schlechter ausgeprägt ist als bei den anderen positiven Klonen.

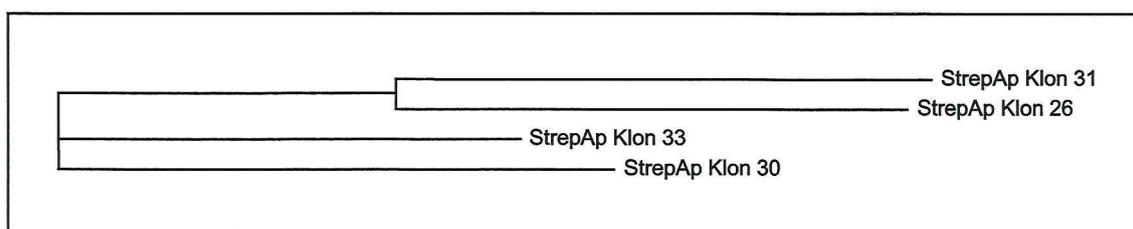


Abb. 12 Dendrogram zur Darstellung der Beziehungen zwischen den Streptavidin-MB spezifischen Aptamer-Klonen 26, 30, 31 und 33, basierend auf Ähnlichkeiten in deren Sequenz (Kernregion)

Mithilfe eines Dendrogram können verwandtschaftliche Beziehungen zwischen den zu vergleichenden Aptamer Sequenzen grafisch dargestellt werden. Diese Beziehungen

basieren auf Homologien zwischen den Sequenzen. Abbildung 12 zeigt, dass eine paarweise Aufteilung der StrepAp Klone 26, 30, 31 und 33 möglich ist. Dies wird auch durch den direkten Vergleich der Sequenz aus der Kernregion der Aptamer-Klone bestätigt (Abb.13). Die StrepAp Klone 26 und 31 besitzen eine große, weitgehend zusammenhängende, homologe Region am 3'-Ende der Kernsequenz und eine kleinere Region am 5'-Ende. Diese Tatsache weist auf ähnliche Strukturmerkmale beider Aptamer-Klone hin, die möglicherweise essentiell für deren Bindung an Streptavidin-MB sind.

StrepAp Klon 26	GATGCAGCCACCTACATTGCAGTTTTATAATACTACGCGCCGTTTCGAGGCTAGTT-----
StrepAp Klon 31	---CTATACTCC-ACCTTGCTATTTCTCGGTTTCCTC-ACGCGCCGATCGAGGCTGATGAATTG
StrepAp Klon 33	-----ACAATGTCGCTCTCCGCCGAGGAGCATTGCTGCTTTATGCTTCTCTTTTTTGTG
StrepAp Klon 30	CGGGGGTACGTGCCCGTGTGCTCGGCGGCCCTCGCTTATTTTGTG-TGCCCTTT

Abb.13 Sequenzvergleich der Streptavidin-MB spezifischen Aptamer-Klone 26, 30, 31 und 33 (Kernregion)

Die StrepAp Klone 30 und 33 zeigen ebenfalls homologe Bereiche, die jedoch eher gleichmäßig über die Kernsequenz der Aptamere verteilt ist, mit einer leichten Häufung in einer T-reichen Region am 3'-Ende. Außerdem sind diese Sequenzen völlig unterschiedlich zu denen der StrepAp Klone 26 und 31. Inwieweit die Unterschiede sich auf die Bindungsfähigkeit der Aptamer-Klone auswirken, muss in umfangreichen, weiterführenden Versuchen geprüft werden.

Die Struktur der Streptavidin-MB spezifischen Aptamere kann mit Hilfe spezieller Computerprogramme berechnet werden. Oftmals stehen im Internet auch kostenlose Tools diesbezüglich zur Verfügung, wie z. B. das Programm *mfold* (Strukturanalyse nach einer Energie-Minimierungs-Methode von Michael Zucker; <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/dna/>) [41]. Bei der Faltung der Aptamer ssDNA kann es zur Bildung charakteristischer Stems (doppelsträngige Bereiche), Loops (Ausschleifung von einzelsträngigen Bereichen: Haarnadelschleifen, interne Schleifen) oder Bulges (kleine, einzelsträngige Ausbuchtungen in doppelsträngigen Bereichen) kommen. Die Abbildung 14 zeigt für jeden der StrepAp Klone 26, 30, 31 und 33 eine mittels *mfold* (Standardbedingungen, Falttemperatur: 21°C, Ionenstärke: [Na<sup>+</sup>] 100mM / [Mg<sup>2+</sup>] 2mM) berechnete Struktur. Hierbei handelt es sich jeweils um die energetisch günstigste Strukturvariante. Darüber hinaus gibt es Abwandlungen dieser Strukturen, die rein rechnerisch energetisch ungünstiger sind. Welche der möglichen Sekundärstrukturen die Aptamere bei ihrer Bindung an das Zielmolekül in der Realität einnehmen, ist auf diese Weise nicht bestimmbar.

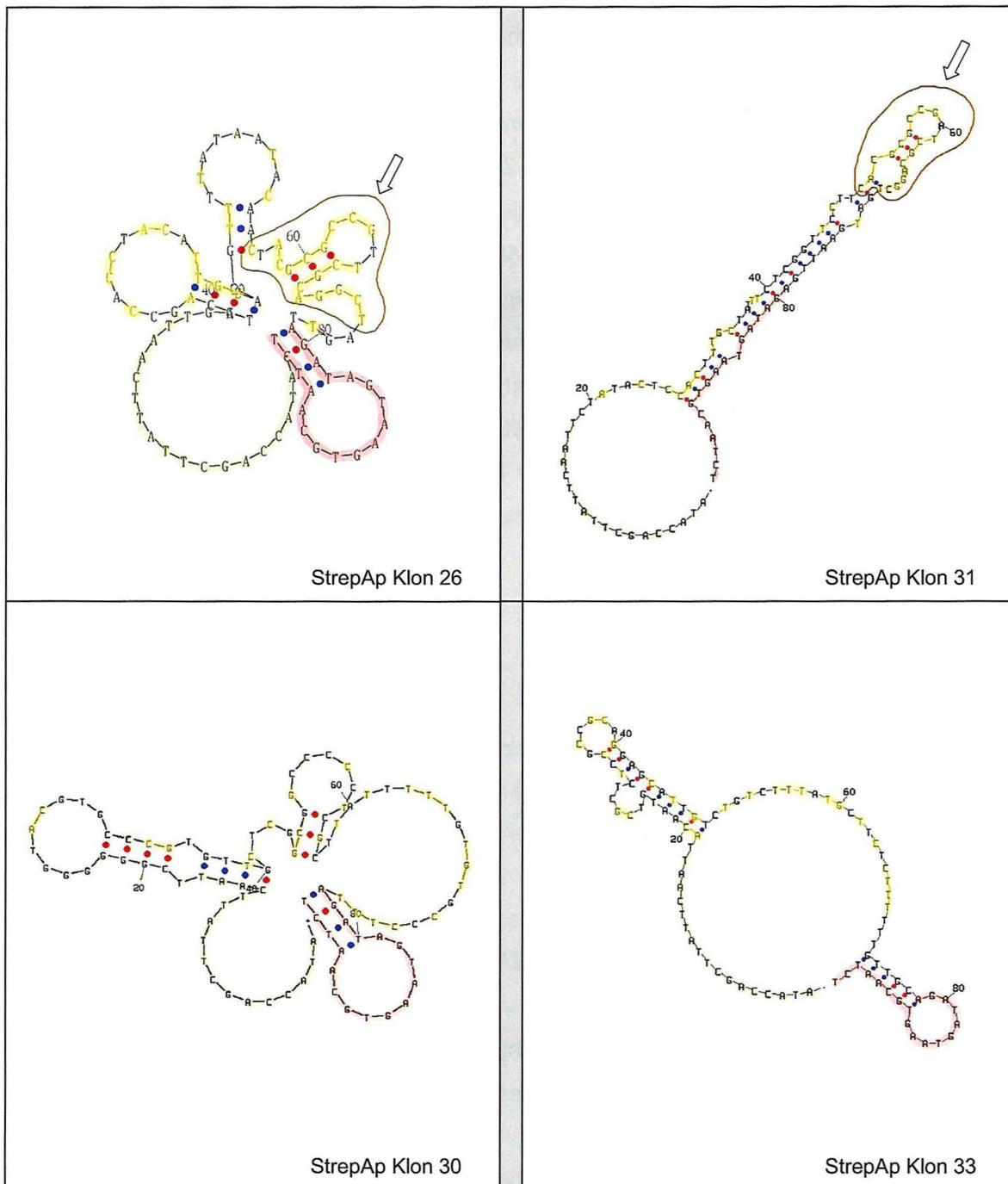


Abb. 14 Energetisch günstigste Strukturvariante für die Streptavidin-MB spezifischen StrepAp Klone 26, 30, 31 und 33 (grüne Markierung: Primerbindungsregion am 5'-Ende, rote Markierung: Primerbindungsregion am 3'-Ende, gelbe Markierung: homologe Bereiche zwischen StrepAp Klon 26 und 31 bzw. zwischen StrepAp Klon 30 und 33)

Die über Sequenzvergleiche gefundenen homologen Regionen zwischen den Aptamer-Klonen 26 und 31 bzw. 33 und 30 wurden farbig (gelb) markiert (Abb.14). Die große, zusammenhängende homologe Region der StrepAp Klone 26 und 31 am 3'-Ende ihrer Kernsequenz wurde zusätzlich mit einem Pfeil markiert. Hierbei handelt es sich in beiden Fällen um eine kleine Stem-Loop-Struktur, flankiert von kurzen einzelsträngigen Bereichen.

Bei Literaturrecherchen während des Projektes wurden Publikationen gefunden, die sich ebenfalls mit Streptavidin-Aptameren beschäftigten. Hintergrund dieser Arbeiten waren einerseits spezielle Anwendungsfälle, wie z. B. Untersuchungen zu RNA's und Riboproteinen mittels Streptavidin-spezifischer RNA Aptamere als „affinity tag“ oder der Einsatz von Streptavidin-spezifischen RNA Aptameren in bi-funktionellen Liganden [49;50]. Andererseits wurde im Rahmen einer Methodenentwicklung zur Evolution von Nukleinsäuren mit targetspezifischen Bindungseigenschaften DNA Aptamere für Streptavidin gewonnen [51]. Alle diese beschriebenen Streptavidin-spezifischen Aptamere unterscheiden sich sowohl in der Sequenz/Struktur, als auch in ihren Bindungseigenschaften ( $K_D$ -Werte von 3-200nM; z. T. Blockierung der Bindung bei Anwesenheit von Biotin).

Ziel des vorliegenden Projektes war die Nutzung der Streptavidin-MB als Target für die Etablierung des SELEX-Verfahrens. Darüber hinaus sollen die selektierten DNA Aptamere als Modellsystem zur Untersuchung der Biosensorapplikation von Aptameren unter Einsatz verschiedener Detektionsprinzipien dienen.

### *Perspektiven*

Die Charakterisierung des selektierten Aptamer-Pools aus dem SELEX-Experiment mit Streptavidin-MB als Target offenbarte ein stark ausgeprägtes Phänomen der Co-Selektion von Streptavidin-MB spezifischen Aptameren und unspezifischen ssDNA Molekülen bei diesem SELEX-Prozess. Daher war der Aptamer-Pool hinsichtlich der gefundenen Sequenzen noch sehr komplex aufgebaut. Konservierte Regionen konnten nicht identifiziert werden. Anscheinend sind nur wenige ssDNA Moleküle aus dem selektierten Pool in der Lage spezifisch an Streptavidin-MB zu binden, während die Mehrzahl lediglich an bereits gebundene DNA koppelt und allein nicht fähig ist an die Streptavidin-MB zu binden. Um dieses Phänomen in zukünftigen SELEX-Experimenten zu reduzieren, könnte einerseits eine kürzere random DNA-Oligonukleotid Bibliothek mit z. B. 40 variablen, internen Nukleotiden verwendet werden. Andererseits wäre eine Modifikation der SELEX-Bedingungen hinsichtlich der Bindungstemperatur ( $>21^\circ\text{C}$ ) oder der Salzkonzentration im Puffer ( $>100\text{mM NaCl}$ ) möglich, um durch stringenteren Bedingungen ein Ankoppeln unspezifischer ssDNA (durch Hybridisierungsereignisse) zu verhindern.

