

Universität Potsdam
- Institut für Biochemie und Biologie -

Detektion einzelsträngiger DNA mit der Hilfe von DNAzymen

Abschlussarbeit zur Erlangung des akademischen Grades
Bachelor of Science(B.Sc.)

erstellt am

Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin

vorgelegt von

David Haselbach
Matrikelnummer 731103

Referent: Dr. Harald Seitz
Korreferent: Professor Dr. Robert Seckler

Erklärung der Selbstständigkeit

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die Zitate deutlich kenntlich gemacht zu haben.

Potsdam, den 19.08.2008

David Haselbach

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAzyme	katalytisches DNA-Molekül
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat
dUTP	2'-desoxy-Uridin-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
NOS	N-Oxysuccinimid
nt	Anzahl an Nukleotiden
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
RCA	rolling circle amplification
RCP	rolling circle product
RNA	Ribonukleinsäure
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SELEX	systematic evolution of ligands by exponential enrichment.
SSC	saline sodium citrate
ssDNA	einzelsträngige DNA
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBS	TRIS buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Abbildungsverzeichnis

2.1	Schematische Darstellung der Konformation des DNAzyms	3
2.2	Prinzip der <i>rolling circle amplification</i>	4
2.3	Prinzip des Assays	5
3.1	Schema der Zirkularisierung	9
3.2	Darstellung der genutzten Immobilisierungsvarianten.	10
4.1	Michaelis-Menten-Diagramm bezüglich ABTS	14
4.2	Bindungskurve von Hemin an G-Quadruplex	15
4.3	Zeitabhängigkeit der Konformation	16
4.4	Sensitivität der Messpuffer	16
4.5	Vergleich von verschiedenen Abständen der DNAzyme	17
4.6	Elektrophoretische Analyse der RCA.	18
4.7	Dot-Blot der RCA-Ansätze	19
4.8	Signale der RCA in Lösung	19
4.9	Überprüfung der Oberflächenbeschichtung	21
4.10	Schema des Hybridisierungsassays	21

Tabellenverzeichnis

3.1	Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide	6
4.1	Beispiel der Rohdaten	13
4.2	Ergebnisse der verschiedenen Immobilisierungsvarianten	20

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	2
2.1	DNAzyme	2
2.2	Rolling circle amplification	4
2.3	Zielstellung der Arbeit	5
3	Materialien und Methoden	6
3.1	Materialien	6
3.1.1	Oligonukleotide	6
3.1.2	Puffer	7
3.2	Methoden	7
3.2.1	Ausbildung der DNAzyme	7
3.2.2	Luminometrische Messung	7
3.2.3	Photometrische Messung	8
3.2.4	Standardisierung der Messsignale	8
3.2.5	Untersuchung der Heminbindung	8
3.2.6	Herstellung der RCA-Matrize	9
3.2.7	RCA in Lösung	9
3.2.8	Oberflächenbehandlungen	10
3.2.9	Immobilisierung der DNA	11
3.2.10	Konformation und Messung an der Oberfläche	12
4	Ergebnisse	13
4.1	DNAzyme in Lösung	13
4.1.1	Standardisierung der Daten	13
4.1.2	Optimierung der Messpuffer	13
4.1.3	Untersuchung des Hintergrundsignals	14
4.1.4	Heminbindung	14
4.1.5	Untersuchung der Konformation	15
4.1.6	Untersuchung der Sensitivität	16
4.1.7	Optimierung des Abstands zwischen benachbarten DNAzymen	17
4.2	RCA in Lösung	17
4.2.1	Kontrollen der RCA	17
4.2.2	Optimierung der RCA	19
4.3	Immobilisierte DNAzyme	20
4.4	RCA-Assay an der Oberfläche	22
5	Diskussion	23
5.1	Ausleseprinzipien	23
5.2	Eigenschaften des verwendeten DNAzyms	23
5.3	RCA in Lösung	24
5.4	Oberflächenkopplung	25
5.5	DNAzym-Aktivität an der Oberfläche	25
5.6	RCA-Assay an der Oberfläche	26
5.7	Ausblick	26
	Literaturverzeichnis	27

1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde eine katalytisch aktive einzelsträngige DNA (DNAzym), welche durch Bindung des Porphyrins Hemin eine Peroxidaseaktivität zeigt, auf ihre Anwendbarkeit für die Detektion oberflächengekoppelter einzelsträngiger Nukleinsäuren überprüft. Ein an eine Oberfläche gekoppeltes DNA-Oligonukleotid sollte als Analyt dienen. In einem auf der *rolling circle amplification* (RCA) basierenden Assay sollte der Analyt kovalent mit einer Vielzahl an DNAzymen markiert werden und nach einer photometrischen bzw. luminometrischen Reaktion detektiert werden.

