

Quantifizierung der Puffer-Abhängigkeit von Aptamer-Bindungsreaktionen mit optischer Thermophorese**

Philipp Baaske,* Christoph J. Wienken, Philipp Reineck, Stefan Duhr und Dieter Braun

In der Biologie und Medizin ist es von entscheidender Bedeutung, biomolekulare Bindungsreaktionen in ihrer natürlichen Umgebung quantifizieren zu können. Derzeit existieren dafür aber kaum zuverlässige Messmethoden. Wir haben eine immobilisierungsfreie Methode entwickelt, die auf dem Effekt der Thermophorese, der gerichteten Bewegung von Molekülen entlang von Temperaturgradienten, beruht. Die Bindungskonstanten von Molekülen werden quantifiziert, indem die bindungsinduzierte Veränderung ihrer Thermophorese gemessen wird. Dieser Ansatz ermöglicht es, Bindungen im menschlichen Blutserum mit der gleichen Genauigkeit und Zuverlässigkeit zu quantifizieren wie in künstlichen Puffern. Diese Art der Bindungsquantifizierung erfordert keine Immobilisierung oder Konformationsänderung des Aptamers. Zur Visualisierung der Bindung ist somit nur eine einzige unspezifische Fluoreszenzmarkierung erforderlich.

Aptamere sind einzelsträngige Nukleinsureliganden, die mit hoher Spezifität an ihr Zielmolekül binden.^[1-4] Sie sind vielversprechende Kandidaten für medizinische und diagnostische Anwendungen, da sie sehr einfach durch In-vitro-Methoden^[5] entworfen werden können und eine ähnlich hohe Affinität und Spezifität wie Antikörper aufweisen. Aptamere wurden bereits in einer Vielzahl von Messverfahren^[6] eingesetzt, darunter optische Verfahren wie „Aptamer Beacons“,^[7] elektronische Ausleseverfahren^[8] und Verfahren, die auf einer Massennderung^[9] oder Kraftnderung^[10] beruhen.

In den meisten Messverfahren für Aptamere hängt die Signalerzeugung vom molekularen Erkennungsmechanismus ab. Bei diesen Ansätzen ist es erforderlich, dass das Aptamer nicht nur die richtige Konformation für die Bindung an sein Zielmolekül annimmt (Erkennung), sondern dass diese Bindung zusätzlich auch noch eine Strukturänderung hervorruft, die groß genug ist, um die Fluoreszenz eines Farbstoff-Quencher-Paars^[8] oder den Elektronentransfer zu einer

Elektrode^[9] signifikant zu verändern (Signal). Diese starke Verknüpfung zwischen molekularem Erkennungsmechanismus und Signalerzeugung erschwert den Entwurf von Aptameren. Oft sind zwei aufwendige Markierungsmodifikationen notwendig, die zu einer verringerten Affinität oder sogar zu einer vollen Unterdrückung der Bindung führen können.^[11] Diese Restriktionen können umgangen werden indem die Signalerzeugung vom Erkennungsmechanismus entkoppelt wird. Beispielsweise wird dafür ein zusätzliches kompetitives Oligonukleotid für die Signalerzeugung verwendet, das komplementär zum Aptamer ist.^[12]

Hier beschreiben wir einen neuen Ansatz für die Quantifizierung von Aptamer-Molekül-Wechselwirkungen, bei dem die Signalerzeugung vom Erkennungsmechanismus getrennt ist. Die Bindung kann unter physiologischen Bedingungen – frei diffundierend in komplexen biologischen Flüssigkeiten – gemessen werden, und es ist nur eine einzige unspezifische Farbstoffmarkierung erforderlich.

