

2. BIOSENSOR SYMPOSIUM

TÜBINGEN 2001

<http://barolo.ipc.uni-tuebingen.de/biosensor2001>

DNA-Aptamere als eine neuartige biologisch aktive Komponente in

Biosensoren

Michael Blank, Hermann Schlüsener

Institut für Hirnforschung, Calwerstr. 3, D-72076 Tuebingen

Tel. 07071-29 80168

hirnforschung@uni-tuebingen.de

Registriernummer der Online-Anmeldung: 284

Poster

Die Erkennung von Molekülen mittels selektiver Bindung von Enzymen, Antikörpern oder selektiver Chelatoren ist die Grundlage zur Entwicklung von Biosensoren. Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment⁽¹⁾ (SELEX) ist eine kombinatorisch chemische Methode, welche die Eigenschaft von einzelsträngigen Nukleinsäuren (RNA, ssDNA) nutzt zu stabilen 3-dim. Strukturen zu falten und somit – in Analogie zu Antikörpern (Abs)– eine selektive und hochaffine Bindung von Zielmolekülen ermöglicht. Der Einsatz von Oligonukleotidliganden (Aptamere) als biologisch aktiver Teil von Biosensoren bietet gegenüber Abs eine Reihe potentieller Vorteile. Aptamere können mit hoher Genauigkeit und Reproduzierbarkeit durch automatisierte Prozesse synthetisiert werden und ermöglichen eine relativ einfache, kovalente Bindung von Reportermolekülen und/oder Transducern an definierten Stellen. Immobilisierte Aptamere können recycled werden und gegen jegliche Art von Zielmolekülen gerichtet sein (auch gegen toxische oder nicht immunogene Proteine oder kleine organische Moleküle)⁽²⁾.

Als Modellsystem haben wir eine auf Fluoreszenzdetektion (Durchflußzytometrie, Fluoreszenzmikroskopie) basierende Selektionsmethode von endothelzellbindenden ssDNA-Aptameren entwickelt und zeigen daß fluoreszenzkonjugierte Aptamere in Analogie zu Antikörpern als diagnostische Werkzeuge zur Targetidentifizierung genutzt werden können, somit ideale Voraussetzungen bieten als biologisch aktiver Teil in Mikrobiosensoren Verwendung zu finden.

Neoangiogenese, die Entstehung neuer Blutgefäße ist ein Schlüsselmerkmal des Wachstums solider Tumoren. Struktur und Metabolismus von pathologischen Mikrogefäßen des Tumors unterscheiden sich von normaler Vaskulatur durch quantitative und qualitative Veränderungen in der Expression von endothelialen Oberflächenproteinen. Es ist daher anzunehmen, daß viele endothelialen Proteine, die mit dem pathologischen Verhalten von Endothelzellen (wie der übermäßigen Proliferation in Tumoren) assoziiert sind als potentielle Zielmoleküle zur Tumor Homing-Therapie und Diagnostik in Betracht kommen^(3, 4).

Die präsentierte SELEX Methode ermöglichte gegen pathologisch exprimierte Endothelzellproteine gerichtete ssDNA Aptamere zu entwickeln. Dazu wurden die für kombinatorische Verfahren charakteristischen reiterativen Zyklen der Selektion mit fluoreszenzkontrollierten Detektionsmethoden kombiniert und ssDNA-Aptamere gegen intakte, transformierte Endothelzellen (YPEN-1) als komplexe Targets selektiert. Sowohl die Anreicherung bindender DNA-Aptamere in den Bibliotheken der fortschreitenden Selektionsrunden, als auch die Evaluierung der Endothelzell-Affinität individueller Aptamere wurden durchflußcytometrisch analysiert. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung Aptamer-gefärbter Rattenhirn-Glioblastom-Gewebeschnitte ermöglichte die Beurteilung der Selektivität individueller fluoreszenzkonjugierter Aptamere gegen pathologische Mikrogefäße des Tumors. Somit die Identifizierung von Aptameren, welche ausschließlich die komplexe Architektur der pathologischen Mikrogefäße färbten, nicht aber die Vaskulatur von Normalhirn, einschließlich der Tumor Randbereiche. Exemplarisch für einen derart selektiv bindenden Liganden wurde Aptamer III.1 näher charakterisiert und sein endotheliales Zielmolekül ermittelt. Hierzu wurden magnetische Kügelchen mit Aptamer III.1 beschichtet und aus dem Zelllysat von YPEN-1 Endothelzellen das molekulare Target isoliert und charakterisiert. Massenspektrometrie identifizierte das Zielmolekül als pigpen, ein bisher wenig beachtetes endotheliales Protein, dessen Expression den Übergang vom ruhenden zum angiogenen endothelialen Phänotyp charakterisiert. Da Neoangiogenese – die Bildung neuer Blutgefäße – ein Schlüsselmerkmal des Tumorwachstums darstellt kann Aptamer III.1 als sensible Sonde verwendet werden um pathologische Angiogenese von Glioblastomen zu detektieren.

Der Einsatz von fluoreszenzkonjugierten DNA-Aptameren in der Durchflußzytometrie und als histologisches Agens auf Gewebeschnitten als auch die Kopplung von Aptameren an magnetische Kügelchen zur Targetisolierung zeigten, daß diese neuartigen Sonden ohne Einbuße ihrer Bindungseigenschaften an Reportereinheiten gekoppelt bzw. auf Oberflächen immobilisiert werden können. DNA-Aptamer-Sonden – gekoppelt an einen Transducer – bergen somit ein enormes Potential als sensible und flexible biologisch aktive Komponente in Biosensoren zur Detektion jeglicher Art von Zielmolekül (Proteine - auch toxisch oder nicht immunogen, Peptide oder kleine organische Moleküle) Verwendung zu finden.

Literatur

- [1] Tuerk, C., Gold, L. (1990) *Science*, **294**, 505-510.
- [2] Gold, L., Polisky, B., Uhlenbeck, O., Yarus, M. (1995) *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 763-797.
- [3] Folkman, J. (1995) *J. Nat. Med.*, **1**, 27-31.
- [4] Lund *et al.* (1998) *Acta Neurol. Scand.*, **97**, 52-62.