Für die Etablierung des Assays wurden zuerst die Eigenschaften des DNAzyms untersucht. Zur Bestimmung der Aktivität des DNAzyms wurde der Umsatz von ABTS und Luminol mit H_2O_2 gemessen. Dabei ergaben beide Puffer die gleiche Sensitivität. Die Luminolmessung hatte einen stark eingeschränkten Messbereich (1-50nM DNAzym), weshalb hauptsächlich mit dem ABTS als Substrat gearbeitet wurde. Mit dem Umsatz von ABTS konnten DNAzym-Konzentrationen von 1-1000nM detektiert werden. Durch Aufnahme einer Michaelis-Menten-Kinetik wurde die Wechselzahl bezogen auf den ABTS-Umsatz von $0,63\frac{1}{\text{s}}$ bestimmt. Die Bindung des Hemins an das DNAzym wurde untersucht und die Dissoziationskonstante mit $K_D = 0,58 \pm 0,31\mu\text{M}$ (T=298K) bestimmt. Es wurde gezeigt, dass der Abstand zwischen zwei DNAzymen auf einem Strang mindestens 25 Nukleotide betragen sollte, damit sich beide ausbilden.

Ein nicht immobilisierter Analyt sollte mit dem gewünschten Assay detektiert werden. Dies gelang mit nanomolaren Konzentrationen des Analyten. Dabei erhielt man einen stetigen Anstieg der Peroxidaseaktivität des DNAzyms bis zu einer RCA-Dauer von 40min.

Eine Detektion eines an eine Oberfläche gekoppelten Analyten war bisher nicht möglich. Eine Bindung und eine RCA-Reaktion an der Oberfläche konnte zumindest in geringem Maße nachgewiesen werden, die Peroxidaseaktivität der entstandenen DNAzym-Sequenzen jedoch nicht.

2 Einleitung

2.1 DNAzyme

Der Einsatz von Nucleinsäuren für die Nanoanalytik liegt aufgrund einiger ihrer Eigenschaften nahe. Dazu gehören die unkomplizierte Herstellung und die Möglichkeit der spezifischen Hybridisierung mit anderen Nucleinsäuren. In den meisten Nucleinsäure basierten Assays wird die Nucleinsäure, um sie zu detektieren, durch Fluoreszenzfarbstoffe markiert. Diese Farbstoffe sind relativ teuer und beschränken die Detektion in gewissen Maße auf Bleich-, Resonanz- und Quencheffekte. Zudem gibt es keine einfache Methode der Signalamplifikation bei direkter Markierung. Es wäre wünschenswert, dass das Signal als intrinsische katalytische Eigenschaft einer Nucleinsäure erzeugt wird. Dies spricht für den Einsatz von katalytischen Nucleinsäuren.

Erst seit wenigen Jahrzehnten ist bekannt, dass neben Proteinen, auch Nucleinsäuren katalytische Eigenschaften besitzen. Es wurden *in vivo* eine Vielzahl von Ribozymen gefunden, die verschiedene katalytische Aufgaben erfüllen. Beispielsweise gibt es RNA-Moleküle als katalytischen Bestandteil von Enzymen oder mit autohydrolytischer Aktivität [1, 2]. Bisher wurden *in vivo* allerdings nur RNA- und keine DNA-Moleküle mit katalytischen Eigenschaften gefunden. Dies liegt wahrscheinlich an der fehlenden 2'-Hydroxyl-Gruppe, die in einer Vielzahl von Katalysemechanismen von Ribozymen Bestandteil des katalytischen Zentrums ist. RNA ist schwerer zu handhaben, da sie im Vergleich zur DNA eine relativ kurze Lebensdauer besitzt. Aufgrund der erhöhten Reaktivität der 2'-Hydroxyl-Gruppe sind hydrolytische Spaltungen der RNA begünstigt. Auch sind die, im Vergleich zu den meisten Proteinen, besonders stabilen RNasen in der Umwelt weit verbreitet. Katalytische DNA-Moleküle (DNAzyme) sind von großem analytischen Interesse. Sie wurden jedoch bisher in keinem Organismus entdeckt. Für die künstliche Erzeugung wurden DNA-Moleküle mit dem SELEX-Verfahren (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) *in vitro* nach ihren Bindungseigenschaften, einem bestimmten Stoff gegenüber selektiert [3]. Dieses Verfahren beruht auf dem Liehnhard'schen Konzept, welches besagt, dass ein Stoff, der den Übergangszustand einer Reaktion binden und stabilisieren kann, als Katalysator dieser Reaktion fungiert [4].