Die Messmethode nutzt die gerichtete Bewegung gelöster Moleküle in einem Temperaturgradienten aus, ein Effekt, der als Thermophorese bezeichnet wird.^[13-16] Eine räumliche Temperaturdifferenz ΔT führt im Bereich erhöhter Temperatur zu einer Depletion der gelösten Biomoleküle, deren stationärer Zustand durch den Soret-Koeffizienten S_T quantifiziert wird [Gl. (1)].

$$c_{\text{hot}}/c_{\text{cold}} = \exp(-S_T \Delta T) \quad (1)$$

Die Thermophorese wird durch die Eigenschaften der Grenzschicht zwischen Molekül und Lösungsmittel bestimmt. In konstanten Pufferbedingungen hängt die Thermophorese von der Gre, der Ladung und der Solvatationsentropie der Moleküle ab^[15,16] und zeigt bis in Konzentrationsbereiche von einigen mm keine intrinsische Konzentrationsabhängigkeit.^[17,18] Da sich durch die Bindung eines Aptamers an sein Zielmolekül typischerweise zumindest eine der oben genannten Gren ändert, unterscheidet sich die Thermophorese eines markierten Aptamers A deutlich von der Thermophorese eines Aptamer-Zielmolekül-Komplexes AT. In Titrationsexperimenten mit jeweils konstanten Pufferbedingungen nutzen wir diese bindungsinduzierte Änderung der Molekül-Thermophorese aus, um die Bindungskonstanten eines 5.6-kDa-Aptamers an das Protein Thrombin (37 kDa) und eines 8.3-kDa-Aptamers an AMP (0.3 kDa) und ATP (0.6 kDa) zu bestimmen. Die Messungen zeigen, dass die Bindungsaffinitäten vom verwendeten Puffer abhängen, und insbesondere die gemessenen Bindungskonstanten in 10% bzw. 50% Blutserum unterscheiden sich deutlich von den Bindungskonstanten in künstlichen Puffern.

[*] P. Baaske, C. J. Wienken, P. Reineck, Prof. D. Braun
Ludwig-Maximilians-Universität München, Systems Biophysics
Department of Physics, Center for NanoScience (CeNS)
80799 München (Deutschland)

P. Baaske, S. Duhr
NanoTemper Technologies GmbH
Amalienstraße 54, 80799 München (Deutschland)
Fax: (+49) 89-21801-6558
E-Mail: philipp.baaske@nanotemper.de
Homepage: <http://www.nanotemper.de>

[**] Wir danken dem Innovativprojekt „Functional Nanosystems“ der LMU und dem Exzellenzcluster „Nanosystems Initiative Munich“ (NIM) für die finanzielle Unterstützung.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200903998> zu finden.

Die Thermophoresemessung der 5'-fluoreszenzmarkierten Aptamere erfolgt in Glaskapillaren, die mit 500 nL Probenmaterial gefüllt sind. Als Messsignal wird die Veränderungen der Fluoreszenzverteilung F mit einem Epifluoreszenzmikroskop aufgenommen (Abbildung 1a). Der mikro-

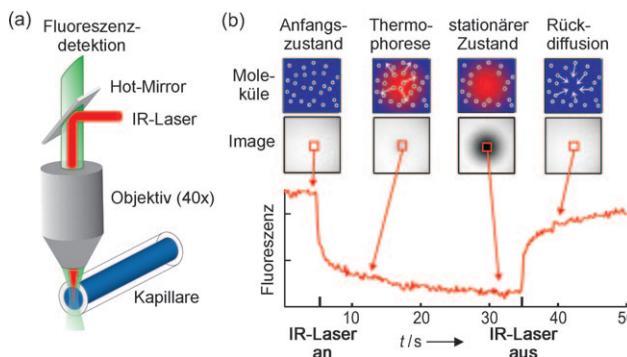


Abbildung 1. Thermophoresemessung. a) Das Blutserum innerhalb der Kapillare wird lokal mit einem fokussierten IR-Laser aufgeheizt, der durch einen Strahlteiler in ein Epifluoreszenzmikroskop eingekoppelt wurde. b) Die Fluoreszenz innerhalb der Kapillare wird mit einer CCD-Kamera aufgenommen und die normalisierte Fluoreszenz über die Zeit aufgetragen. Zum Zeitpunkt $t=5$ s wird der IR-Laser angeschaltet, und weil sich die farbstoffmarkierten Aptamere aufgrund ihrer Thermophorese aus dem lokal erwärmten Bereich weg bewegen, wird eine Fluoreszenzabnahme gemessen. Wird der Laser ausgeschaltet, so diffundieren die Moleküle wieder zurück.

