

Aptamere als Biorezeptoren zur Detektion kleiner Moleküle in Flüssigkeiten und der Gasphase

1. Einleitung und Aufgabenstellung

Die Detektion kleiner Moleküle, wie Metabolite oder Stoffwechselprodukte, ist vor allem für bioanalytische und diagnostische Anwendungen von Bedeutung. Zur Detektion solcher Moleküle können neben Antikörpern auch Aptamere eingesetzt werden. Die Einsetzbarkeit von Antikörpern ist jedoch begrenzt, da Antikörper gegen diese kleinen Moleküle nur eine geringe Affinität aufweisen und zudem nicht ohne Weiteres für jedes Molekül erhältlich sind. Aptamere hingegen sind in der Lage, auch kleine, nicht-immunogene oder toxische Moleküle spezifisch zu binden. Im Vergleich zu Antikörpern weisen Aptamere oft eine höhere strukturelle Stabilität auf und ermöglichen eine Bindung des Zielmoleküls auch unter nicht-physiologischen Bedingungen. Ein weiterer Vorteil von Aptameren ist das gezielte Design von Sensorstrategien, welche auf diese Weise mit Antikörpern nicht zu realisieren sind.

Diese Eigenschaften von Aptameren sollten in diesem Projekt für die Entwicklung von Aptamer-basierten Biosensoren zur Detektion kleiner Moleküle Anwendung finden. Die Aptamer-basierten Detektionsmethoden sollten den Nachweis kleiner Moleküle auch unter Bedingungen ermöglichen, unter denen Antikörper nicht verwendet werden können. Neben der Detektion des Zielmoleküls unter nicht-physiologischen Bedingungen in Flüssigkeiten, sollte erstmalig eine Aptamer-basierte Detektionsmethode zum Nachweis flüchtiger Substanzen in der Gasphase entwickelt werden. Als Modellaptamer wurde ein Aptamer gegen Ethanolamin verwendet, da Ethanolamin bislang das kleinste Molekül darstellt, gegen das ein Aptamer selektiert wurde.

2. Ergebnisse und Diskussion

Die Entwicklung des Aptamer-basierten Biosensors sollte im Microarray-Format erfolgen. Hierzu wurde zunächst die Immobilisierung und Faltung des Ethanolaminaptamers untersucht. Unter Verwendung der optimierten Immobilisierungsschemie wurde ein Aptamer-basierter Microarray zur Detektion von Ethanolamin in der Flüssigphase entwickelt, der auf dem Prinzip der Verdrängung komplementärer Oligonukleotide beruht. Für die Detektion von Ethanolamin in der Gasphase wurde ein QCM-Sensor entwickelt, der die Detektion von Ethanolamin über eine Veränderung des Schwingverhaltens durch Bindung von Ethanolamin an das Aptamer ermöglicht.

2.1. Untersuchung verkürzter Aptamervarianten

Neben dem *full length*-Aptamer (96 nt) gegen Ethanolamin wurde ebenfalls Aptamerverkürzungen hinsichtlich ihrer Affinität gegenüber dem Target untersucht. Die verkürzten Aptamersequenzen wurden durch die Arbeitsgruppe von Frau Dr. Beate Strehlitz vom Helmholtz Zentrum für Umweltforschung (UFZ) zur Verfügung gestellt und charakterisiert. Es wurden eine im 3'-Bereich

gekürzte Aptamersequenz (42 nt) sowie eine auf die Target-Bindungsregion reduzierte Aptamersequenz (16 nt) auf ihre Dissoziationskonstanten K_D untersucht. In Lösung durchgeführte Bindungsstudien zeigten, dass die ungekürzte Sequenz des Aptamers eine besonders hohe Affinität gegenüber dem Target Ethanolamin aufweist (Tab. 1).

Die Faltung dieser ungekürzten Sequenz wurde daher für die weitere Anwendung im Detektionsassay eingehender untersucht. Um eine effiziente Faltung der Aptamersequenz nach Immobilisierung auf Microarray-Oberflächen zu gewährleisten, wurden Oberflächen mit unterschiedlich langen Spacern getestet.