Es wurde herausgefunden, dass vor allem einzelsträngige Nucleinsäure-Moleküle fähig sind, ein präzises aktives Zentrum zu bilden, da sie flexibler sind und sich dadurch in eine Vielzahl verschiedener Sekundärstrukturen falten können. Für die Faltung sind in der Regel Metallionen nötig, die in einigen Fällen auch Teil des Katalysemechanismus sind. Die ersten künstlich hergestellten DNAzyme hatten ähnliche katalytische Eigenschaften, wie die ersten entdeckten Ribozyme - sie hydrolysieren und ligieren Nucleinsäuren [5]. Dies fand eine sehr breite Anwendung in der Nanotechnologie. DNA-Motoren, die über einen RNA-Strang gleiten und ihn spezifisch schneiden sowie kleine DNA-Rechenmaschinen konnten entwickelt werden [6]. Für analytische Anwendungen mit dem Ziel der Detektion und Quantifizierung von Analyten sind hydrolysierende und ligierende DNAzyme wenig zu gebrauchen. Dafür sind enzymatische Farbreaktionen notwendig. Solche Reaktionen haben zusätzlich den Vorteil, dass sie zu einer

2.2 Rolling circle amplification

Zur Amplifikation des DNAzyms und damit zur Verstärkung des Messsignals soll für diese Arbeit die *rolling circle amplification* (RCA) genutzt werden. Diese Methode basiert auf der Sigma-Replikation, die vor allem von Phagen, wie zum Beispiel dem *Bacillus subtilis*-Phagen *Phi29*, bekannt ist und Mitte der 60er Jahre entdeckt wurde [11].

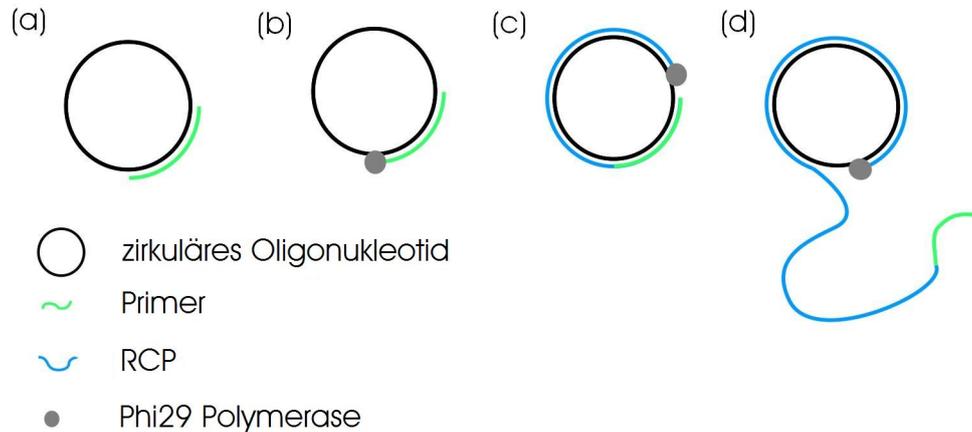


Abbildung 2.2: Prinzip der *rolling circle amplification*. (a) Hybridisierung des Primers an eine zirkuläre Matrize (b) Bindung der Phi29 Polymerase (c) Synthese entlang der Matrize (d) kontinuierliche Synthese durch Verdrängung des neu synthetisierten Stranges.