skopische Temperaturgradient wird mit einem in die Flüssigkeit fokussierten IR-Laser (1480 nm) erzeugt, dessen Strahlung stark von Wasser absorbiert wird.^[15,16,19] Die Temperatur wird lokal, im Wesentlichen auf den Bereich des Laserfokus beschränkt um $\Delta T = 8$ K erhöht. Vor dem Einschalten des IR-Lasers wird eine homogene Fluoreszenzverteilung F_{cold} gemessen (Abbildung 1b). Wenn der IR-Laser eingeschaltet wird, führen zwei Effekte, die auf unterschiedlichen Zeitskalen ablaufen, zu einer veränderten Fluoreszenzverteilung F_{hot} . Die Temperaturerhöhung an sich hat eine vergleichsweise kurze Relaxationszeit (≈ 50 ms) und induziert aufgrund der intrinsischen Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenz des Farbstoffs eine Fluoreszenzabnahme. Die Aptamere bewegen sich auf einer längeren Zeitskala (≈ 10 s), die durch ihre Diffusionskonstante bestimmt ist, vom warmen Laserspot weg zu kühleren Bereichen.^[16,20] Aufgrund dieser Thermophorese nimmt die lokale Konzentration im warmen Spot ab, bis ein stationärer Zustand erreicht wird (Abbildung 1b).

Die Kinetik der durch eine Temperaturerhöhung ΔT hervorgerufenen Depletion wird durch die molekulare Diffusion D bestimmt. Das stationäre Konzentrationsverhältnis $c_{\text{hot}}/c_{\text{cold}} = \exp(-S_T \Delta T) \approx 1 - S_T \Delta T$ für diese Temperaturerhöhung ΔT wird durch den Soret-Koeffizienten S_T bestimmt.^[15,16] Die normierte Fluoreszenz $F_{\text{norm}} = F_{\text{hot}}/F_{\text{cold}}$ misst im Wesentlichen dieses Konzentrationsverhältnis $c_{\text{hot}}/c_{\text{cold}}$ und zusätzlich die intrinsische Temperaturabhängigkeit der Farbstoff-Fluoreszenz $\partial F/\partial T$. Linear angenähert ergibt sich so: $F_{\text{norm}} = 1 + (\partial F/\partial T - S_T) \Delta T$.^[16] Aufgrund der Linearität von Fluoreszenz und thermophoretischer Depletion können die

normierten Fluoreszenzwerte von ungebundenem Aptamer $F_{\text{norm}}(A)$ und Aptamer-Zielmolekül-Komplex $F_{\text{norm}}(\text{AT})$ gemäß des Superpositionsprinzips addiert werden. Bezeichnet man in einer Zielmolekül-Titrationsreihe den Anteil der an das Zielmolekül gebundenen Aptamere mit x , so kann das bindungsabhängige Fluoreszenzsignal nach Gleichung (2) beschrieben werden.

$$F_{\text{norm}} = (1-x) F_{\text{norm}}(A) + x F_{\text{norm}}(\text{AT}) \quad (2)$$

Basierend auf dem Kondensatormodell der Thermophorese,^[15,21] das für dünne Debye-Schichten unter Verwendung von Polystyrol-Mikrokugelchen,^[15] doppelsträngiger DNA,^[15] einzelsträngiger DNA^[16] und Ludox-Silikatpartikeln^[22] bestätigt wurde, kann die bindungsinduzierte Änderung des Soret-Koeffizienten S_T diskutiert werden, indem man nicht-ionische Beiträge vernachlässigt und nur die effektive Ladung Q_{eff} und den hydrodynamischen Radius R betrachtet. Mit diesen Annahmen gilt für den Soret-Koeffizienten die Proportionalität $S_T \sim (Q_{\text{eff}}/R)^2$, linear angenähert lässt sich die Änderung von S_T dann als $\Delta S_T/S_T = 2(\Delta Q_{\text{eff}}/Q_{\text{eff}} - \Delta R/R)$ schreiben. Nur für den unwahrscheinlichen Fall, dass sich bei einer Bindung Q_{eff} direkt proportional zu R ändert, ist keine Änderung in S_T zu erwarten. Aber selbst dann können die in dieser Näherung vernachlässigten Beiträge aus der Solvationsentropie^[15] zu einer messbaren Änderung in F_{norm} führen.