Optimierungsversuche am Aptamermolekül selbst könnten helfen, die für die Bindung der Aptamere an die Streptavidin-MB relevanten Strukturmerkmale zu identifizieren. Dazu müssten verschiedene Aptamervarianten mit Verkürzungen oder internen Deletionen auf der Basis der Sequenzvergleiche zwischen den positiven StrepAp Klonen und dem Auffinden homologer Regionen geschaffen werden, um sie dann auf ihre Bindungsfähigkeit an Streptavidin-MB zu testen.

### 3.2.4. Charakterisierung der Streptavidin-MB spezifischen Aptamer-Klone

#### 3.2.4.1 StrepAp Klon 26

Weitere Versuche zur Charakterisierung der Streptavidin-MB spezifischen Aptamer-Klone hinsichtlich Affinität und Einfluss verschiedener Faktoren auf die Bindungsfähigkeit wurden zunächst anhand des StrepAp Klones 26 durchgeführt. Die einzelnen Bindungsreaktionen erfolgten, wie bereits in Kapitel 3.2.3. beschrieben, gemäß den SELEX-Bedingungen.

#### Sättigungskurve

Durch die Aufnahme einer Sättigungskurve kann sowohl die Affinität (Affinitätskonstante  $K_D$ ) des Aptamer-Klones 26 zu den Streptavidin-MB als auch die Zahl der Bindungsstellen pro Bead ermittelt werden. Hierzu wurden mehrere Bindungsversuche mit konstanter Beadzahl ( $1 \times 10^7$  Streptavidin-MB) durchgeführt, wobei jedoch eine kontinuierlich ansteigende Menge an Aptamer ssDNA (0,25 - >100nM) zum Einsatz kam. Die Menge an gebundener ssDNA wurde nach der Hitze-Elution in  $BB+(KC)_{0,02\%T}$ -Puffer ( $2 \times 100\mu l$ ) über die direkte Fluoreszenzmessung bestimmt. Die grafische Auswertung der erhaltenen Daten zeigt die nachfolgende Abbildung.

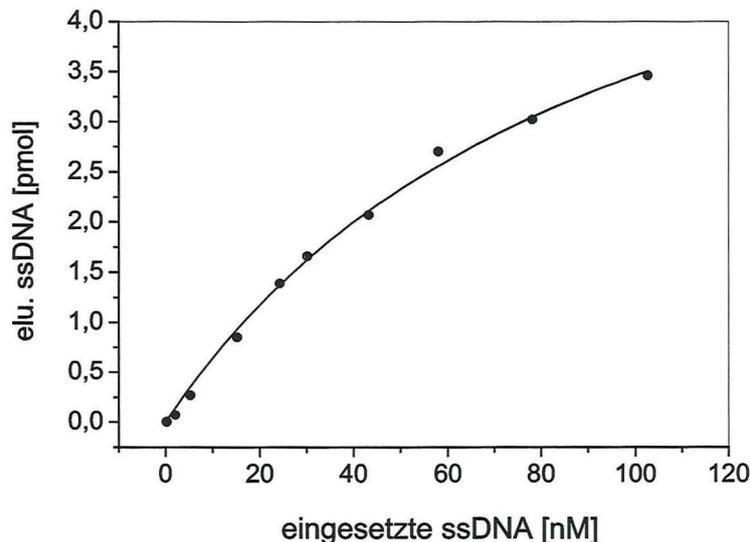


Abb. 15 Bindungsversuche mit StrepAp Klon 26: Sättigungskurve mit ansteigender Menge an eingesetzter Aptamer ssDNA bei konstanter Beadzahl (je Ansatz:  $1 \times 10^7$  Streptavidin-MB, Volumen  $200\mu l$ )

Die Kurve in Abbildung 15 zeigt einen weitgehend linearen Anstieg der gebundenen ssDNA bis zu einer Konzentration von ca. 30nM an eingesetzter Aptamer DNA. Anschließend beginnt die Kurve stärker abzuflachen, da sich die Menge der gebundenen ssDNA langsam der max. Bindungskapazität der Streptavidin-MB im Versuchsansatz nähert. Außerdem wurde eine Mindestkonzentration von  $\geq 2,5nM$  (bzw.  $\geq 0,5pmol/200\mu l$  Ansatzvolumen) an

vorzugebender Aptamer ssDNA ermittelt, um deren Bindung an die Streptavidin-MB unter den angewandten Versuchsbedingungen sicher nachzuweisen.

Für die Berechnung der beiden Parameter Bindungsaffinität ( $K_D$ ) und Anzahl an Bindungsstellen wurden folgende Datenanalysemethoden verwendet: 1. Scatchard-Plot Analyse, 2. Berechnung nach Eadie-Hofstee und 3. Nichtlineare Regressionsanalyse (nach Michaelis Menten). Die Ergebnisse aus den drei Auswertmethoden waren sehr gut vergleichbar, so dass für die zu ermittelnden Parameter ein Durchschnittswert gebildet wurde. Auf diese Weise konnte für die Bindung des StrepAp Klon 26 an Streptavidin-MB unter den angewandten Bedingungen eine Affinitätskonstante von  $K_D = 90\text{nM}$  ( $\pm 5,0$ ) ermittelt werden. Dieser Wert ist durchaus vergleichbar mit einer Vielzahl von Literaturangaben zu Aptamerentwicklungen für die unterschiedlichsten Zielmoleküle. Die hier beschriebenen  $K_D$ -Werte liegen durchschnittlich im picomolaren bis mikromolaren Bereich.

Die Zahl der Bindungsstellen für die Aptamere (Klon 26) im vorliegenden Versuchsaufbau kann mit  $6,5\text{pmol}$  ( $\pm 0,2$ )/ $10^7$  Streptavidin-MB (bzw.  $3,9 \times 10^5$  ssDNA Moleküle/Bead) angegeben werden.

#### *Einfluss von Biotin auf die Bindungsfähigkeit von StrepAp Klon 26*

Der natürliche und hochaffine Bindungspartner von Streptavidin ist Biotin ( $K_D = 10^{-15}\text{M}$ ). Streptavidin ist ein tetrameres Protein aus *Streptomyces avidinii*, welches 4 Bindungsstellen für Biotin besitzt. Das Streptavidin/Biotin-System wird daher für eine Vielzahl von Applikationen verwendet, wie z. B. für die Immobilisierung oder Reinigung von biotinylierten Molekülen oder dem Aufbau von Nachweisverfahren für die Immunologie.

Im Folgenden wurden einige Versuche durchgeführt, um die Bindungseigenschaften der hier selektierten, Streptavidin-MB spezifischen Aptamere (Klon 26) bei Anwesenheit von Biotin zu untersuchen. Die Experimente wurden so gestaltet, dass zunächst die Bindung von StrepAp Klon 26 (Fluorescein-markiert) an die Streptavidin-MB erfolgte. Nach dem Waschen der Bindungskomplexe wurden diese zu je  $1 \times 10^7$  Beads auf mehrere Ansätze verteilt. Anschließend wurden die Bindungskomplexe in verschiedenen Biotin-Lösungen aufsteigender Konzentration (0 - 1000pmol in  $200\mu\text{l}$  BB+(KC)<sub>0.02%T</sub>-Puffer) inkubiert. Auf diese Weise sollte herausgefunden werden, ob Biotin in der Lage ist die gebundenen Aptamere von den Streptavidin-MB zu verdrängen und damit zu eluieren. Nach der Biotin-Elution wurden die Bindungskomplexe gewaschen und anschließend die noch auf den Beads verbliebenen Aptamere durch Hitze-Behandlung ( $2 \times 100\mu\text{l}$  BB+(KC)<sub>0.02%T</sub>-Puffer) eluiert. Die Menge der abgelösten Aptamer ssDNA in den Elutions- und Waschfraktionen wurde über direkte Fluoreszenzmessung bestimmt und die Verteilung in einem Säulendiagramm dargestellt (Abb.16A-B).

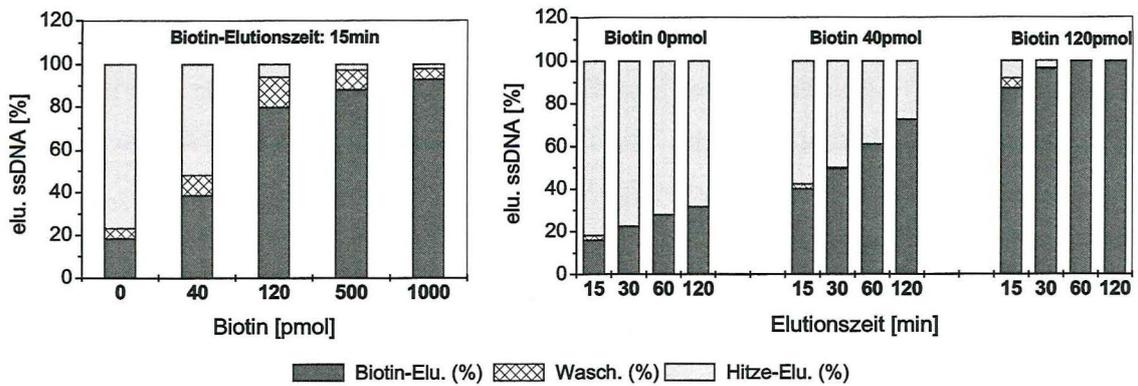


Abb. 16 Versuche zur Elution gebundener Aptamere (StrepAp Klon 26) von den Streptavidin-MB durch Biotin (je Ansatz:  $1 \times 10^7$  Streptavidin-MB, Volumen  $200 \mu\text{l}$ )

Die Messergebnisse zeigen, dass bereits bei einer Inkubation der Bindungskomplexe in reiner Pufferlösung ( $\text{BB}+(\text{KC})_{0,02\%T}$ -Puffer) etwa 20% der gebundenen Aptamere (Klon 26) innerhalb von 15min wieder von den Streptavidin-MB gewaschen werden (Abb.16A). Bei Inkubation der Bindungskomplexe in einer Biotinlösung wurden jedoch in Abhängigkeit der Biotin-Konzentration weitaus mehr Aptamere von den Beads verdrängt, bis zur vollständigen Elution der gebundenen Aptamere bei einem Einsatz von 500-1000pmol Biotin. Laut Herstellerangaben zu den Streptavidin-MB (Dynal Biotech GmbH, Hamburg) können  $10^7$  Beads ca. 105pmol freies Biotin binden. Somit wären 120pmol Biotin bereits ausreichend, um eine vollständige Elution gebundener Aptamere von  $10^7$  Streptavidin-MB zu erreichen, während 40pmol Biotin ca. 38% der gebundenen Aptamere verdrängen müsste. Diese Annahme konnte durch weitere Versuche mit längeren Elutionszeiten (15-120min) bestätigt werden (Abb.16B). Je länger die Inkubationszeit, um so mehr Aptamere werden bei gleich bleibender Biotin-Konzentration von den Streptavidin-Beads gewaschen. Dies trifft auch für die reine Pufferlösung ohne Biotin zu.

Neben den Elutionsversuchen mit Biotin wurden weitere Untersuchungen vorgenommen, bei denen vor bzw. während der Bindungsreaktion Biotin zum Einsatz kam (Abb.17). Hier waren die Effekte durch Biotin weitaus stärker ausgeprägt.