Bei der RCA dient ein geschlossener einzelsträngiger DNA- oder RNA-Ring als Matrize. Ausgehend von einem Primer synthetisiert die Phi29 Polymerase in 5'-3'-Richtung einen komplementären Strang. Die Besonderheit dabei ist, dass sie nach vollständiger Synthese den neu synthetisierten Strang von der Matrize verdrängen kann (siehe Abbildung 2.2). Somit entstehen kovalent verknüpfte, komplementäre Kopien der Matrize. Die Synthese erfolgt dabei mit einer fast linearen Kinetik. Es können Stränge von bis zu 70000 Nukleotiden in 30 Minuten synthetisiert werden, was bei kleinen, in der Analytik verwendeten Matrizen (ca. 100nt) einer Kopienzahl von einigen hundert bis tausend entspricht. Seit Mitte der 90er wird die RCA als molekularbiologisches Werkzeug genutzt. Die Besonderheit der Methode ist, dass sie isotherm verläuft und dadurch im Vergleich zur PCR einfachere Assays erlaubt, weil Heiz- und Abkühlungsschritte nicht benötigt werden. Zur Detektion des *rolling circle products* (RCP) können verschiedene Methoden angewendet werden. Das RCP kann entweder direkt durch den Einbau markierter Nukleotide oder indirekt durch die Hybridisierung des RCPs mit markierten Sonden, detektiert werden.

2.3 Zielstellung der Arbeit

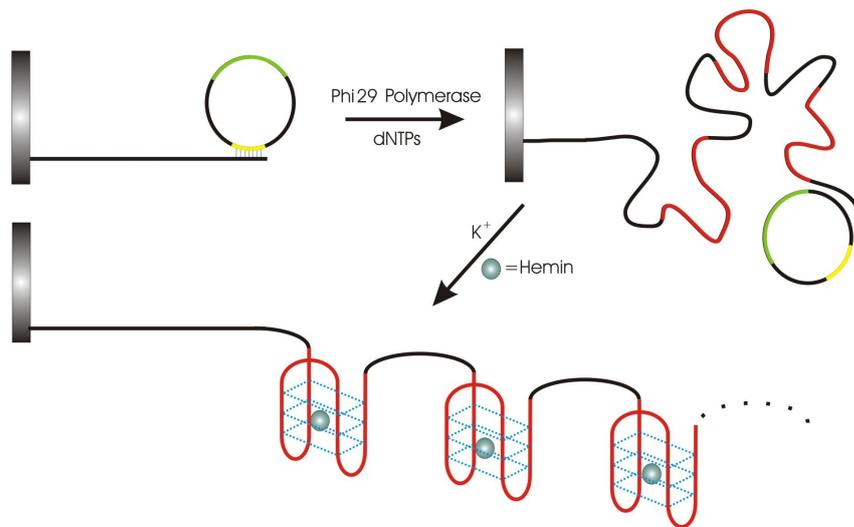


Abbildung 2.3: Prinzip des Assays. Nach Immobilisierung eines Analyten-Oligonukleotids an eine Oberfläche bindet ein ringförmiger ssDNA-Ring mit einer spezifischen Hybridisierungssequenz (gelb) und einer dem DNAzym komplementären Sequenz (grün) an den Analyten. Die Phi29 Polymerase synthetisiert an dieser zirkulären Matrize ein RCP, welches eine Vielzahl von DNAzym-Sequenzen enthält. Nach Zugabe des Kalium enthaltenden Konformationspuffers entstehen die DNAzyme (verändert nach [12]).

In dieser Arbeit sollte eine alternative Methode entwickelt werden, um kurze, auf einer Oberfläche immobilisierte Oligonukleotide zu detektieren. Der Analyt sollte mit einer Kette von DNAzymen kovalent verknüpft und markiert werden.

Als Voraussetzung sollten die Eigenschaften des DNAzyms untersucht werden, um die Parameter des späteren Assays abschätzen zu können. Zur Ermittlung der nötigen Heminmenge sollte die Bindung des Hemins an die Quadruplex-Struktur gemessen werden. Weiter sollte die Sensitivität und die Aktivität des DNAzyms gegenüber ABTS bzw. Luminol ermittelt werden. Faktoren wie die Dauer der Konformation und die Temperaturstabilität sollten untersucht werden.

Nach der Optimierung der Bedingungen der Konformation und der Indikatorreaktion sollten Analytenmoleküle in Lösung detektiert werden. Als Analyt sollte dabei eine ssDNA dienen und in einem ersten Schritt mit einer zirkulären Analysator-Nukleinsäure hybridisieren. Der DNA-Ring enthielt neben der Erkennungssequenz für den Analyten die komplementäre DNAzym-Sequenz. Der Analyt konnte so als Primer einer RCA-Reaktion dienen. Durch die Phi29 Polymerase wurde an den Analyten eine Kette von DNAzym-Sequenzen geknüpft. Diese sollten konformieren, Hemin binden und durch Katalyse der Indikatorreaktion, die Anwesenheit des Analyten anzeigen.