Die Thermophorese von 100 nm des am 5'-Ende mit dem Fluorophor Cy5 markierten Thrombin-Aptamers^[23] wurde in 10% menschlichem Blutserum gemessen (Abbildung 2). Die Konzentration des Thrombins wurde für die Messung von 0 nm bis 19500 nm titriert. In der Abbildung 2a ist zu sehen, dass sich der zeitliche Verlauf der thermophoretischen Depletion des reinen Aptamers deutlich vom Verlauf des am

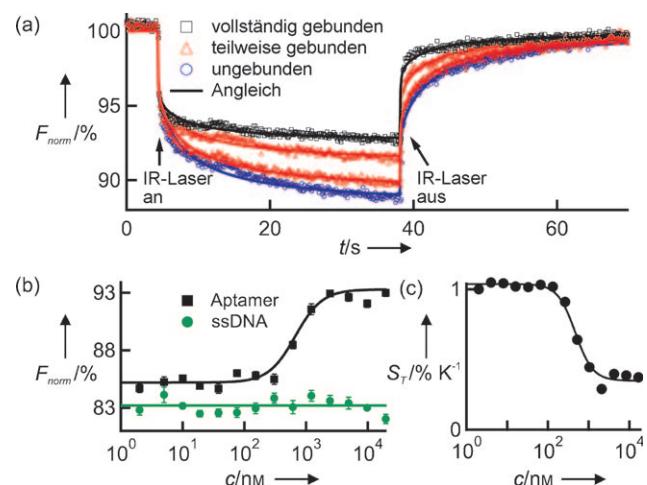


Abbildung 2. Aptamer-Thrombin-Bindung in 10% menschlichem Serum. a) Die thermophoretische Depletion des ungebundenen Aptamers ist nahezu zweimal größer als die des Aptamer-Thrombin-Komplexes. b) Normierte Fluoreszenz F_{norm} für $t=30$ s, aufgetragen für verschiedene Thrombin-Konzentrationen (schwarz). Die Thermophorese der 25meren ssDNA mit Zufallssequenz (grün) zeigt keine Abhängigkeit von der Thrombin-Konzentration. c) Die Aptamer-Thrombin-Bindung, dargestellt als Soret-Koeffizient S_T . S_T wurde basierend auf einem analytischen Modell der Thermophorese^[16] ermittelt.

Thrombin gebundenen Aptamers unterscheidet (Abbildung 2a). Trägt man die normierte Fluoreszenz F_{norm} zu einem festen Zeitpunkt t gegen die Thrombin-Konzentration auf, so erhält man eine sigmoidale Bindungskurve (Abbildung 2b), aus der sich ein EC_{50} -Wert von $680 \pm 80 \text{ nm}$ und ein Hill-Koeffizienten $n = 2$ berechnen lässt. Kontrollexperimente mit einer ssDNA-Zufallssequenz zeigen sowohl in 10% Serum als auch in 50% Serum weder in der Thermophorese noch in der Fluoreszenz eine Änderung (Abbildung 2b). Daraus lässt sich schließen, dass das Thrombin weder mit dem Cy5-Farbstoff noch mit der ssDNA-Zufallssequenz wechselwirkt, sondern ausschließlich an das Aptamer bindet.

Um den Soret-Koeffizienten S_T , die Diffusionskonstante D und die Temperaturabhängigkeit $\partial F / \partial T$ aus dem zeitlichen Verlauf der thermoporetischen Depletion zu berechnen, wurde eine 2D-Finite-Elemente-Simulation verwendet.^[16] Die Bindung des Aptamers an das Thrombin führt vorwiegend zu einer Änderung von S_T d.h., während der Titration nimmt S_T von 1.05 \% K^{-1} auf 0.35 \% K^{-1} ab (Abbildung 2c). Aufgrund ihres linearen Zusammenhangs geben F_{norm} (Abbildung 2b) und der Soret-Koeffizient S_T (Abbildung 2c) die Bindung in gleicher Weise wieder. Weder die ermittelte Diffusionskonstante D noch die temperaturabhängige Fluoreszenzänderung $\partial F / \partial T$ ändern sich während der Thrombin-Titration. Zu beachten ist, dass die Bestimmung von D in der verwendeten Simulation mit der Bestimmung von $\partial F / \partial T$ zusammenhängt und durch dieses Übersprechen wahrscheinlich keine Änderung in D gefunden wurde.