Untersucht wurden eine Oberfläche mit einem kurzkettingen linearen Spacer (Arrayit Corporation) sowie eine Oberfläche mit einem langkettingen, dreidimensional verzweigten Spacer (PolyAn GmbH). Die Aptamerfaltung auf den unterschiedlichen Microarray-Oberflächen wurde indirekt über die Bindung von Quantum Dot-markiertem Ethanolamin nachgewiesen. Hierbei konnte eine erhöhte Targetbindung auf Oberflächen mit langkettingem Spacern beobachtet werden (Abb. 1). Diese wurden somit für die weitere Entwicklung des Microarray-basierten Biosensors verwendet.

Tab. 1: Untersuchung verkürzter Aptamersequenzen hinsichtlich ihrer Affinität.

Sequenzbeschreibung	Länge [nt]	Dissoziationskonstante K_D [nmol]
Full length	96	6 ± 3 ¹
5'-Bereich inkl. Target-Bindungsregion	42	$9,6 \pm 1,4$
Target-Bindungsregion	16	$111,9 \pm 19,9$

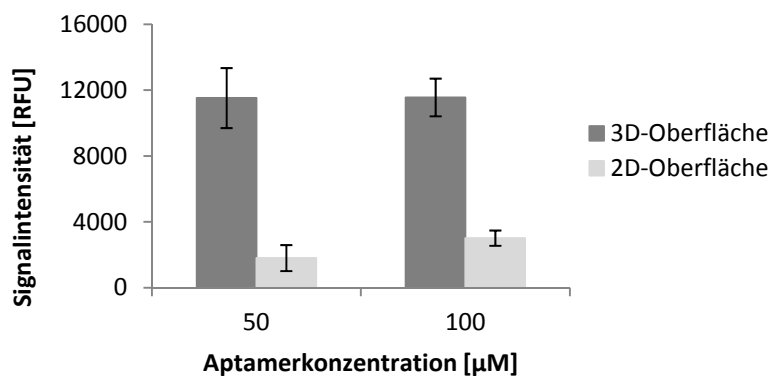


Abb. 1: Bindung von Quantum Dot-markiertem Ethanolamin nach Aptamer-Immobilisierung auf 2D- und 3D-modifizierten Microarray-Oberflächen.

2.2. Detektion von Ethanolamin in der Flüssigphase

Unter Verwendung der optimierten Immobilisierungsschemie wurde ein Aptamer-basierter Microarray zur Detektion von Ethanolamin in der Flüssigphase entwickelt. Der Detektionsassay beruht auf der Bindung kurzer Oligonukleotide, die eine komplementäre Sequenz zur Targetbindungsstelle des

¹ D. Mann, C. Reinemann, R. Stoltenburg, B. Strehlitz. In vitro selection of DNA aptamers binding ethanolamine. Biochem. Biophys. Res. Comm. 338 (2005), 1928-34.

Aptamers aufweisen. Bei der ersten Entwicklung des Microarrays wurden die Oligonukleotide dabei mit einem Quencher (BHQ2) und das Aptamer mit einem Fluorophor (Cy3) versehen. Die Bindung des Targets Ethanolamin an das Aptamer führt zur Verdrängung der Quencher-modifizierten Oligonukleotide und somit zum Anstieg des Fluoreszenzsignals (Abb. 2A).

Zusätzliche Modifikationen an der Aptamersequenz beeinflussen jedoch oftmals die Faltung des Aptamers und somit die Targetbindung. Aus diesem Grund wurde der Detektionsassay ebenfalls mit unmodifizierten Aptamern durchgeführt. Für die Entwicklung dieses weiteren Detektionsprinzips wurden nur die Oligonukleotide mit einem Fluorophor versehen. Die Bindung des Targets Ethanolamin an das Aptamer führt bei diesem Assay zur Verdrängung der Fluorophor-modifizierten Oligonukleotide und somit zu einer Abnahme des Fluoreszenzsignals (Abb. 2B).

Beim Vergleich dieser beiden Detektionsprinzipien konnte gezeigt werden, dass eine ~ 10 % höhere Signaländerung mit der Verwendung unmodifizierter Aptamere erzielt werden konnte. Somit wurde für diesen Detektionsassay der Einfluss weiterer Parameter (Oligonukleotidlänge, Aptamerkonzentration) genauer untersucht. Hierzu wurden unterschiedliche Oligonukleotide mit einer Länge von 16 nt, 12 nt bzw. 10 nt verwendet (Abb. 3).