Auf die Etablierung des Assays in Lösung folgend, sollte der Analyt an die Oberfläche gekoppelt und detektiert werden. Verschiedene Möglichkeiten der Oberflächenkopplung sollen auf ihre Anwendbarkeit geprüft werden. Es sollte getestet werden, ob das DNAzym sich nach Oberflächenkopplung noch ausbilden kann und die Indikatorreaktion abläuft. Im Anschluss sollte der Lösungsassay an der Oberfläche etabliert und optimiert werden.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von Invitrogen bezogen, mit Aqua bidest auf eine Konzentration von 100 μ M gebracht und bei -80°C gelagert.

Tabelle 3.1: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide. DNAzym-Sequenzen sind rot, komplementäre DNAzym-Sequenzen grün, die Erkennungssequenz des Analyten blau und die dazu komplementäre Sequenz gelb dargestellt.

Bezeichnung	Sequenz
(A)	5'-CTC AGA AAA TCG GGT AGG GCG GGT TGG GTT TTG GGT AGG GCG GGT TGG GTT TTG GGT AGG GCG GGT TGG GGA ATA CGC C-3'
(B)	5'-CTC AGA AAA TCT TTT GGG TAG GGC GGG TTG GGT TTT CCA TCG GTA TTT TGG GTA GGG CGG GTT GGG TTT TGA ATA CGC C-3'
(C)	5'-CTC AGA AAA TCT TTT CCA TCG GTA CGG GTC TTT TGG GTA GGG CGG GTT GGG TTT TCC ATC GGT ACG GCT GGA ATA CGC C-3'
(D)	5'-GGC GTA TTC CAG CCG TAC CGA TGG AAA ACC CAA CCC GCC CTA CCC AAA AGA CCC GTA CCG ATG GAA AAG ATT TTC TGA G-3'
(E)	5'-GAA TAC GCC CTC AGA AAA TC-3'
(F)	Linker-5'-GAA TAC GCC CTC AGA AAA TC-3'
(G)	Alexa532-5'-ACC CAA CCC GCC CTA CCC A-3'
(H)	5'-GGA AAA GAT TTT CTG AGT AGC ATG ACT AGC ATT G-3'-Biotin
(I)	5'-CTC AGA AAA TCT TTT CCA TCG GTA CGG GTC TTT TTA CGC CCT CAG AAA AT-3'
(L1)	5'-CGA TGG-3'
(L2)	5'-CGT AAT ATG TGT AGG CG-3'
(L3)	5'-AGC TCA AGT CAC ATC GAC CCG TAC CGA TGG-3'

Für die Vorversuche und die Kontrollen wurden drei einzelsträngige Oligonukleotide verwendet, welche drei (A), zwei (B) und ein (C) DNAzym enthielten (DNAzym-Sequenz nach Cheglakov et al. [13]). Diese Oligonukleotide wurden mit Biotin- oder Aminomodifikation am 5'-Ende verwendet. Als Matrize für die RCA wurde ein Oligonukleotid mit einer zum DNAzym komplementären Sequenz und mit der Erkennungssequenz des Analyten verwendet (D). Für den Ringschluss wurde das Oligonukleotid (E) mit einer Hybridisierungsstelle für das 3'- und 5'-Ende des zu zirkularisierenden Oligonukleotids verwendet. Als Analyt wurde ein Primer (F) genutzt, welcher die Hybridisierungssequenz für (D) und am 5'-Ende eine Linkersequenz mit einer Amino-

bzw. Biotinmodifizierung enthält. Dabei wurden verschiedene unspezifische Linkersequenzen und -längen (6-30nt) verwendet (L1-L3). Zur Analyse der Immobilisierung der DNAzyme wurde ein fluorophorgekoppeltes Oligonukleotid (G) verwendet. Für eine Immobilisierung durch Hybridisierung des DNAzym tragenden Oligonukleotids wurde Oligonukleotid (H) genutzt. Für einen dazu analogen RCA-Ansatz wurde ein Analyten-Primer (I) erstellt, der an die Oberfläche durch Hybridisieren immobilisiert wird.