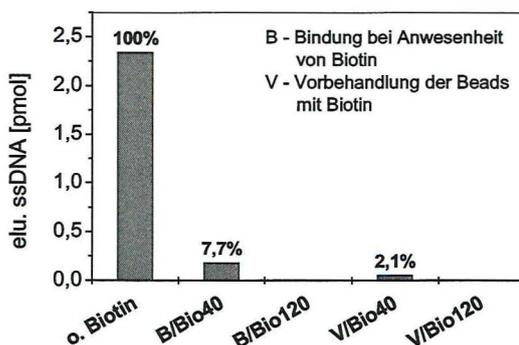


Abb. 17 Bindungsreaktion von StrepAp Klon 26 an Streptavidin-MB ohne bzw. mit Biotin; Vorbehandlung der Streptavidin-MB mit Biotin und anschließende Bindungsreaktion mit StrepAp Klon 26 (je Ansatz:  $1 \times 10^7$  Streptavidin-MB, Einsatz von  $\sim 9 \text{ pmol}$  Aptamer ssDNA, Volumen  $200 \mu\text{l}$ )

Im Vergleich zu einer Bindungsreaktion ohne Biotin (Einsatz von  $1 \times 10^7$  Streptavidin-MB und ca. 9pmol Aptamer ssDNA von Klon 26 in  $200 \mu\text{l}$   $\text{BB}+(\text{KC})_{0,02\%T}$ -Puffer) war bereits ein Zusatz von 40pmol Biotin ausreichend, um eine Bindungseffizienz der Aptamere von nur 7,7% zu erreichen (Abb.17). Wenn dagegen die Streptavidin-MB mit 40pmol Biotin vorbehandelt wurden, konnte in der anschließenden Bindungsreaktion (ohne Biotin) eine Bindungseffizienz von nur 2,1% verzeichnet werden.

Die Ergebnisse dieser Versuche lassen sich wie folgt zusammenfassen: 1. Biotin verdrängt konzentrationsabhängig die gebundenen Aptamere (StrepAp Klon 26) von den Streptavidin-MB, 2. die Anwesenheit von Biotin blockiert die Bindung der Aptamere (StrepAp Klon 26) an Streptavidin-MB und 3. aus den beiden ersten Punkten lässt sich schlussfolgern, dass die Bindung der Aptamere (StrepAp Klon 26) an die Streptavidin-MB an bzw. in der Nähe der Biotinbindungsstelle vom Streptavidin erfolgt.

### *Änderung der Bindungstemperatur*

Die Bindungsreaktion im SELEX-Prozess zur Gewinnung von Streptavidin-MB spezifischen DNA Aptameren wurde bei einer Temperatur von  $21^\circ\text{C}$  durchgeführt. Die nachfolgenden Versuche sollten die Toleranz der selektierten Aptamere (StrepAp Klon 26) gegenüber einem Temperaturwechsel bei der Bindung an die Streptavidin-MB testen. Die Bindungsreaktionen erfolgten unter Standardbedingungen ( $1 \times 10^7$  Streptavidin-MB und  $\sim 9$ pmol Fluorescein-markierte Aptamer ssDNA in einem Gesamtvolumen von  $200 \mu\text{l}$ ), jedoch bei unterschiedlichen Temperaturen ( $21 - 42^\circ\text{C}$ ).

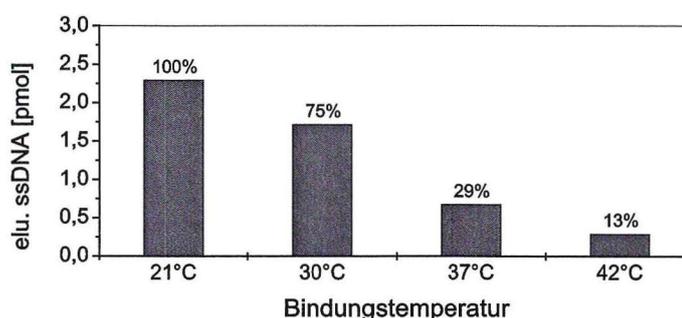


Abb. 18 Bindungsversuche mit StrepAp Klon 26 an Streptavidin-MB bei verschiedenen Temperaturen (je Ansatz:  $1 \times 10^7$  Streptavidin-MB, Einsatz von  $\sim 9$ pmol Aptamer ssDNA, Volumen  $200 \mu\text{l}$ )

Die Ergebnisse zeigen, dass bereits eine Temperaturänderung von  $21^\circ\text{C}$  auf  $30^\circ\text{C}$  eine Verminderte Bindung der Aptamere (StrepAp Klon 26) an die Streptavidin-MB zur Folge hat (Abb.18). Bei einer Bindungstemperatur von  $42^\circ\text{C}$  konnte nur noch eine Bindungseffizienz von 13% bestimmt werden. Bei höheren Temperaturen sind die selektierten Aptamere anscheinend nicht mehr in der Lage ihre für die Bindung spezifische Struktur aufrechtzuerhalten.

Diese Ergebnisse sind insbesondere für spätere Applikationen der selektierten Aptamere in verschiedenen Biosensorsystemen von Bedeutung. Hier sollte auf die Einhaltung einer konstanten Bindungstemperatur von 21°C geachtet werden.

### 3.2.4.2 StrepAp Klone 30, 31 und 33

Im weiteren Verlauf der Arbeiten wurden auch die Aptamer-Klone 30, 31 und 33 näher charakterisiert. Da die Sequenzanalyse Unterschiede zwischen den Streptavidin-MB spezifischen Klonen offenbarte, sollte nun festgestellt werden, ob sich die Aptamer-Klone auch in ihrem Bindungsverhalten unterscheiden. Dabei wurden die Ergebnisse mit dem bereits untersuchten Klon 26 verglichen.

#### Sättigungskurven

Wie bereits in Kap. 3.2.4.1 beschrieben wurden je StrepAp Klon mehrere Bindungsversuche gemäß den SELEX-Bedingungen mit konstanter Beadzahl ( $1 \times 10^7$  Streptavidin-MB) durchgeführt, wobei jedoch eine kontinuierlich ansteigende Menge an Aptamer ssDNA (0,25 - 190nM) zum Einsatz kam. Die Menge an gebundener ssDNA wurde nach der Hitze-Elution in  $\text{BB}+(\text{KC})_{0.02\%T}$ -Puffer ( $2 \times 100\mu\text{l}$ ) mittels Fluoreszenzmessung quantifiziert. Die Kurven in Abb. 19 repräsentieren die Auswertung der erhaltenen Messdaten zu den einzelnen Klonen mittels der Nichtlinearen Regressionsanalyse, welche auch die Ermittlung der  $K_D$ -Werte als Maß für die Affinität der Klone und die max. Zahl an Bindungsstellen im Ansatz ermöglichte.

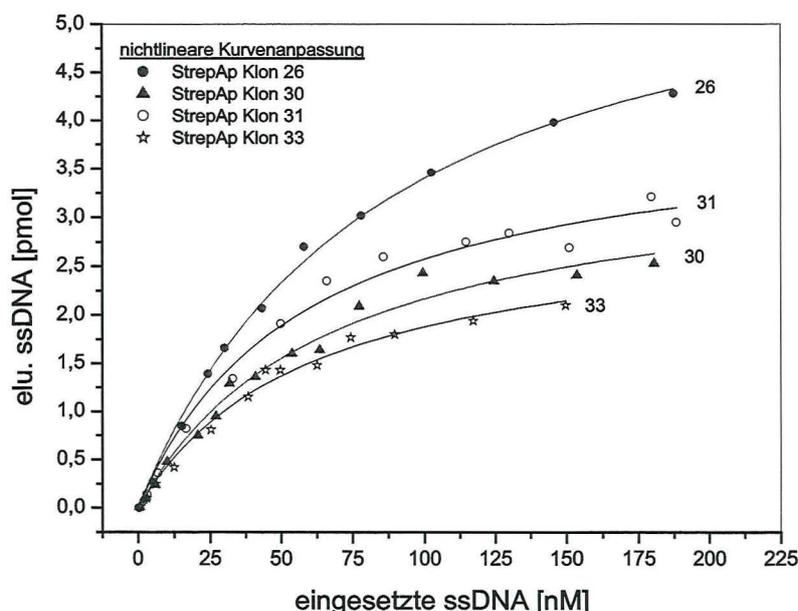


Abb. 19 Bindungsversuche mit StrepAp Klon 26, 30, 31 und 33: Sättigungskurven mit ansteigender Menge an eingesetzter Aptamer ssDNA bei konstanter Beadzahl (je Ansatz:  $1 \times 10^7$  Streptavidin-MB, Volumen  $200\mu\text{l}$ )

Die Kurve zum StrepAp Klon 26 entspricht weitgehend derjenigen aus Kap. 3.2.4.1. Sie wurde hier um zwei Datenpunkte erweitert (eingesetzte Aptamer ssDNA: ~146nM und ~188nM), was auch die Berechnung (Nichtlineare Regressionsanalyse) des  $K_D$ -Wertes und der max. Anzahl an Bindungsstellen im Ansatz beeinflusste (geringfügige Verminderung beider Werte). Beide Parameter sind in der nachfolgenden Tabelle für jeden untersuchten Klon aufgeführt.

<b>Aptamer-Klon</b>	<b><math>K_D</math>-Wert</b>	<b>max. Zahl an Bindungsstellen im Ansatz</b>
StrepAp 26	85,2nM	6,3pmol
StrepAp 30	65,5nM	3,6pmol
StrepAp 31	56,7nM	4,0pmol
StrepAp 33	59,0nM	3,0pmol

Tab. 12 Berechnung der  $K_D$ -Werte und der max. Anzahl an Bindungsstellen im Ansatz mittels Nichtlinearer Regressionsanalyse

Bei Bindungsversuchen gemäß den SELEX-Bedingungen mit beispielsweise 45nM Ausgangs-ssDNA (~9pmol Aptamer ssDNA,  $\sim 10^7$  Streptavidin-MB, Ansatzvol. 200 $\mu$ l) zeigte der Klon 26 die deutlich höchste Bindung von Aptameren an Streptavidin-MB. Dagegen war die Menge an gebundener ssDNA unter vergleichbaren Versuchsbedingungen bei den Klonen 30 und 33 geringer. Außerdem ist bei diesen Klonen anscheinend auch die Stabilität der Bindung geringer, da bei den Waschschritten nach der Bindung der Aptamere an die Streptavidin-MB deutlich mehr ssDNA wieder heruntergewaschen wurde, als bei den Klonen 26 und 31. Die paarweise Aufteilung der StrepAp Klone aufgrund der Sequenzvergleiche (Klon 26/31 und Klon 30/33) spiegelt sich somit auch in den beobachteten Bindungseigenschaften wieder.

#### *Einfluss von Biotin auf die Bindungsfähigkeit*

Wie im Kap. 3.2.4.1 für den StrepAp Klon 26 beschrieben wurden auch mit den Klonen 30, 31 und 33 Experimente zur Biotin-Elution durchgeführt. Dazu erfolgte zunächst die Bindung der Aptamere an Streptavidin-MB in einem größeren Ansatz. Nach dem Waschen der Bindungskomplexe wurden diese auf mehrere kleine Ansätze zu je  $1 \times 10^7$  Beads verteilt. Anschließend wurden die Bindungskomplexe in verschiedenen konzentrierten Biotin-Lösungen (0 - 500pmol in 200 $\mu$ l BB+(KC)<sub>0,02%</sub>T -Puffer) inkubiert (15min, 21°C, 1200rpm). Die durch Biotin von den Streptavidin-MB eluierten Aptamere wurden abgenommen und die verbliebenen Bindungskomplexe gewaschen. Im letzten Schritt erfolgte durch eine Hitzebehandlung die vollständige Ablösung aller, noch gebundenen Aptamere von den

Beads. Die Abbildung 20 zeigt in einem Säulendiagramm die Verteilung der abgelösten Aptamer ssDNA in den Elutions- und Waschfraktionen.