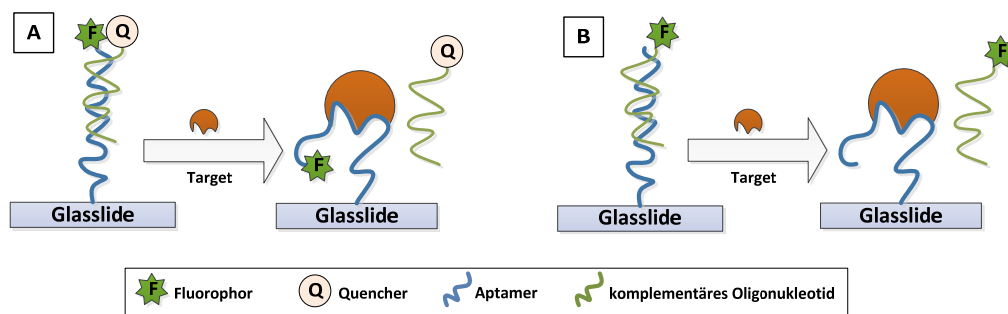


Abb. 2: Microarraydesign zur Aptamer-basierten Detektion von Ethanolamin in der Flüssigphase. (A) Das Aptamer wurde mit dem Fluorophor Cy3 modifiziert, das komplementäre Oligonukleotid mit einem BHQ2-Quencher. Das Target Ethanolamin führt zu einer verringerten Bindung des Oligonukleotids und somit zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals. (B) Das Oligonukleotid wurde mit einem Cy3-Fluorophor modifiziert. Die Anwesenheit des Targets Ethanolamin führt zu einer verringerten Bindung des Oligonukleotids und somit zu einer Verringerung des Fluoreszenzsignals.

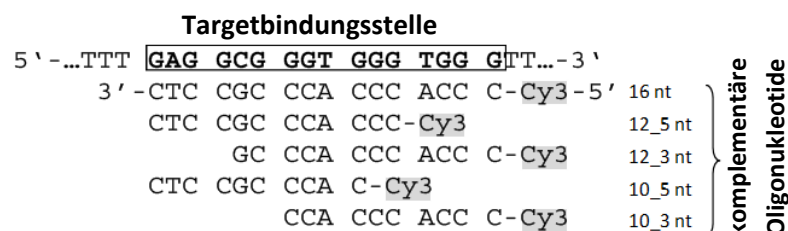


Abb. 3: Sequenzen der untersuchten komplementären Oligonukleotide. Die Oligonukleotide wurden am 5'-Terminus mit Cy3 modifiziert. Das Oligonukleotid 16 nt weist eine komplementäre Sequenz zur vollständigen Targetbindungsstelle des Aptamers auf. Die Oligonukleotide 12_5 nt und 10_5 nt wurden am 5'-Terminus, die Oligonukleotide 12_3 nt und 10_3 nt am 3'-Terminus gekürzt.

Je kürzer das Oligonukleotid, desto stärker konnte seine Hybridisierung an das Aptamer durch das Target Ethanolamin reduziert werden. Somit weist der Detektionsassay unter Verwendung der kürzesten untersuchten Oligonukleotidsequenzen (10 nt) die größte Signaländerung auf. Es konnte eine Reduktion der Fluoreszenzintensität von 70 % gemessen werden. Zudem wurde eine optimale Detektion von Ethanolamin bei Aptamerkonzentrationen zwischen 1-5 μM erzielt (Abb. 4). Unter Verwendung der optimalen Detektionsparameter konnten Ethanolaminkonzentrationen im pikomolaren Bereich gemessen werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefasst, eine entsprechende Publikation wurde eingereicht.

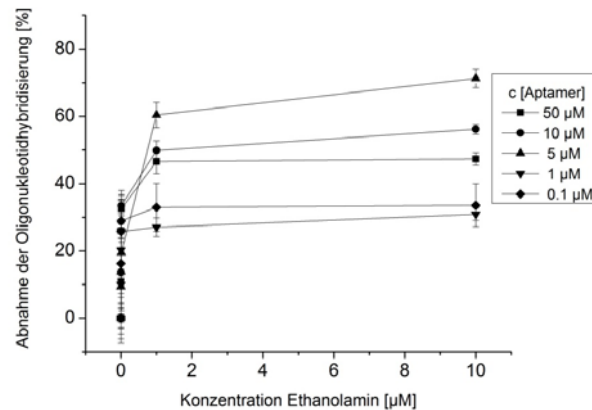


Abb. 4: Abnahme der Hybridisierung des Oligonukleotids 10_5 nt an das Aptamer bei Verwendung unterschiedlicher Aptamerkonzentrationen im Detektionsassay.