3.1.2 Puffer

Für die Ausbildung der Quadruplexstruktur wurde ein 2x Konformationspuffer (0,4M NaCl, 40mM KCl, und 50mM HEPES, pH 7,4) und eine 4,6mM Hemin-Stammlösung (Molekula, UK) in DMSO (Sigma-Aldrich) hergestellt [13]. Weiterhin wurde eine 5mM Luminolstammlösung (Fluka) in 10mM NaOH-Lösung angesetzt. Für Luminol-Messungen wurde frisch ein Luminolpuffer angesetzt: 625 μ M Luminol, 0,03% H₂O₂, 80mM NaCl, 10mM HEPES pH 9,0, 8mM KCl. Die ABTS-Messungen wurden jeweils frisch mit einer 9mM ABTS-Stammlösung (VWR und Sigma-Aldrich) in 0,05M Phosphat-Citratpuffer (0,05M Na₂HPO₄, 0,024M Citronensäure pH 5,0) mit 0,03% H₂O₂ durchgeführt.

Es wurden weiter folgende Puffer hergestellt:

20x SSC (3M NaCl, 0,34M Natriumcitrat, pH 7,0)

10x PBS (1,36M NaCl, 27mM KCl, 0,1M Na₂HPO₄, 17,6mM KH₂PO₄, pH 7,4)

10x TBE (89mM TRIS, 89mM Borsäure, 2mM EDTA, pH 8,0)

1x Hybridisierungspuffer(0,5M NaCl, 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 0,01% SDS, 10mM DTT, pH 7,5)

1x Coatingbuffer (0,1M NaHCO₃, 12,5mM Na₂CO₃, pH 9,5)

10x TBS-T (1,5M NaCl, 100mM Tris pH 8,0, 1% Tween20)

Alle nicht spezifizierten Substanzen stammen von Merck.

3.2 Methoden

3.2.1 Ausbildung der DNAzyme

Zur Ausbildung der Quadruplexstruktur wurde die jeweilige DNA mit Aqua bidest auf das doppelte der gewünschten Konzentration verdünnt und für 9min auf 95°C erhitzt. Dieser Ansatz wurde kurz zentrifugiert und auf etwa 25°C abkühlen gelassen. Der Konformationspuffer wurde durch die vierfache DNAzym-Endkonzentration ergänzt und jeder Ansatz mit diesem Puffer im Verhältnis 1:2 verdünnt. Die Ansätze wurden für 2h bei Raumtemperatur inkubiert.

3.2.2 Luminometrische Messung

Für die Luminolmessungen wurden dreimal 1 μ l des jeweiligen Konformationsansatzes, der vor der Messung mit 1x Konformationspuffer 1:40 verdünnt wurde, in je ein *Well* einer 96er-Mikrotiterplatte (3610, Corning) pipettiert. Als Negativkontrolle dienten dreimal 1 μ l eines Konformationsansatzes ohne DNA. Als Positivkontrolle wurde auf jeder Platte dreimal 1 μ l eines

25 μ M Konformationsansatzes von Oligonukleotid (C) nach dem gleichen Prinzip gemessen. Die Messung wurde vollautomatisch mit einem Luminometer (LB 960 Centro, Berthold Technologies) durch Zugabe von 50 μ l Luminolpuffer mit mittlerer Geschwindigkeit und die sofortige integrierte Erfassung des Signals über 0,2s in $\frac{\text{counts}}{\text{s}}$ durchgeführt.

3.2.3 Photometrische Messung

Je 1 μ l des Konformationsansatzes bzw. der Kontrolle und 50 μ l der ABTS-Stammlösung wurden in eine 96-Well-Mikrotiterplatte (Nunc) pipettiert. Die Extinktion bei einer Wellenlänge von 405nm ($\epsilon = 36,8 \frac{1}{\text{cm} \cdot \mu\text{M}}$) wurde mit einem Microplatereader (SpectraMax190, Molecular Devices) bei 25°C über 30min alle 20s gemessen. Als Signal wurde der zeitliche Anstieg der Anfangssekante der Extinktion ermittelt.