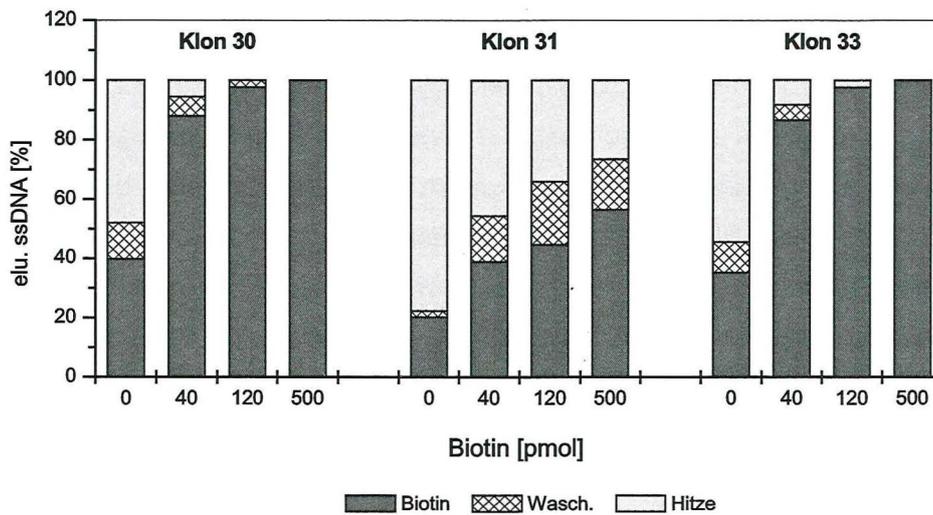


Abb. 20 Versuche zur Elution gebundener Aptamere (StrepAp Klon 30,31,33) von den Streptavidin-MB durch Biotin (je Ansatz:  $1 \times 10^7$  beladene Streptavidin-MB, Volumen 200 $\mu$ l)

Bereits durch die Inkubation der Bindungskomplexe (mit Aptameren beladene Streptavidin-MB) in reiner Pufferlösung ( $BB+(KC)_{0.02\%T}$ ) wurden bei den StrepAp Klonen 30 und 33 etwa 35 - 40% der gebundenen Aptamere von den Beads gewaschen. Bei dem Klon 31 waren es dagegen nur etwa 20%, was vergleichbar ist mit den Ergebnissen zu StrepAp Klon 26 (Abb.16). Bei Inkubation der Bindungskomplexe in einer Biotinlösung wurden jedoch in Abhängigkeit der Biotin-Konzentration weitaus mehr Aptamere von den Beads verdrängt. Besonders deutlich konnte der Effekt bei den Klonen 30 und 33 beobachtet werden. Hier wurden bereits durch eine 40pmol Biotinlösung (200nM) insgesamt 85 - 90% der gebundenen Aptamere von den Streptavidin-MB eluiert. Eine vollständige Elution konnte bei einem Einsatz von 120 - 500pmol Biotin erreicht werden. Bei Klon 31 war der Effekt der Biotin-Elution nicht so drastisch ausgeprägt. Durch die 40pmol Biotinlösung (200nM) wurden hier nur insgesamt ~40% der gebundenen Aptamere von den Streptavidin-MB eluiert. Dieser Anteil erhöhte sich in kleinen Schritten auf >55% bei einem Einsatz von 500pmol Biotin. Die Ergebnisse zeigen, dass die Bindungsfähigkeit der untersuchten StrepAp Klone (26, 30, 31 und 33) durch Biotin beeinflusst wird. Bereits gebundene ssDNA wird bei allen vier Klonen, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß, durch Biotin von den Streptavidin-MB verdrängt. Dieses unterschiedliche Verhalten stimmt gut mit der paarweisen Einteilung der StrepAp Klone (26/31 und 30/33) überein, welche auf Sequenzhomologien und strukturellen Ähnlichkeiten basiert.

## Bindung an freie Streptavidinmoleküle

Alle Bindungsversuche zur Charakterisierung der selektierten Aptamere (StrepAp Klon 26, 30, 31 und 33) wurden bisher mit Streptavidin-MB, dem eigentlichen Target aus dem SELEX-Prozess, durchgeführt. Für Biosensorapplikationen dieser Aptamere ist es jedoch wichtig, deren Fähigkeit zur Bindung an freie Streptavidinmoleküle zu untersuchen. Dazu wurden zwei verschiedene Methoden herangezogen. Einerseits wurde die Messung der Fluoreszenzpolarisation zum Nachweis der Ausbildung eines Bindungskomplexes zwischen Aptamer und Streptavidin in Lösung genutzt. Andererseits sollte der Nachweis indirekt erfolgen, durch eine Elution bereits gebundener Aptamere an Streptavidin-MB mittels Zugabe eines Überschusses an freiem Streptavidin zu den Bindungskomplexen.

Mittels der Fluoreszenzpolarisation konnte bisher jedoch keine Bindung zwischen Aptamer und freiem Streptavidin nachgewiesen werden. Möglicherweise wurden hier noch nicht die richtigen Versuchsbedingungen gefunden (Methodenentwicklung), bzw. der Unterschied im Molekulargewicht der Bindungspartner ist für die Anwendung dieser Methode zu gering.

Für die Elutionsversuche mit einem Überschuss an freiem Streptavidin wurden zunächst die Aptamere in einem größeren Ansatz an Streptavidin-MB gemäß den SELEX-Bedingungen gebunden. Anschließend wurden die Bindungskomplexe zu je  $1 \times 10^7$  beladene Beads aliquotiert und die verschiedenen Elutionsversuche mit reiner Pufferlösung (BB+(KC)<sub>0.02%</sub>T), bzw. mit einer Streptavidinlösung (200pmol Streptavidin in 200µl BB+(KC)<sub>0.02%</sub>T) oder einer BSA-Lösung (200pmol BSA in 200µl BB+(KC)<sub>0.02%</sub>T zur Kontrolle) durchgeführt. Dazu wurden die Ansätze für 30min bei 21°C und 1200rpm inkubiert. Nach Abnahme der eluierten ssDNA und dem Waschen der Beads erfolgte mittels Hitzebehandlung die vollständige Ablösung der noch verbliebenen Aptamere von den Streptavidin-MB.

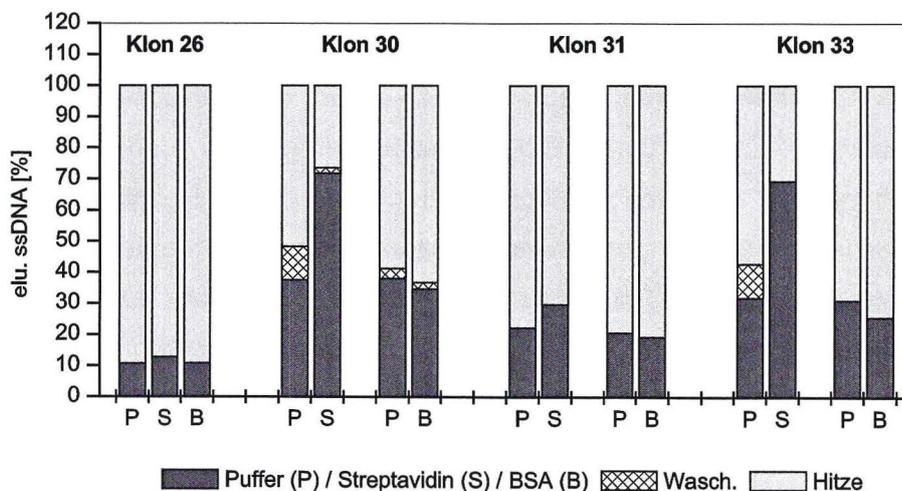


Abb. 21 Versuche zur Elution gebundener Aptamere (StrepAp Klon 26, 30,31,33) von den Streptavidin-MB durch Überschuss an freiem Streptavidin (200pmol) bzw. BSA (200pmol) (je Ansatz:  $1 \times 10^7$  beladene Streptavidin-MB, Volumen 200µl)

Aus Abbildung 21 ist erkennbar, dass bei StrepAp Klon 26 und auch bei StrepAp Klon 31 keine bzw. nur wenige Aptamere durch einen Überschuss an freiem Streptavidin von den beladenen Streptavidin-MB eluiert wurden (im Vergleich zur Inkubation in reiner Pufferlösung). Die Elutionsversuche mit den Klonen 30 und 33 zeigten dagegen andere Ergebnisse. Hier wurden deutlich mehr Aptamere (etwa die zweifache Menge) durch die Streptavidinlösung im Vergleich zur reinen Pufferlösung von den beladenen Beads eluiert. Bei keinem der vier Klone konnte jedoch im Kontrollansatz eine Elution von Aptameren durch BSA beobachtet werden.

Im Anschluss wurden mit den StrepAp Klonen 30 und 33 analoge Versuche durchgeführt, bei denen jedoch unterschiedliche Mengen an Streptavidin (60 - 1000pmol in je 200µl BB+(KC)<sub>0.02%T</sub>) für die Elution zum Einsatz kamen.

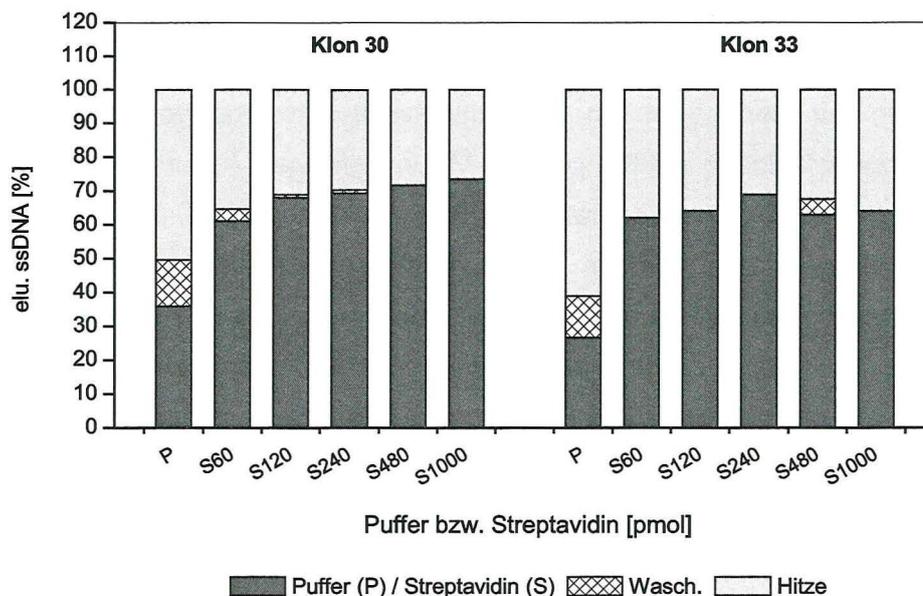


Abb. 22 Versuche zur Elution gebundener Aptamere (StrepAp Klon 30 und 33) von den Streptavidin-MB durch verschiedenen Mengen an freiem Streptavidin (60-1000pmol) (je Ansatz:  $1 \times 10^7$  beladene Streptavidin-MB, Volumen 200µl)

Entsprechend den Ergebnissen in Abbildung 22 ist bereits mit dem Einsatz von 60 - 120pmol Streptavidin ein Plateau in der eluierbaren Menge an ssDNA von den beladenen Streptavidin-MB erreicht. Deutlich höhere Konzentrationen an Streptavidin brachten keinen weiteren bzw. nur einen leichten Anstieg in der Menge an eluierbarer ssDNA. Eine vollständige Elution aller gebundenen Aptamere konnte bei beiden Klonen nicht erreicht werden.

Da eine Bindung der hier selektierten Aptamere an freiem Streptavidin bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, muss auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die hier selektierten Aptamere, insbesondere die StrepAp Klone 26 und 31, spezifisch an immobilisiertem Streptavidin binden. Vorstellbar wäre eine Bindung an zwei eng beieinander

liegenden Streptavidinmolekülen. Denkbar ist auch eine Strukturänderung zwischen freiem und gebundenem Streptavidin infolge der Immobilisierung. Dieses Phänomen muss noch in weiteren Versuchen abgeklärt werden.

### *Perspektiven*

Für die weitere Charakterisierung der selektierten, positiven StrepAp Klone sind Versuche insbesondere zur Spezifität der Aptamere notwendig. Hier sollte die Bindungsfähigkeit der Aptamer-Klone zu verwandten Substanzen, wie z. B. Avidin oder Neutravidin geprüft werden. Im Hinblick auf Untersuchungen zur Biosensorapplikation von Aptameren könnten die selektierten StrepAp Klone als Modellsystem eingesetzt werden. Dazu gehören Versuche zur Immobilisierung von DNA Aptameren auf Sensoroberflächen, sowie zur Stabilität und Regenerierbarkeit der Aptamere. Ein kommerziell erhältliches Biosensorsystem mit markierungsfreiem Detektionsprinzip (IASys Affinitätssensor) steht für umfangreiche Bindungsstudien zur Verfügung. Eine Voraussetzung für derartige Untersuchungen ist jedoch die Bindungsfähigkeit der Streptavidin-MB spezifischen Aptamere an frei in Lösung vorliegendem Streptavidin. Dies konnte für die StrepAp Klone 26, 30, 31 und 33 bisher nicht nachgewiesen werden. Hier könnten jedoch weitere SELEX-Runden unter Einsatz der verbliebenen, selektierten ssDNA aus Runde 12 zum Erfolg führen, in dem die gebundenen Aptamere nicht durch Hitze, sondern durch einen Überschuss an freiem Streptavidin in der Elutionslösung von den Streptavidin-MB eluiert werden. Eine spezifische Anreicherung von Aptameren, die auch freies Streptavidin binden, könnte durch Gelshift-Experimente überprüft werden.