Tab. 2: Maximale Abnahme der Oligonukleotid-Hybridisierung an das Aptamer und Limit of Detection für unterschiedlich lange Oligonukleotide.

Oligonukleotid	Max. Abnahme der Hybridisierung [%]	Aptamerkonzentration bei max. Abnahme der Hybridisierung [μM]	Limit of detection [pM]
10_5 nt	70.34 ± 1.22	5	11.27
10_3 nt	71.58 ± 1.28	1	10.32
12_5 nt	60.03 ± 2.17	5	12.00
12_3 nt	62.26 ± 3.91	1	12.89
16 nt	48.90 ± 5.47	1	15.10

2.3. Detektion von Ethanolamin in der Gasphase

Für die Detektion von Ethanolamin in der Gasphase wurde ein Aptamer-basierter QCM- (*Quartz crystal microbalance*) Sensor entwickelt. Die Entwicklung dieses Sensors wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr.-Ing. Stefan Zimmermann vom Institut für Grundlagen der Elektrotechnik und Messtechnik der Leibniz Universität Hannover durchgeführt. Das Prinzip eines QCM-Sensors beruht auf der spannungsinduzierten Verformung eines Quarzes. Auf der Quarzoberfläche wird das Aptamer immobilisiert und kleine Massenänderungen, wie z. B. durch eine Targetbindung am Aptamer, können durch eine Veränderung des Schwingverhaltens detektiert werden.

Die Aptamere wurden hierzu über einen Thiol-Linker auf der goldbeschichteten Quarzoberfläche immobilisiert. Zunächst wurde der Einfluss des Feuchtegehalts im zu analysierenden Gasstrom auf das

Schwingverhalten der Aptamere untersucht. Hiermit sollte ausgeschlossen werden, dass ein zu hoher Wassergehalt im Gasstrom die Schwingfrequenz der Aptamere dämpft. Es konnte ermittelt werden, dass ein Feuchtegehalt von bis zu 10 % keinen deutlichen Einfluss auf die Schwingfrequenz der Aptamer-modifizierten Quarze aufweist. Für die weitere Entwicklung des QCM-Sensors wurde somit ein auf 10 % getrockneter Luftstrom verwendet und mit Ethanolamin angereichert.

Bei den ersten Versuchsdurchführungen zeigte der Aptamer-beschichtete Sensor beim Überströmen mit gasförmigem Ethanolamin einen deutlichen Anstieg in der Schwingfrequenz (Abb. 5). Dieser Anstieg wurde für den Sensor, der mit einem Oligonukleotid (ohne Affinität zu Ethanolamin) modifiziert war, nicht beobachtet. Diese Unterschiede in der Frequenzänderung waren ein erster Hinweis auf die Bindung des Targets an das Aptamer. Allerdings verliefen die Änderungen der Signale anders als zum Zeitpunkt der Antragstellung vermutet. So konnten für das Aptamer zwar Änderungen der Schwingfrequenz nach Ethanolaminzugabe beobachtet werden, allerdings war die Erhöhung der Schwingfrequenz nur temporär und es folgte ein rascher Abfall der Schwingfrequenz. Für dieses Verhalten des Aptamer-modifizierten Sensors kommen prinzipiell verschiedene Ursachen in Frage. Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens ist, dass sich hier verschiedene Effekte überlagern. Zum einen findet durch die Bindung von Ethanolamin eine Erhöhung der Masse statt, zum anderen kann sich durch die Bindung von Ethanolamin auch die Elastizität des Aptamers verändern und somit Einfluss auf das Schwingverhalten ausüben. Hier ist es zum einen wahrscheinlich, dass das Aptamer nach Bindung des Ethanolamins kompakter und somit unflexibler wird. Zum Anderen kann die G-Quadruplex, die das Targetbindungsmotiv des verwendeten Aptamers darstellt und bereits in Abwesenheit von Ethanolamin eine stabile Struktur einnimmt, sich während der Bindung von Ethanolamin teilweise öffnen, um das Ethanolamin aufzunehmen. Eine solche temporäre Umstrukturierung des Aptamers würde zu einer höheren Flexibilität des Aptamers führen und somit ebenfalls die Schwingfrequenz des QCM-Sensors beeinflussen.