3.2.4 Standardisierung der Messsignale

Als interner Standard diente die Positivkontrolle. Jedes Signal wurde durch den Mittelwert der Messsignale dieser Kontrolle geteilt. Zudem wurde aus den standardisierten Werten der Negativkontrollen eine Nachweisgrenze berechnet. Diese ergibt sich aus der Summe des Mittelwerts der Messwerte und ihrer dreifachen Standardabweichung. Der ermittelte Wert wurde von allen standardisierten Messwerten abgezogen.

3.2.5 Untersuchung der Heminbindung

Um die Bindung des Hemins an den G-Quadruplex zu messen, wurden für 25 μ M Oligonukleotid (C) in 13 verschiedenen DNA:Hemin-Verhältnissen (zwischen 1:20 und 25:1) jeweils die Aktivität bestimmt und gegen den Hintergrund korrigiert. Die Konformation und die Messung erfolgten bei einer Temperatur von 25°C. Es werden folgende Reaktionsgleichungen angenommen:



Vereinfachend wird die Faltung der DNA in den Quadruplex als nahezu vollständig angenommen. Die Bindung folgt dann nach dem Massenwirkungsgesetz der Formel:

$$[H]_b = \frac{[DNA]_0 + K_D + [H]_0}{2} - \sqrt{\frac{([DNA]_0 + K_D + [H]_0)^2}{4} - [H]_0 \cdot [DNA]_0} \quad (3.1)$$

Dabei ist K_D die Dissoziationskonstante, $[DNA]_0$ die Ausgangs-DNA-Konzentration, $[H]_0$ die Ausgangs-Hemin-Konzentration und $[H]_b$ die gebundene Hemin-Konzentration. Weiter gilt, dass die Bindung sättigbar ist. Daraus folgt:

$$\frac{S}{S_\infty} = \frac{[H]_b}{[DNA]_0} \quad (3.2)$$

mit S als Messsignal und S_∞ als Messsignal unter der Bedingung der Sättigung. Mit Hilfe dieser Gleichungen wurden die Dissoziationskonstante mittels nicht-linearer Regression bestimmt.

3.2.6 Herstellung der RCA-Matrize

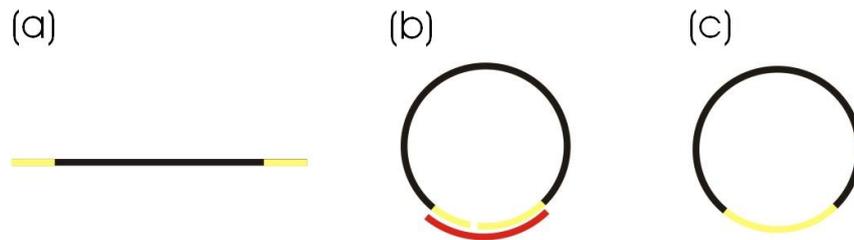


Abbildung 3.1: Schema der Zirkularisierung. (a) Die lineare Matrize enthält an beiden Enden eine Hybridisierungsstelle (gelb) für den Hilfsoligonukleotid (rot). (b) Nach der Phosphorylierung der Matrize erfolgt die Hybridisierung der Oligonukleotide. (c) Das Hilfsoligonukleotid wird nach erfolgter Ligation abgebaut.

Zur Zirkularisierung der RCA-Matrize wurde der Oligonukleotid (D) phosphoryliert: Der Phosphorylierungsansatz enthielt $20\mu\text{M}$ Oligonukleotid (D) (200pmol), $23,3\text{mM}$ ATP (Invitrogen), $1,55\frac{\text{U}}{\mu\text{l}}$ T4-Polynucleotidkinase (NEB, UK) sowie 1x T4-PNK-buffer (NEB, UK) in $10\mu\text{l}$ Gesamtvolumen. Der Ansatz wurde 30min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 200pmol Oligonukleotid (E) wurde das Enzym durch das Erhitzen auf 75°C für 20min inaktiviert. Zur Hybridisierung der beiden Oligonukleotide wurde der Ansatz 3h bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Ligation wurden zum Phosphorylierungsansatz $2,67\text{mM}$ ATP, $200\frac{\text{U}}{\mu\text{l}}$ T4-Ligase (NEB, UK) und 1x T4-Ligase-Buffer hinzugegeben und damit der Phosphorylierungsansatz 2:3 verdünnt. Die Ligation wurde für 2h bei 16°C durchgeführt, für 10min auf 75°C erhitzt und auf Raumtemperatur abgekühlt. Der Hilfsoligonukleotid (E) und die nicht ligierte Matrize (D) wurden mit Exonuklease VII abgebaut. Der Exonuklease Reaktionsansatz enthielt: $14,3\frac{\text{U}}{\mu\text{l}}$ Exonuklease VII (Epicentre), 1x Reaktionspuffer und $0,3\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}}$ BSA (NEB, UK) und wurde für 2h bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde für 15min bei 75°C inaktiviert. Die Hybridisierung von 200pmol Oligonukleotid (F) an die ligierte Matrize erfolgte 3h bei Raumtemperatur.