### **3.3. IAsys - Affinitätssensor**

Der IAsys-Biosensor ist ein kommerziell erhältliches Affinitätssensorsystem zur markierungsfreien Untersuchung biomolekularer Interaktionen (Firma: Thermo Labsystems; Aufbau und Funktionsweise s. Kap.2.6.). Es erlaubt sowohl qualitative als auch quantitative Aussagen über die Bindung zwischen zwei Molekülen in Echtzeit. Dieses Sensorsystem sollte im vorliegenden Projekt für Bindungsstudien mit den selektierten DNA Aptameren und dem entsprechenden Zielmolekül eingesetzt werden.

Anhand des einfacheren Modellsystems DNA/DNA-Hybridisierung wurden bereits parallel zu den SELEX-Experimenten erste Untersuchungen am IAsys-Biosensor hinsichtlich Immobilisierung der DNA auf der Sensoroberfläche, Bindungs-/Dissoziationbedingungen und Regenerierbarkeit der Sensoroberfläche durchgeführt. Die hier gesammelten Erfahrungen sollten anschließend auf den Einsatz von Aptameren übertragen und angepasst werden.

#### **3.3.1. Modellsystem: DNA/DNA-Hybridisierung**

Anhand des Modellsystems DNA/DNA-Hybridisierung wurden erste Voruntersuchungen am IAsys-Biosensor durchgeführt, um die methodischen Grundlagen für die Immobilisierung von ssDNA Molekülen auf einer Sensoroberfläche und für die Durchführung von Bindungsstudien zu etablieren.

Die IAsys-Probenküvetten mit einer planaren, Biotin-beschichteten Oberfläche sind für die Immobilisierung von DNA über eine Streptavidin-Biotin-Kopplung sehr gut geeignet. Der erste Schritt hierbei besteht in der Ausbildung einer Streptavidinschicht auf der Sensoroberfläche. Anschließend erfolgt im nächsten Schritt die Bindung des biotinylierten Oligonukleotids. Die Sensoroberfläche ist nun bereit für Bindungsstudien mit einem geeigneten Analyten, in diesem Fall für die Hybridisierung mit einem komplementären Oligonukleotid. Eine Standardmessung gliedert sich dabei in folgende Phasen: 1. Aufnahme der Basislinie (Puffer ohne Analyt), 2. Bindung (Zugabe des Analyten), 3. Dissoziation (Waschen der Oberfläche mit Puffer) und 4. Regeneration (Ablösen des Analyten). Den Verlauf einer typischen Immobilisierung mit anschließender Hybridisierung zeigt die Abbildung 23. Die Reaktionen auf der Sensoroberfläche können in Echtzeit mitverfolgt werden.

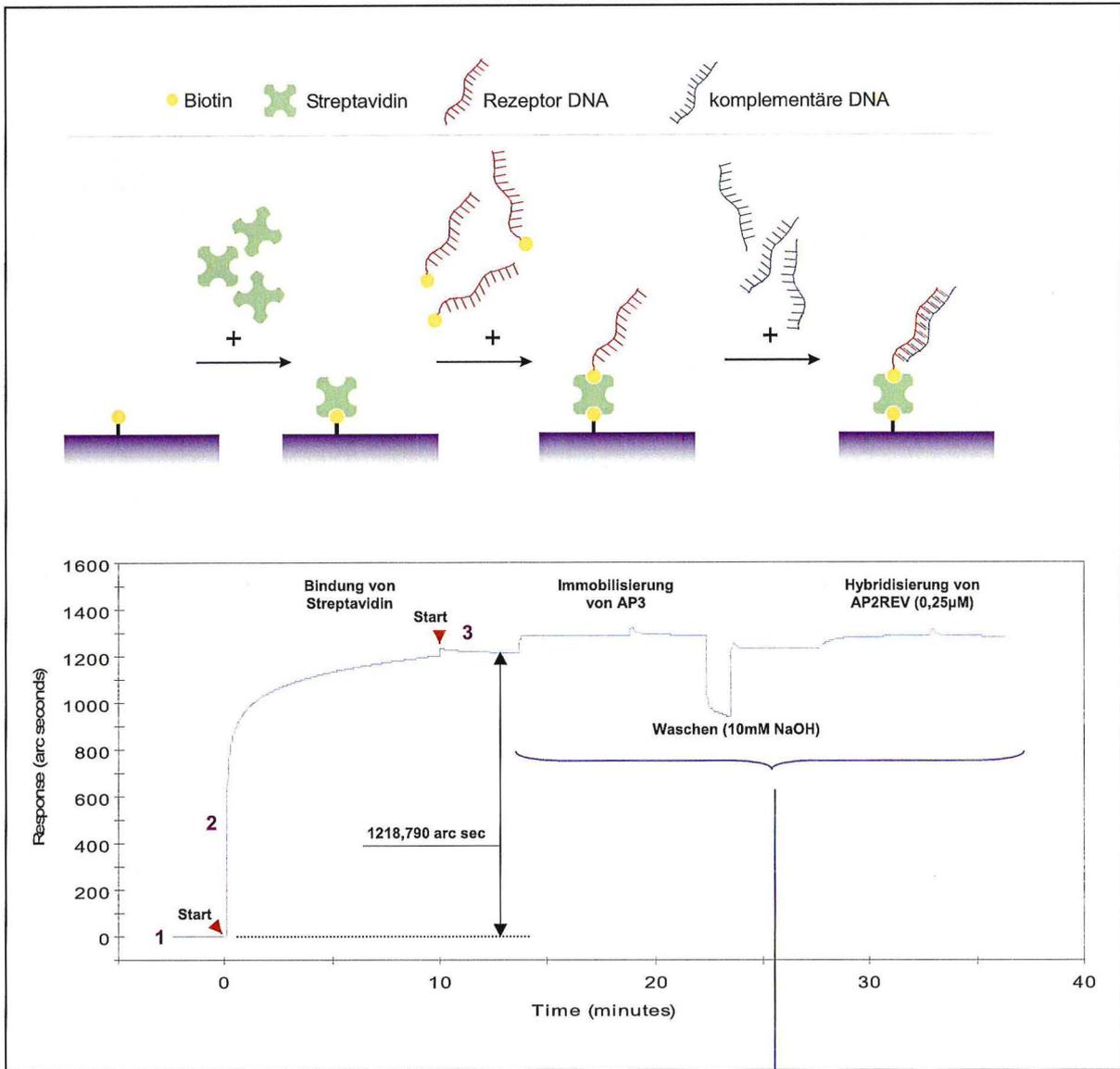
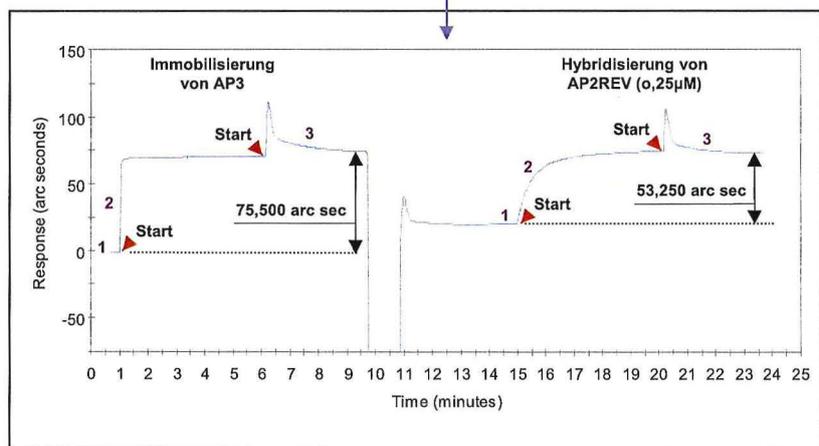


Abb. 23 IAsys-Biosensor  
 Signaländerung durch Bindung von Streptavidin an eine Biotin-Oberfläche, Immobilisierung der Rezeptor DNA (AP3) und Hybridisierung der komplementären DNA (AP2REV)

- 1 - Basislinie
- 2 - Bindung
- 3 - Dissoziation
- Start ▲ = Beginn der Bindungs- bzw. Dissoziationsphase



Infolge des Massezuwachses an der Sensoroberfläche durch Anbindung von Streptavidin, Immobilisierung von biotinylierter ssDNA und Hybridisierung komplementärer DNA kommt es jeweils zu einer Signaländerung. Das Ausmaß dieser Signaländerung ist dabei abhängig von

der Anzahl und dem Molekulargewicht der bindenden Moleküle, sowie von deren Affinität zu dem entsprechenden Rezeptor auf der Sensoroberfläche.

Die Bindung von Streptavidin an die biotinbeschichtete Sensoroberfläche hat durch den relativ hohen Massezuwachs eine große Signaländerung zur Folge. Die Signalstärke, als ein Maß für die gebundene Streptavidinmenge, errechnet sich aus der Subtraktion des Baselinelevels (~0,2-0,5min vor der Bindung) von dem Level, aufgenommen nach ~3min nach Start der Dissoziationsphase. In dem dargestellten Versuch beträgt die Änderung des Signals 1218,790arc sec. Aus dem Vergleich mit anderen, analogen Versuchen, läßt sich dieser Wert als Richtwert für eine optimale Beschichtung der Sensoroberfläche mit Streptavidin ableiten. Daneben kann mittels einer vom Hersteller ausgegebenen Faustformel für planare Biotin-Küvetten die Menge an gebundenem Protein in ng berechnet werden:

$$600\text{arc sec} = 1\text{ng Protein/mm}^2 \quad (\text{Sensoroberfläche einer Biotin-Küvette: } 16\text{mm}^2)$$

Demnach entsprechen 1218,790arc sec einer gebundenen Streptavidinmenge von 35,5ng. Die anschließende Immobilisierung des Oligonukleotids AP3 (5'-Biotin) resultierte in einer Signaländerung von 75,500arc sec. Die Sensoroberfläche ist nun direkt bereit für verschiedene Hybridisierungsexperimente mit einem komplementären Oligonukleotid (AP2REV). Es ist jedoch auch möglich die Oberfläche nochmals unter härteren Bedingungen (z.B. 10mM NaOH) zu waschen, um alle ungebundenen oder nicht korrekt gebundenen Moleküle zu entfernen. Die erste Bindung mit dem Oligonukleotid AP2REV (0,25µM) führte zu einer Signaländerung von 53,250arc sec.

Weitere Hybridisierungen sind nach einer Regeneration der Sensoroberfläche möglich. Hierbei werden die entstandenen DNA Doppelstränge wieder chemisch denaturiert und die komplementäre DNA abgewaschen. Die starke Biotin-Streptavidin-Bindung (Immobilisierung der Rezeptor DNA AP3) bleibt davon unbeeinflusst. Für die Regeneration wurden folgende Lösungen getestet: 1mM HCl, 5mM HCl, 10mM HCl, 5mM NaOH, 10mM NaOH, 15mM NaOH, 4M Harnstoff, 1M NaCl/50mM NaOH und 0,1M NaOH. Die besten Ergebnisse, hinsichtlich der Signaländerung bei der anschließenden Hybridisierung, ließen sich mit 10mM NaOH (bzw. 5mM HCl) erreichen. Mehrere Messzyklen aus Hybridisierung und Regenerationen sind möglich, so dass bisher 39 Messungen, verteilt über mehrere Tage, mit einer Sensoroberfläche durchgeführt werden konnten. Hierbei zeigte sich jedoch ein abnehmender Trend in der Signalthöhe bei konstanten Messbedingungen und Oligonukleotid-Konzentration. Generell blieben die Messwerte jedoch unter dem aus der ersten Hybridisierung, die unmittelbar nach der Immobilisierung der Rezeptor DNA erfolgte. Mehrere Regenerationen sind möglich. Bisher wurden 39 Messungen, verteilt über mehrere Tage, mit einer Sensoroberfläche durchgeführt. Hierbei zeigte sich jedoch ein abnehmender Trend in der Signalthöhe bei konstanten Messbedingungen und Oligonukleotid-Konzentration. Nachteilig wirkte sich auch eine längere Lagerung der Küvetten (mehrere Tage) zwischen den Messungen aus. Hier war es sinnvoller die Sensoroberfläche vollständig

zu regenerieren und mit einer neuen Immobilisierung der Rezeptor-DNA zu beginnen. Die vollständige Regeneration, einschließlich des Aufbrechens der Biotin-Streptavidin-Bindung konnte mit einer Inkubation der Oberfläche in 10M KOH (1min) erreicht werden. Bisher war eine derartige Regeneration einer Probenküvette mit erfolgreicher Neuimmobilisierung von biotinylierter DNA und nachfolgender Hybridisierungen 13x möglich.