Das durch Thermophorese erzeugte Fluoreszenzsignal F_{norm} ermöglicht es, Änderungen von Moleküleigenschaften wie Größe, Ladung und Solvatationsentropie zu messen und so beispielsweise Bindungen nachzuweisen. Bei der Quantifizierung von Bindungen ist diese Methode, im Unterschied zur Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS), nicht auf die Messung der üblicherweise sehr kleinen Änderungen der Diffusionskonstante D beschränkt. Anders als bei oberflächenbasierten Methoden wie der Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) können Bindungen in Blutserum mit der gleichen Spezifität und Empfindlichkeit wie Bindungen in künstlichen Puffern quantifiziert werden (Abbildung 3a), wodurch sich der Einfluss von komplexen Flüssigkeiten auf die Bindungsreaktion aufzeigen lässt.

Um die breite Anwendbarkeit der Bindungsquantifizierung mittels Thermophorese zu zeigen, wurde auch die Bindung eines anderen Aptamers^[24] an ATP und AMP in verschiedenen Puffern gemessen (Abbildung 3b). Alle Messungen zeichnen sich durch ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) aus. Bei der Aptamer-Bindung an das 0.3 kDa AMP wurde ein $\text{SNR} = 93$ bestimmt, im Falle der Aptamer-Thrombin-Bindung in 50% Blutserum ein $\text{SNR} = 23$. Als Kontroll-Oligonukleotide wurden DNA-Sequenzen verwendet, die sich jeweils nur in zwei einzelnen Basen von den Aptamersequenzen unterschieden (Dinukleotid-Mutanten).

Die gemessene Dissoziationskonstante $K_D = 30 \pm 19 \text{ nm}$ der Aptamer-Thrombin-Bindung (Abbildung 3a) im Selektionspuffer stimmt gut mit dem Literaturwert $K_D = 25 \pm 25 \text{ nm}$ ^[23] überein. Anzumerken ist, dass für dieses Aptamer aufgrund der 5'-Markierung auch von Buff et al.^[25] eine leicht

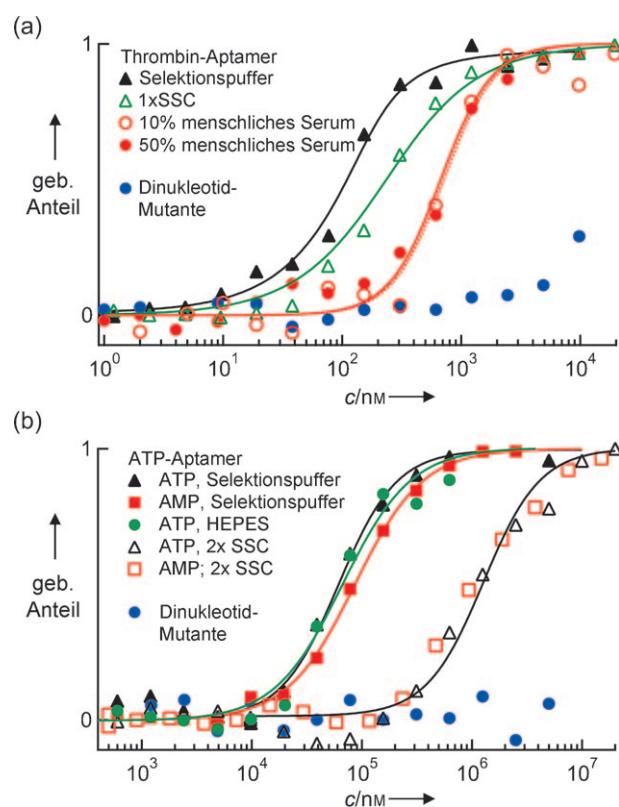


Abbildung 3. Bindungskurven in verschiedenen Puffern. a) Aptamer-Thrombin-Bindung im Selektionspuffer, 1x SSC (Natriumcitrat), 10% und 50% menschlichem Blutserum. b) Aptamer-Bindung an ATP und AMP in Selektionspuffer, HEPES und 2x SSC. Der Anteil an gebundenen Aptameren wurde mit Gleichung (2) berechnet.