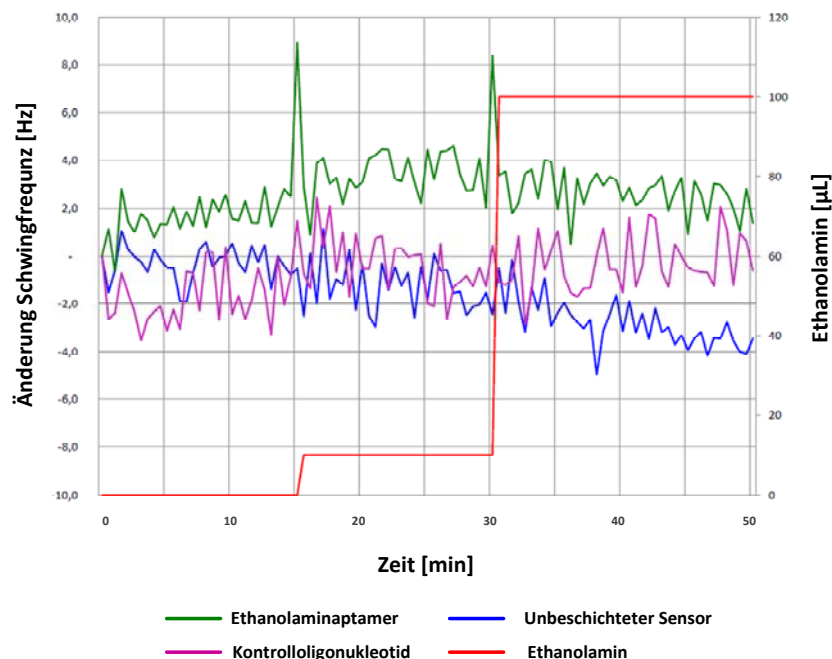


Abb. 5: Aptamer-beschichteter QCM-Sensor zur Detektion von Ethanolamin in der Gasphase. Über die Änderung der Schwingfrequenz der Aptamere kann die Masseänderung bestimmt werden.

3. Zusammenfassung und Ausblick

Unter Verwendung eines Aptamer-basierten Microarrays konnte eine Detektionsmethode zum Nachweis des kleinen Moleküls Ethanolamin in der Flüssigphase entwickelt werden. Die Verdrängung fluoreszenzmarkierter Oligonukleotide ermöglichte eine sensitive Detektion von Ethanolamin mit einem Detektionslimit im pikomolaren Bereich. Der Nachweis von Ethanolamin in der Gasphase wurde unter Verwendung eines QCM-Sensors in ersten Experimenten ebenfalls durchgeführt. Hier konnten durch Bindung von Ethanolamin an den Aptamer-modifizierten Sensor Signale erhalten werden. Allerdings fielen diese Signale anders aus, als zum Zeitpunkt der Antragstellung erwartet wurde. Hier müssen weitere Untersuchungen erfolgen, um die auf der Sensoroberfläche stattfindenden Prozesse zu verstehen und den Sensor somit zielgerichtet optimieren zu können.

Die innerhalb des Projektes entwickelten Detektionsmethoden bieten eine vielversprechende Möglichkeit zur markierungsfreien Detektion kleiner Targets. Auf Basis der mit dem Modellaptamer gegen Ethanolamin entwickelten Sensoren ist eine Detektion weiterer kleiner Moleküle denkbar. Diese könnten zukünftig zu einem Multiplex-Sensorsystem zusammengefasst werden.

4. Veröffentlichungen

Publikation

A. Heilkenbrinker, C. Reinemann, R. Stoltenburg, A. Jochums, J.-G. Walter, F. Stahl, S. Zimmermann, B. Strehnitz, T. Scheper. *Identification of the target binding site of ethanolamine binding aptamers and its exploitation for ethanolamine detection*. Eingereicht bei Analytical Chemistry (2014).

Kongressbeiträge

A. Heilkenbrinker. *Aptamer-based detection of small molecules*. Vortrag auf den 5th Potsdam Days on Bioanalysis, Potsdam (2013).