Die mit diesen Experimenten ermittelten Bedingungen für die Immobilisierung von biotinmarkierter ssDNA auf einer Sensoroberfläche, sowie die Regenerationsbedingungen können später auf die Bindungsstudien mit DNA Aptameren als Rezeptormoleküle übertragen werden.

In Hybridisierungsexperimenten mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Analyt DNA (zu AP3 komplementäre DNA: AP2REV; 0,5nM - 0,25µM Endkonzentration) konnte eine charakteristische Sättigungskurve aufgenommen werden. Die Auswertung der Daten ist in den nachfolgenden Abbildungen dargestellt.

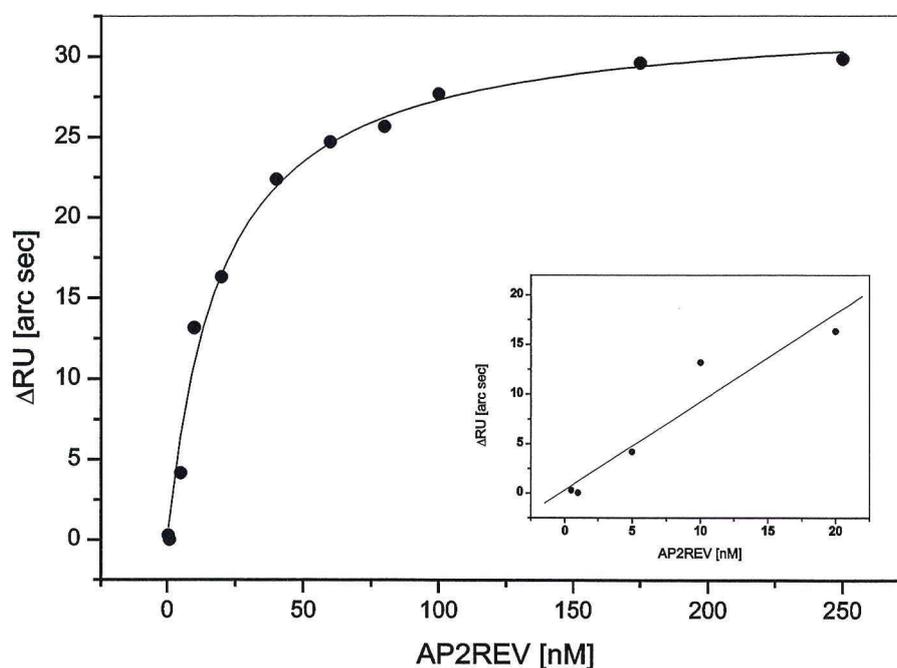


Abb. 24 Bindungsmessungen mit einer Konzentrationsreihe des komplementären Oligonukleotids AP2REV (immobilisierte Rezeptor-DNA AP3)

Die Kurve in Abbildung 24 zeigt einen nahezu linearen Anstieg in einem Konzentrationsbereich von 1nM - 20nM AP2REV und geht bei höheren DNA Konzentrationen in ein Plateau über. Die Grenze für den Nachweis der komplementären DNA in einer Probe liegt bei diesen Messungen bei ~5nM. Mittels der Nichtlinearen Regressionsanalyse konnte aus den erhaltenen Daten eine Bindungskonstante von  $K_D = 19,6\text{nM}$  für dieses Hybridisierungssystem ermittelt werden. Darüberhinaus wurde die

Spezifität der Hybridisierungsreaktion mit einem nichtkomplementären Oligonukleotid (AP2) getestet. Die Zugabe der Kontroll-DNA mit einer Endkonzentration von 0,25µM führte zu keiner messbaren Bindung an die Sensoroberfläche (Abb.25). Die Werte lagen eindeutig unterhalb der Nachweisgrenze des Mess-Systems.

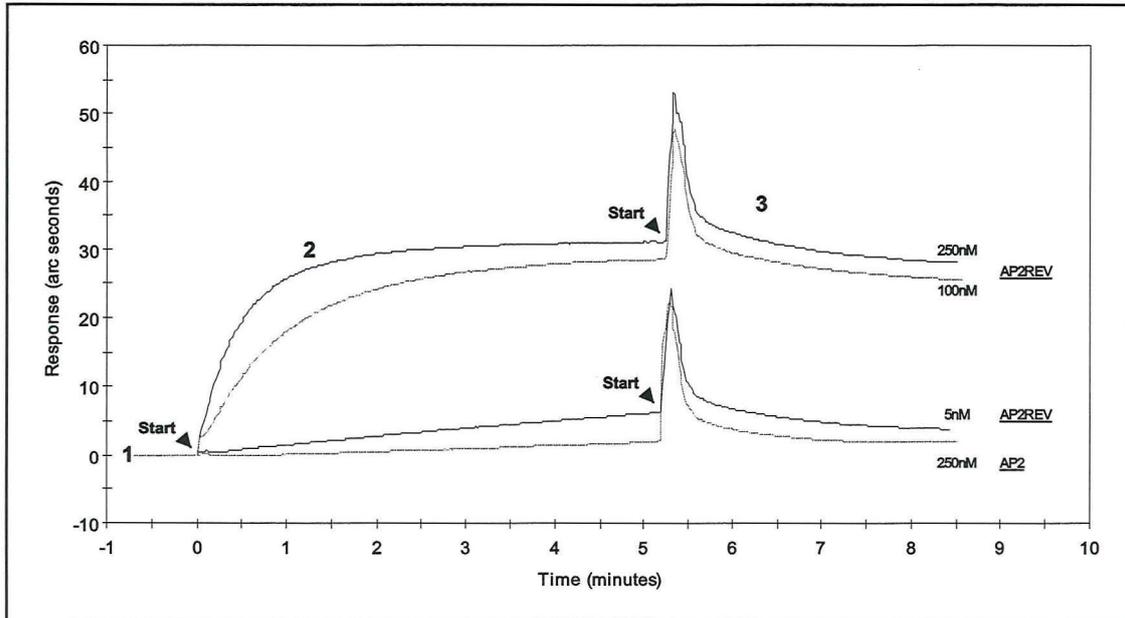


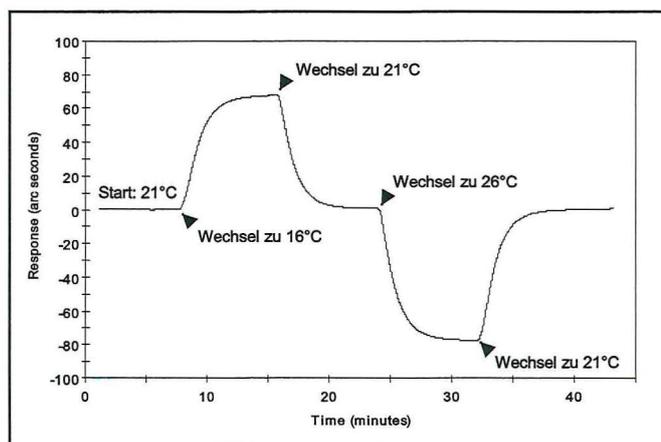
Abb. 25 Verlauf der Bindungsreaktion mit dem Oligonukleotid AP2REV (250nM, 100nM, 5nM) im Vergleich zu der Messung mit der negativen Kontrolle AP2 (250nM)

1 - Basislinie, 2 - Bindung, 3 - Dissoziation, Start ◀ = Beginn der Bindungs- bzw. Dissoziationsphase

Die Hybridisierungsversuche zeigen, dass mit dem IAsys-Biosensor der markierungsfreie Nachweis von relativ kleinen DNA Molekülen und auch deren Quantifizierung über eine Kalibrierkurve möglich ist. Besonders wichtig hierbei ist die Einhaltung konstanter Messbedingungen. Durch die hohe Empfindlichkeit der Sensoroberfläche wirken sich bereits geringfügige Änderungen in der Pufferzusammensetzung oder bei der Temperatur auf das Messsignal aus (Abb.26).

Abb. 26 Signalverhalten bei einem Temperaturwechsel des Messraumes

- eine Erhöhung oder Erniedrigung der Temperatur um 5°C verursacht eine Signaländerung von 67-78arc sec (s. Abbildung)
- eine Erhöhung oder Erniedrigung der Temperatur um 1°C verursacht eine Signaländerung von 10-14arc sec (nicht gezeigt)



Sobald DNA Aptamere für *Penicillium expansum* Sporen bzw. für Streptavidin zur Verfügung stehen, sollen die Reaktionsbedingungen auf die neuen Anforderungen angepasst und ein Bindungsassay zum Nachweis des speziellen Analyten mittels immobilisierter Aptamere aufgebaut werden.

### 3.3.2. Anwendung von Aptameren im IAsys-Affinitätssensor

Ähnlich wie die ssDNA-Sonden zum Nachweis von spezifischen Nukleinsäuremolekülen in einer Probe könnten auch ssDNA Aptamere über das Streptavidin-Biotin-System auf Sensoroberflächen immobilisiert werden (Streptavidin-beschichtete Oberfläche + biotinylierte Aptamere). Im Falle der im vorliegenden Projekt selektierten Streptavidin-MB spezifischen Aptamere ist dies jedoch nicht möglich, da Streptavidin hier das Zielmolekül für die Aptamerbindung darstellt. Aus diesem Grund müssen andere Immobilisierungsmethoden getestet werden. Neben den planaren Biotin-Küvetten stehen von der Firma Thermo Labsystems weitere Probenküvetten mit unterschiedlich funktionalisierten Sensoroberflächen zur Verfügung.

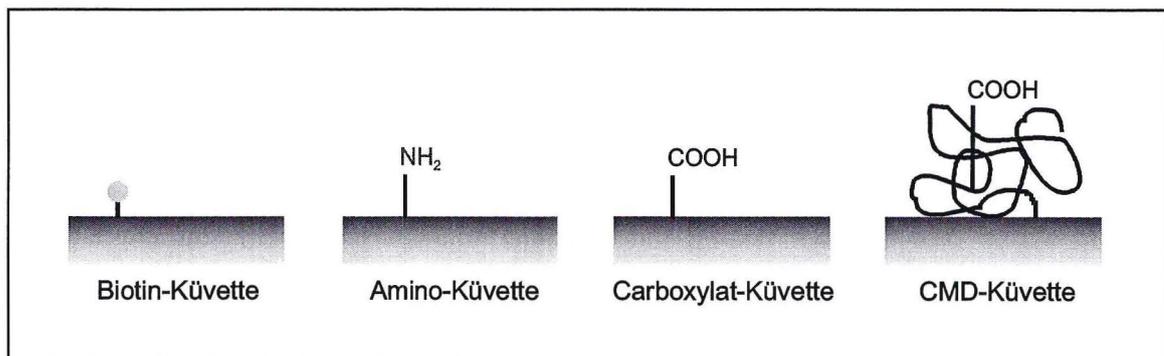


Abb. 27 IAsys Probenküvetten mit unterschiedlich funktionalisierten Sensoroberflächen für die Immobilisierung von Molekülen (CMD = Carboxymethyl-dextran)

Die zu immobilisierende ssDNA muss vorzugsweise am 5'-Ende mit einer Amino-Gruppe oder einer Phosphat-Gruppe modifiziert sein. Zur Blockierung nicht besetzter Kopplungsgruppen auf der Sensoroberfläche kommen BSA,  $\beta$ -Casein, Ethanolamin oder Tris/HCl-Puffer in Frage. Die nachfolgende Tabelle zeigt verschiedene Immobilisierungsstrategien (Thermo Labsystems, Applikation Notes <http://www.affinity-sensors.com/>, [52;53]).