reduzierte Bindungsaffinität gemessen wurde. In SSC-Puffer erhöhte sich die Dissoziationskonstante auf $K_D = 190 \pm 20 \text{ nm}$ und in 50% (10%) menschlichem Blutserum konnte die Bindung am besten mit einer Hill-Gleichung mit den Bindungskonstanten $\text{EC}_{50} = 720 \pm 100 \text{ nm}$ ($670 \pm 80 \text{ nm}$) und Kooperativität $n = 2$ angenähert werden.

Die Aptamer-ATP/AMP-Bindung (Abbildung 3b) zeigt, übereinstimmend mit der Literatur,^[7,26] eine kooperative Bindung von mehr als einem ATP oder AMP pro Aptamer. Im Selektionspuffer stimmen die gemessenen EC_{50} -Werte für ATP ($\text{EC}_{50} = 60 \pm 4 \mu\text{M}$) und AMP ($\text{EC}_{50} = 87 \pm 5 \mu\text{M}$) gut mit den Literaturwerten, gemessen im gleichen Puffer, überein.^[7,12] Messungen der ATP-Bindung in HEPES-Puffer mit $\text{EC}_{50} = 67 \pm 8 \mu\text{M}$ bestätigen ebenfalls diese Resultate. In allen Fällen war der Hill-Koeffizient $n = 1.4$. Erstaunlicherweise wurde im 2xSSC-Puffer eine viel schwächere Affinität der ATP/AMP-Aptamer-Bindungen mit $\text{EC}_{50} = 1100 \pm 100 \mu\text{M}$ gemessen. Die Lösungen mit ATP wurden gekühlt, um die Hydrolyse von ATP zu verhindern.

Wie von Cho und Ellington^[6] angegeben, hängen die Eigenschaften der Aptamer-Zielmolekül-Bindung sehr stark vom gewählten Puffer an: Im jeweiligen Selektionspuffer zeigten die Aptamere immer die höchste Affinität (Abbildung 3). Im Fall der Aptamer-Thrombin-Bindung im Blutserum können die Verringerung der Affinität ($\text{EC}_{50} = 720 \text{ nm}$) und die erhöhte Kooperativität ($n = 1.5$) eine Folge von

Wechselwirkungen des Thrombins mit Blutserumbestandteilen sein. Die unerwartet starke Verringerung der Affinität der Aptamer-ATP/AMP-Bindung im SSC-Puffer wird wahrscheinlich durch eine konkurrierende Wechselwirkung des stark negativ geladenen Citrat³⁻-Ions des SSC-Puffer mit den für die Aptamer-Bindung notwendigen Mg²⁺-Ionen hervorgerufen.

Zusammenfassend wurde basierend auf der Thermophorese gelöster Moleküle eine rein optische Messmethode für die Affinitätsbestimmung intermolekularer Reaktionen entwickelt. Die Messung erfolgt dabei frei in Lösung, und der Materialverbrauch liegt bei unter 500 nL wobei das tatsächliche Messvolumen lediglich zwei nL beträgt. Die Signalerzeugung erfolgt durch Thermophorese und ist auf diese Weise vom molekularen Erkennungsmechanismus entkoppelt. Das ermöglicht mehr Freiheiten im Aptamer-Design und macht die Messung robust, da keine sekundären chemischen Reaktionen notwendig sind. Der dynamische Messbereich überdeckt mehr als sechs Größenordnungen und reicht von nm bis zu einigen mm. Dabei kann die Bindung von kleinen Molekülen wie AMP mit der gleichen Güte quantifiziert werden wie die Bindung größerer Moleküle wie Thrombin. Die Messmethode funktioniert gut in komplexen biologischen Flüssigkeiten und bietet sich damit für die Evaluierung von Wirkstoffkandidaten, z.B. Spiegelmeren,^[27] unter physiologischen Bedingungen an. Sie kann auch zum Screening neuer Aptamere eingesetzt werden, da sie die Bindung unmarkierter Aptamere an ein markiertes Zielmolekül quantifizieren kann.

Experimentelles

Mikroskop: Zeiss AxioTech Vario mit Ölobjektiv 40x Plan Fluar (NA 1.3); CCD-Kamera Sensicam EM (PCO AG, Kelheim); Fluoreszenzanregung: LED Luxeon III (LXHL-LD3C); Fluoreszenzfiltersatz für Cy5 (F36–523, AHF-Analysentechnik, Tübingen); Probenkammer: Quarzkapillaren (Polymicro Technologies, USA) mit Innen Durchmesser 100 µm und Flüssigkeitsvolumen 500 nL.

Der Temperaturgradient wurde mit einer IR-Laserdiode (Furukawa FOL1405-RTV-617-1480, $\lambda = 1480$ nm, $\kappa = 320$ µm für Wasser, CW-Leistung maximal 320 mW; AMS Technologies AG, München) erzeugt. Der IR-Laserstrahl wurde mit einem wärmereflektierenden Spiegel („Hot-Mirror“) (NT46-386, Edmund Optics, Barrington, USA) in den Fluoreszenzstrahlengang eingekoppelt und durch das Mikroskopobjektiv in die Kapillare fokussiert. Die Temperatur innerhalb der Kapillare wurde mit den bekannten temperaturabhängigen Fluoreszenzintensitäten des TAMRA-Farbstoffs bestimmt.^[19] Innerhalb des Gauß-förmigen Laserspots mit einem 1/e²-Durchmesser von ca. 25 µm betrug die Temperaturerhöhung 8 K. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur ausgeführt.

Die Fluoreszenzänderung wurde um den IR-Laserspot in einem Bereich mit ca. 50 µm Durchmesser analysiert. Die aufgenommenen Fluoreszenzbilder wurden um den Fluoreszenzhintergrund und gegen das Ausbleichen des Farbstoffs korrigiert.^[16,20]

Humanes α-Thrombin: Haematologic Technologies Inc. (Essex Junction, USA; spezifische Aktivität 3593 U mg⁻¹, MW = 36.7 kDa). Menschliches Blutserum, AMP und ATP: Sigma Aldrich (München).

Die markierten DNA-Oligonukleotide wurde von der Fa. Metabion (Martinsried) synthetisiert. Sequenzen der Oligonukleotide, mit Mutationen in Kleinbuchstaben: Thrombin-Aptamer: 5'-Cy5-TGGT-TGGTGTTGGT-3'; Thrombin-Dinukleotidmutante: 5'-Cy5-TGGTTGtTGTGGTTtGT-3'; ATP-Aptamer: 5'-Cy5-CCTGGGG-GAGTATTGCGGAGGAAGG-3'; ATP-Aptamer-Dinukleotidmu-

tante: 5'-Cy5-CCTtGGGGAGTATTGCGGAtGAAGG-3'; ssDNA-Zufallssequenz: 5'-Cy5-TAGTTCTAATGTGTATCTCAATTTC-3'.

Verwendete Puffer: 1) Thrombin-Aptamer: Selektionspuffer:^[23] 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 0.01% Tween20, 4% BSA. Für die Messungen in Blutserum wurde der Selektionspuffer 1:1 mit 100% Blutserum gemischt. 1 × SSC: 15 mM Natriumcitrat pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0.01% Tween20, 4% BSA. 2) ATP-Aptamer: Selektionspuffer:^[24] 20 mM Tris-HCl pH 7.6, 300 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.01% Tween20. 2 × SSC: 30 mM Natriumcitrat pH 7.4, 300 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.01% Tween20. HEPES: 20 mM HEPES pH 7.5, 300 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.01% Tween20. Für die ATP-Messungen wurde die pH-Stabilität der Puffer mit dem pH-abhängigen Farbstoff BCECF überprüft.