IASys-Probenküvette	5'-Modifikation der ssDNA	Immobilisierungsschemie
Biotin-Küvette	5'-Biotin	- nach Beschichtung der Oberfläche mit Streptavidin können biotinylierte Moleküle immobilisiert werden
Amino-Küvette	5'-Amino (NH <sub>2</sub> )	Einsatz von bi-funktionellen Linkermolekülen - BS <sup>3</sup> - polymerisiertes Glutaraldehyd  Aktivierung der Amino-Oberfläche durch Ausbildung reaktiver NHS-Ester, Imidoester oder Isothiocyanate und anschließende Kopplung der Amino-ssDNA - DSC, DSO - DMS - PDITC
	5'-Phosphat (P)	Immobilisierung in 2 Schritten: - 1. Aktivierung der Amino-Oberfläche mit EDC, 2. Kopplung der phosphorylierten ssDNA unter Ausbildung einer Phosphoamidbindung
Carboxylat-Küvette	5'-Amino (NH <sub>2</sub> )	Immobilisierung der Amino-ssDNA über eine EDC/NHS-vermittelte Aktivierung der Carboxylat-Oberfläche
CMD-Küvette	5'-Amino (NH <sub>2</sub> )	Immobilisierung der Amino-ssDNA über eine EDC/NHS-vermittelte Aktivierung der Carboxylat-Oberfläche

Tab. 13 Immobilisierungsmethoden von ssDNA auf funktionalisierten Sensoroberflächen

Einige der gezeigten Immobilisierungsmethoden mit Amino- bzw. Phosphat-modifizierter Aptamer ssDNA in Amino-Küvetten bzw. Carboxylat-Küvetten wurden in ersten Versuchen getestet, jedoch mit unbefriedigenden Ergebnissen. Eine erfolgreiche Immobilisierung der Aptamere konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden. Außerdem war bis zu diesem Zeitpunkt die Bindungsfähigkeit der Streptavidin-MB spezifischen Aptamere an freies Streptavidin unklar, so dass Bindungsstudien mit den hier selektierten Aptameren im IASys-Biosensor noch nicht durchgeführt werden konnten.

Umfangreiche Untersuchungen zur Immobilisierung von Aptamer ssDNA, unabhängig vom Streptavidin-Biotin-System, sind daher in weiterführenden Arbeiten notwendig. Im Gegensatz dazu soll Streptavidin auf Amino- bzw. Carboxylat-funktionalisierten Sensoroberflächen immobilisiert werden, um die Bindung der Streptavidin-MB spezifischen Aptamere auf diese Weise zu testen.

#### 4. Zusammenfassung

Das Ziel des vorliegenden Projektes war die Etablierung einer gentechnologischen Methode zur Entwicklung von Aptameren und deren Erschließung als neuartige, molekulare Erkennungselemente für Biosensoren. Die hier durchgeführten Arbeiten sollen die methodische Basis für die Entwicklung von spezifischen und hochaffinen DNA Aptameren für umweltrelevante Analyte bilden.

Anhand des Modellanalyten Streptavidin-MB konnte der SELEX-Prozess, eine in vitro Selektions- und Amplifikationsmethode, zur Gewinnung von ssDNA Aptameren mit allen seinen Teilschritten erfolgreich etabliert und angewendet werden. Dies schließt ebenso die Anpassung der SELEX-Parameter an die speziellen Gegebenheiten (Wahl der ssDNA-Oligonukleotid Bibliothek, Zielmolekül) ein. Darüber hinaus handelt es sich um einen fluoreszenzkontrollierten SELEX-Prozess, bei dem mit 5'-Fluorescein-markierter ssDNA ab der 2. Runde gearbeitet wurde. Auf diese Weise konnte durch direkte Fluoreszenzmessung die markierte ssDNA Menge in den einzelnen SELEX-Fractionen einer Runde quantifiziert werden und so eine Anreicherung Streptavidin-MB spezifischer ssDNA im Prozess verfolgt werden. Eine Anwendung radioaktiver Detektionsmethoden konnte somit vermieden werden. Innerhalb von 13 SELEX-Runden wurde ein Streptavidin-MB spezifischer Aptamer-Pool angereichert. Nach der Klonierung der selektierten DNA konnten einzelne StrepAp Klone durch eine Sequenz- und Strukturanalyse bzw. durch einzelne Bindungsstudien charakterisiert werden. Dabei zeigte sich, dass bei diesem SELEX-Prozess eine ausgeprägte Co-Selektion von relevanten, Streptavidin-MB spezifischen Aptameren und unspezifischer ssDNA auftrat. Eine Vielzahl der analysierten Klone war in Einzelexperimenten nicht in der Lage an die Streptavidin-MB zu binden. Erst in Gemischen mit bindenden DNA Molekülen konnten diese Klone ebenfalls an die Beads koppeln. Ein derartiges Phänomen im Zusammenhang mit der Aptamerselektion für nukleinsäurefremde Targets wurde in der Literatur noch nicht beschrieben. Ein aus der RNA Forschung bekannter Mechanismus könnte jedoch für die hier auftretende Co-Selektion verantwortlich sein. Hierbei handelt es sich um die Ausbildung von „kissing loop“ Komplexen, bei denen im Falle der Aptamerselektion sequenzkomplementäre Einzelstrangbereiche aus Stem-Loop-Strukturen zweier Aptamere durch Watson-Crick-Basenpaarung miteinander assoziieren. Andererseits wäre auch eine parallele Selektion von Aptameren spezifisch für den Bindungskomplex aus ssDNA/Streptavidin-MB möglich. Basierend auf den hier gesammelten Erfahrungen mit der Co-Selektion sollen Modifikationen an den SELEX-Parametern (kürzere DNA-Oligonukleotid Bibliothek, stringentere Versuchsbedingungen) vorgenommen werden, um in Zukunft dieses Phänomen zu reduzieren.

Von ursprünglich 50 StrepAp Klonen wurden insgesamt 29 verschiedene Aptamersequenzen ermittelt, von denen wiederum nur 5 Klone (Klon 2, 26, 30, 31 und 33) zur spezifischen

Bindung an Streptavidin-MB befähigt waren. Vier der positiven StrepAp Klone zeigten dabei eine vergleichbare gute Bindungsfähigkeit. Die StrepAp Klone 26, 30, 31 und 33 wurde in verschiedenen Bindungsexperimenten weiter charakterisiert. Unter den angewandten Versuchsbedingungen konnten für die Aptamer-Klone  $K_D$ -Werte zwischen 56,7 - 85,2nM ermittelt werden. Diese Werte liegen etwa im Mittelfeld der angegebenen  $K_D$ -Werte (3-200nM) aus anderen Literaturquellen zu Streptavidin-Aptameren. Biotin als natürlicher Bindungspartner von Streptavidin ( $K_D$ -Wert von  $10^{-15}$ M) ist in der Lage die an Streptavidin-MB gebundenen Aptamere zu verdrängen bzw. die Bindung dieser Aptamere zu blockieren. Anscheinend erfolgt die Bindung der Aptamere an Streptavidin an oder in der Nähe der Biotinbindungsstelle.

Weitere Untersuchungen, z. B. zur Spezifität der selektierten StrepAp Klone sind noch notwendig. Modifizierungen an der Sequenz könnten die für die Bindung relevanten Strukturmerkmale eingrenzen. Ein wichtiger Aspekt ist außerdem der Nachweis der Bindungsfähigkeit der StrepAp Klone an freies Streptavidin. Bisher war dies für die hier selektierten StrepAp Klone nicht eindeutig möglich. Die Bindung der Aptamere an freies Streptavidin bildet jedoch die Voraussetzung für die geplanten Untersuchungen zur Biosensorapplikation von Aptameren anhand des kommerziellen IAsys-Affinitätssensors. Für die markierungsfreie Nachweisreaktion wird hierbei der Analyt in Lösung zugefügt und bindet an die immobilisierten Rezeptormoleküle, z.B. Aptamere. Die Untersuchungen schließen daher Versuche zur Immobilisierung der Aptamere auf Sensoroberflächen, zur Stabilität und Regenerierbarkeit, sowie verschiedene Bindungsstudien ein.

Parallel zu den SELEX-Experimenten wurden dennoch erste Voruntersuchungen am IAsys-Biosensor unter Verwendung des Modellsystems DNA/DNA-Hybridisierung durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass für eine stabile Immobilisierung biotinylierter ssDNA die Anwendung einer Streptavidin-Biotin-Kopplung sehr gut geeignet ist (Nutzung einer Streptavidin-beschichteten Oberfläche zur Anbindung der ssDNA über das eingebaute Biotinmolekül). Auch der anschließende markierungsfreie Nachweis der Hybridisierung zwischen zwei 23nt langen DNA Molekülen brachte gute Ergebnisse, mit der Möglichkeit zur Quantifizierung über eine Kalibrierkurve. Eine mehrmalige Regeneration der Sensoroberfläche als Vorbereitung für eine erneute Hybridisierung kann mit 10mM NaOH (bzw. 5mM HCl) erfolgen. Darüber hinaus ist eine vollständige Regeneration, d. h. das Aufbrechen der Streptavidin-Biotin-Bindung, mit 10M KOH möglich, um andere biotinylierte DNA Moleküle auf derselben Oberfläche zu immobilisieren.

Prinzipiell sind diese Versuchsbedingungen auf die Anwendung von Aptameren im IAsys-Biosensor übertragbar. Für die Immobilisierung der selektierten StrepAp Klone ist die Nutzung der Streptavidin-Biotin-Kopplung jedoch nicht möglich, da Streptavidin in diesem Fall das Zielmolekül für die Aptamere darstellt. Hier müssen andere Methoden für die stabile

Immobilisierung dieser Aptamere auf der Sensoroberfläche getestet werden. Chemisch funktionalisierte Oberflächen mit NH<sub>2</sub>-Gruppen oder COOH-Gruppen kommen in Frage, konnten jedoch aus Zeitmangel im Rahmen dieses Projektes noch nicht ausführlich getestet werden.

Neben der Gewinnung Streptavidin-MB spezifischer Aptamere wurden die etablierten SELEX-Bedingungen auch in SELEX-Experimenten mit Sporen des Schimmelpilzes *P. expansum* als umweltrelevantes Zielmolekül angewendet. Bisher konnten jedoch keine sporenspezifischen Aptamere angereichert werden. Ursachen hierfür könnten im speziellen Aufbau der Sporen, insbesondere infolge ihrer Funktion als Überdauerungsorgane, liegen, wodurch sie gegen jeglichen Angriff bzw. Bindung geschützt sind. Sporen besitzen eine komplexe Oberfläche, wobei Art und Anzahl möglicher Bindungsstellen für Aptamere unbekannt ist. Im Gegensatz zum Einsatz intakter Sporen wurden zwei abgewandelte Strategien für die Aptamerselektion entwickelt, die im Rahmen einer Promotionsarbeit am UFZ weiterverfolgt werden. Hierbei sollen einerseits gequollene Sporen als Zielmoleküle eingesetzt werden, bei denen die Sporenwand aufgebrochen ist und dadurch innere Strukturen der Sporenwände zugänglich werden. Andererseits sollen definierte Sporenwandbestandteile, z. B. Zuckerstrukturen ( $\beta(1\rightarrow3)$ -Glucan) als Zielmoleküle verwendet werden.

Während der Projektlaufzeit wurden die Ziele, sowie die Ergebnisse der durchgeführten Arbeiten auf verschiedenen Tagungen in Form von Postern bzw. eines Vortrages vorgestellt.