Die Konzentrationen der Aptamere und Aptamermutanten wurden in allen Experimenten konstant bei 100 nM (Thrombin-Aptamer) und 500 nM (ATP-Aptamer) gehalten. Um sicherzustellen, dass die Aptamere ihre aktive Konformation annehmen, wurden sie vor allen Experimenten de- und renaturiert. Nach dem Mischen der Aptamere mit ihren Zielmolekülen wurden die Lösungen 2 h inkubiert.

Die K_D -Werte für die Thrombin-Messungen wurden berechnet, indem die quadratische Lösung des Massenwirkungsgesetzes für das Bindungsgleichgewicht mit K_D als einzigm freien Parameter an den Anteil an gebundenen Aptameren angeglichen wurde.^[11] Die EC₅₀-Werte wurde durch Angleichen der Hill-Gleichung an die Bindungskurven berechnet.

Eingegangen am 20. Juli 2009,
veränderte Fassung am 30. November 2009
Online veröffentlicht am 23. Februar 2010

Stichwörter:

Aptamere · DNA ·
Immobilisierungsfreie Methoden · Proteine ·
Wirkstoff-Forschung

- [1] G. Mayer, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 2710–2727; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 2672–2689.
- [2] A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, *346*, 818–822.
- [3] C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, *249*, 505–510.
- [4] D. L. Robertson, G. F. Joyce, *Nature* **1990**, *344*, 467–468.
- [5] B. Boese, K. Corbino, R. Breaker, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2008**, *27*, 949–966.
- [6] E. Cho, J. Lee, A. Ellington, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2009**, *2*, 241–264.
- [7] S. Jhaveri, R. Kirby, R. Conrad, E. Maglott, M. Bowser, R. Kennedy, G. Glick, A. Ellington, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2469–2473.
- [8] Y. Xiao, A. A. Lubin, A. J. Heeger, K. W. Plaxco, *Angew. Chem. 2005*, *117*, 5592–5595; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5456–5459.
- [9] S. Song, L. Wang, J. Li, C. Fan, J. Zhao, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2008**, *27*, 108–117.
- [10] D. Ho, K. Falter, P. Severin, H. E. Gaub, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 3159–3164.
- [11] S. Beyer, W. Dittmer, F. Simmel, *J. Biomed. Nanotechnol.* **2005**, *1*, 96–101.
- [12] N. Li, C. M. Ho, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2380–2381.
- [13] C. Ludwig, *Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien Math.-Naturwiss. Kl.* **1856**, *20*, 539.
- [14] S. Iacopini, R. Piazza, *Europhys. Lett.* **2003**, *63*, 247–253.
- [15] S. Duhr, D. Braun, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 19678–19682.
- [16] P. Reineck, C. J. Wienken, D. Braun, *Electrophoresis* **2010**, DOI: 10.1002/elps.200900505.

- [17] J. K. G. Dhont, *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, 1632–1641.
- [18] J. Rauch, W. Köhler, *J. Chem. Phys.* **2003**, *119*, 11977–11988.
- [19] P. Baaske, S. Duhr, D. Braun, *Appl. Phys. Lett.* **2007**, *91*, 133901.
- [20] S. Duhr, S. Arduini, D. Braun, *Euro. Phys. J. E.* **2004**, *15*, 277–286.
- [21] J. K. G. Dhont, S. Wiegand, S. Duhr, D. Braun, *Langmuir* **2007**, *23*, 1674–1683.
- [22] H. Ning, J. K. G. Dhont, S. Wiegand, *Langmuir* **2008**, *24*, 2426–2432.
- [23] L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas, J. J. Toole, *Nature* **1992**, *355*, 564–566.
- [24] D. E. Huizenga, J. W. Szostak, *Biochemistry* **1995**, *34*, 656–665.
- [25] M. C. R. Buff, F. Schäfer, B. Wulffen, J. Müller, B. Pötzsch, A. Heckel, G. Mayer, *Nucleic Acids Res.* **2009**, DOI: 10.1093/nar/gkp1148.
- [26] C. H. Lin, D. J. Patel, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 817–832.
- [27] C. Maasch, K. Buchner, D. Eulberg, S. Vonhoff, S. Klussmann, *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2008**, *52*, 61–62.