KIRSTEN, H., STOLTENBURG, R., Strehlitz, B.: *In vitro* Selektion von DNA-Molekülen für Schimmelpilz-Biosensoren.  
Poster zum 2. Biosensor - Symposium, 1.4. - 3.4.2001; Tübingen

KIRSTEN, H., STOLTENBURG, R., Strehlitz, B.: *In vitro* selection of DNA molecules that bind fungal spores.  
Poster zum 52. Mosbacher Kolloquium, 4.4. - 7.4.2001; Mosbach

STOLTENBURG, R., Strehlitz, B.: Streptavidin-Aptamere als Modellsystem für die Entwicklung neuer Biosensoren.  
Vortrag zum 3. Biosensor - Symposium, 30.3. - 1.4.2003; Potsdam

STOLTENBURG, R., Strehlitz, B.: Streptavidin-Aptamere als Modellsystem für die Entwicklung neuer Biosensoren.  
Poster zum 2. Biotechnologie-Tag 2003, 21.5.2003; Leipzig

Darüber hinaus ist die Publikation der erzielten Ergebnisse vorgesehen.

Die Durchführung dieses Projektes hat die Etablierung der neuen gentechnologischen Methode zur Selektion von targetspezifischen Aptameren am UFZ, in der Arbeitsgruppe

Angewandte Biosensorik ermöglicht. Dadurch konnten Grundlagen für die Entwicklung neuer, auf Nukleinsäure-Strukturen basierender Rezeptoren für Biosensoren erarbeitet werden. Unter Anwendung der hier erhaltenen Ergebnisse wird an der Entwicklung neuer Biosensoren für die Umweltanalytik gearbeitet (im Rahmen einer Promotionsarbeit werden die Ergebnisse bereits genutzt). Dadurch sollen umweltrelevante Analyte einer Biosensormessung zugänglich gemacht werden, die unter Anwendung herkömmlicher Rezeptoren nicht erfassbar sind (z.B. toxische oder nichtimmunogene Substanzen). Diese neue Entwicklungsrichtung innerhalb der Arbeitsgruppe entspricht modernsten, internationalen Trends auf dem Gebiet der Biosensorik.

## 5. Literaturverzeichnis

- [1] Tuerk,C. & Gold,L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, **249**, 505-510.
- [2] Blank,M., Weinschenk,T., Priemer,M., & Schluesener,H. (2001) Systematic evolution of a DNA aptamer binding to rat brain tumor microvessels. selective targeting of endothelial regulatory protein p19. *J. Biol. Chem.*, **276**, 16464-16468.
- [3] Bock,L.C., Griffin,L.C., Latham,J.A., Vermaas,E.H., & Toole,J.J. (1992) Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature*, **355**, 564-566.
- [4] Bruno,J.G. & Kiel,J.L. (1999) In vitro selection of DNA aptamers to anthrax spores with electrochemiluminescence detection. *Biosens. Bioelectron.*, **14**, 457-464.
- [5] Famulok,M. & Mayer,G. (1999) Aptamers as tools in molecular biology and immunology. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **243**, 123-136.
- [6] Fukusaki,E., Kato,T., Maeda,H., Kawazoe,N., Ito,Y., Okazawa,A., Kajiyama,S., & Kobayashi,A. (2000) DNA aptamers that bind to chitin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **10**, 423-425.
- [7] Geiger,A., Burgstaller,P., von der Eltz,H., Roeder,A., & Famulok,M. (1996) RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 1029-1036.
- [8] Hicke,B.J., Marion,C., Chang,Y.F., Gould,T., Lynott,C.K., Parma,D., Schmidt,P.G., & Warren,S. (2001) Tenascin-C Aptamers Are Generated Using Tumor Cells and Purified Protein. *J. Biol. Chem.*, **276**, 48644-48654.
- [9] Homann,M. & Goringe,H.U. (1999) Combinatorial selection of high affinity RNA ligands to live African trypanosomes. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 2006-2014.
- [10] Huizenga,D.E. & Szostak,J.W. (1995) A DNA aptamer that binds adenosine and ATP. *Biochemistry*, **34**, 656-665.

- [11] Jayasena,S.D. (1999) Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin. Chem.*, **45**, 1628-1650.
- [12] Kwon,M., Chun,S.M., Jeong,S., & Yu,J. (2001) In vitro selection of RNA against kanamycin B. *Mol. Cells*, **11**, 303-311.
- [13] Morris,K.N., Jensen,K.B., Julin,C.M., Weil,M., & Gold,L. (1998) High affinity ligands from in vitro selection: complex targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2902-2907.
- [14] Pan,W., Craven,R.C., Qiu,Q., Wilson,C.B., Wills,J.W., Golovine,S., & Wang,J.F. (1995) Isolation of virus-neutralizing RNAs from a large pool of random sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 11509-11513.
- [15] Wallace,S.T. & Schroeder,R. (1998) In vitro selection and characterization of streptomycin-binding RNAs: recognition discrimination between antibiotics. *RNA.*, **4**, 112-123.
- [16] Yang,Q., Goldstein,I.J., Mei,H.Y., & Engelke,D.R. (1998) DNA ligands that bind tightly and selectively to cellobiose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 5462-5467.
- [17] Sun,S. (2000) Technology evaluation: SELEX, Gilead Sciences Inc. *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **2**, 100-105.
- [18] Clark,S.L. & Remcho,V.T. (2002) Aptamers as analytical reagents. *Electrophoresis*, **23**, 1335-1340.
- [19] Deng,Q., German,I., Buchanan,D., & Kennedy,R.T. (2001) Retention and separation of adenosine and analogues by affinity chromatography with an aptamer stationary phase. *Anal. Chem.*, **73**, 5415-5421.
- [20] German,I., Buchanan,D.D., & Kennedy,R.T. (1998) Aptamers as ligands in affinity probe capillary electrophoresis. *Anal. Chem.*, **70**, 4540-4545.
- [21] Kotia,R.B., Li,L., & McGown,L.B. (2000) Separation of nontarget compounds by DNA aptamers. *Anal. Chem.*, **72**, 827-831.
- [22] O'Sullivan,C.K. (2002) Aptasensors--the future of biosensing? *Anal. Bioanal. Chem.*, **372**, 44-48.
- [23] Kleinjung,F., Klussmann,S., Erdmann,V.A., Scheller,F.W., Fürste,J.P., & Bier,F.F. (1998) High-affinity RNA as a recognition element in a biosensor. *Anal. Chem.*, **70**, 328-331.
- [24] Lee,M. & Walt,D.R. (2000) A fiber-optic microarray biosensor using aptamers as receptors. *Anal Biochem.*, **282**, 142-146.
- [25] Potyrailo,R.A., Conrad,R.C., Ellington,A.D., & Hieftje,G.M. (1998) Adapting selected nucleic acid ligands (aptamers) to biosensors. *Anal. Chem.*, **70**, 3419-3425.
- [26] Liss,M., Petersen,B., Wolf,H., & Prohaska,E. (2002) An aptamer-based quartz crystal protein biosensor. *Analytical Chemistry*, **74**, 4488-4495.
- [27] Soukup,G.A. & Breaker,R.R. (2000) Allosteric nucleic acid catalysts. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **10**, 318-325.
- [28] Rajendran,M. & Ellington,A.D. (2002) Selecting nucleic acids for biosensor applications. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, **5**, 263-270.

- [29] Lu, Y. (2002) New transition-metal-dependent DNazymes as efficient endonucleases and as selective metal biosensors. *Chemistry*, **8**, 4589-4596.
- [30] Sondergutachten des Rates von Sachverständigen für Umweltfragen (1999) Umwelt und Gesundheit. Risiken richtig einschätzen. *Deutscher Bundestag, 14. Wahlperiode, Drucksache 14/2300*, 107-154.
- [31] Gaillard, C. & Strauss, F. (1990) Ethanol precipitation of DNA with linear polyacrylamide as carrier. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 378.
- [32] Sambrook, J. & Russel, D.W. (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual. (Third Edition)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [33] Gassen, G.H. & Schrimpf, G. (1999) *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. Spektrum Akademischer Verlag, Gustav Fischer.
- [34] Hassur, S.M. & Whitlock, H.W., Jr. (1974) UV shadowing--a new and convenient method for the location of ultraviolet-absorbing species in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **59**, 162-164.
- [35] Ellington, A.D. & Szostak, J.W. (1990) In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, **346**, 818-822.
- [36] Crameri A, S.W.P. (1993) 10(20)-fold aptamer library amplification without gel purification. *Nucleic Acids Res* 1993, **21**, 4410.
- [37] Williams, K.P. & Bartel, D.P. (1995) PCR product with strands of unequal length. *Nucleic Acids Res*, **23**, 4220-4221.
- [38] Silveira, M.H. & Orgel, L.E. (1995) PCR with detachable primers. *Nucleic Acids Res*, **23**, 1083-1084.
- [39] Hausch, F. & Jaschke, A. (2000) Multifunctional DNA conjugates for the in vitro selection of new catalysts. *Nucleic Acids Res*, **28**, E35.
- [40] Müller, H.J. (2001) *PCR - Polymerase-Kettenreaktion*. Spektrum Akademischer Verlag, Gustav Fischer.
- [41] SantaLucia, J., Jr. (1998) A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 1460-1465.
- [42] Buckle, P.E., Davies, R.J., Kinning, T., Yeung, D., Edwards, P.R., Pollard-Knight, D., & Lowe, C.R. (1993) The resonant mirror: a novel optical sensor for direct sensing of biomolecular interactions; Part II: Applications. *Biosensors and Bioelectronics*, **8**, 355-363.
- [43] Cush, R., Cronin, J.M., Stewart, W.J., Maule, C.H., Molloy, J., & Goddard, N.J. (1993) The resonant mirror: a novel optical biosensor for direct sensing of biomolecular interactions; Part I: Principle of operation and associated instrumentation. *Biosensors and Bioelectronics*, **8**, 347-353.
- [44] Fuhrmann, B., Lebreton, V., Van Hoegaerden, M., Kamphuis, H.J., & Strosberg, A.D. (1992) A monoclonal antibody specific for conidia and mycelium wall layer of *Penicillium* and *Aspergillus*. *Microbiol. Immunol.*, **36**, 1-12.

- [45] Douwes,J., Doekes,G., Montijn,R., Heederik,D., & Brunekreef,B. (1996) Measurement of beta(1-->3)-glucans in occupational and home environments with an inhibition enzyme immunoassay. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 3176-3182.
- [46] Douwes,J., van der,S.B., Doekes,G., van Leusden,F., Wijnands,L., van Strien,R., Verhoeff,A., & Brunekreef,B. (1999) Fungal extracellular polysaccharides in house dust as a marker for exposure to fungi: relations with culturable fungi, reported home dampness, and respiratory symptoms. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **103**, 494-500.
- [47] Fontaine,T., Simenel,C., Dubreucq,G., Adam,O., Delepierre,M., Lemoine,J., Vorgias,C.E., Diaquin,M., & Latge,J.P. (2000) Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. *J. Biol. Chem.*, **275**, 27594-27607.
- [48] Kamphuis,H.J., De Ruiter,G.A., Veeneman,G.H., van Boom,J.H., Rombouts,F.M., & Notermans,S.H. (1992) Detection of *Aspergillus* and *Penicillium* extracellular polysaccharides (EPS) by ELISA: using antibodies raised against acid hydrolysed EPS. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **61**, 323-332.
- [49] Srisawat,C. & Engelke,D.R. (2002) RNA affinity tags for purification of RNAs and ribonucleoprotein complexes. *Methods*, **26**, 156-161.
- [50] Tahiri-Alaoui,A., Frigotto,L., Manville,N., Ibrahim,J., Romby,P., & James,W. (2002) High affinity nucleic acid aptamers for streptavidin incorporated into bi-specific capture ligands. *Nucleic Acids Res*, **30**, e45.
- [51] Bittker,J.A., Le,B.V., & Liu,D.R. (2002) Nucleic acid evolution and minimization by nonhomologous random recombination. *Nature Biotechnology*, **20**, 1024-1029.
- [52] Beier,M. & Hoheisel,J.D. (1999) Versatile derivatisation of solid support media for covalent bonding on DNA-microchips. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 1970.
- [53] Walsh,M.K., Wang,X., & Weimer,B.C. (2001) Optimizing the immobilization of single-stranded DNA onto glass beads. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **47**, 221-231.