3.2.7 RCA in Lösung

Für die RCA wurden 3 Ansätze verwendet:

- (a) Vollständiger RCA-Ansatz: $2,5\text{pmol}$ Matrize, $55\mu\text{M}$ dNTPs, $1,4\frac{\text{U}}{\mu\text{l}}$ Phi29 Polymerase (NEB, UK), 1x Reaktionspuffer (NEB, UK) und $0,22\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}}$ BSA
- (b) Negativkontrolle: wie (a) ohne Phi29 Polymerase
- (c) Positivkontrolle: wie (a) aber mit $11\mu\text{M}$ dTTP anstatt von $55\mu\text{M}$ und zusätzlich $140\mu\text{M}$ Biotin-16-dUTP

Das Gesamtvolumen betrug jeweils $50\mu\text{l}$. Nach Zugabe der Polymerase wurden die Ansätze bei 30°C für 40min inkubiert. Es wurden Proben zu verschiedenen Zeitpunkten genommen und das Enzym durch Erhitzen auf 75°C für 10min inaktiviert.

Zur Überprüfung der RCA wurden Dot-Blots angefertigt. Auf eine Hybond-N+ -Membran (Amersham Bioscience) wurden jeweils $1\mu\text{l}$ Probe der RCA-Reaktion aufgebracht. Als Positivkontrolle wurde ein Oligonukleotid, der eine bekannte Menge Biotin-dUTP inkorporiert hatte in verschiedenen Konzentrationen ($10\mu\text{M}$, $5\mu\text{M}$, $1\mu\text{M}$) verwendet. Die Probe wurde mit der Membran mittels UV-Strahlung quervernetzt und die Membran zweimal mit

2x SSC-Puffer + 0,1% SDS gewaschen. Weitere analoge Waschschrte wurden mit 1x SSC + 0,1% SDS und 0,1x SSC + 0,1% SDS durchgeföhrt. Daraufhin wurde die Membran mit 1x PBS gewaschen und für 1h im Dunkeln mit $1 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Cy3-Streptavidin (Amersham Bioscience) in 1x PBS unter Schütteln inkubiert. Die Membran wurde erneut mit 1x PBS gespült und bei einer Anregungswellenlänge von 550nm und einem Kantenfilter ($\lambda > 575\text{nm}$) wurde die Inkorporation von Biotin-dUTP in das RCP über die Bindung von Cy3-Streptavidin ausgelesen.

Weitere Analysen erfolgten mittels 7% Polyacrylamidgelelektrophorese. Dazu wurden 17,8ml 40% Acrylamid/Bisacrylamid(19:1) (Biorad) in 1x TBE-Puffer auf 100mL verdünnt und die Polymerisation mit 3,3ml 1,6% APS und 50 μl TEMED durchgeföhrt. Jeweils 2 μl Probe wurden mit 5 μl Wasser und 3 μl Glycerin gemischt und für 10min auf 95°C erhitzt. Die Proben wurden in dem Gel bei 40mA aufgetrennt. Daraufhin wurde es für 5min 1x SYBR-Green I (Invitrogen) in 1x PBS inkubiert und bei 494nm angeregt und mit Kantenfilter ($\lambda > 510\text{nm}$) ausgelesen.

Zur Aktivitätsmessung wurde der RCA-Ansatz und die RCA-Negativkontrolle mit 5 μM Hemin in 1x Konformationspuffer für 3h konformiert. Für die Messung wurden 10 μl Konformationsansatz mit 80 μl ABTS-Puffer (1,17mM ABTS und 2,82mM H₂O₂ in Phosphat-Citrat-Puffer) im Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte gemischt und die Änderung der Extinktion über die Zeit mit einem Microplatereader (SpectraMax190, Molecular Devices) gemessen [14].

3.2.8 Oberflächenbehandlungen

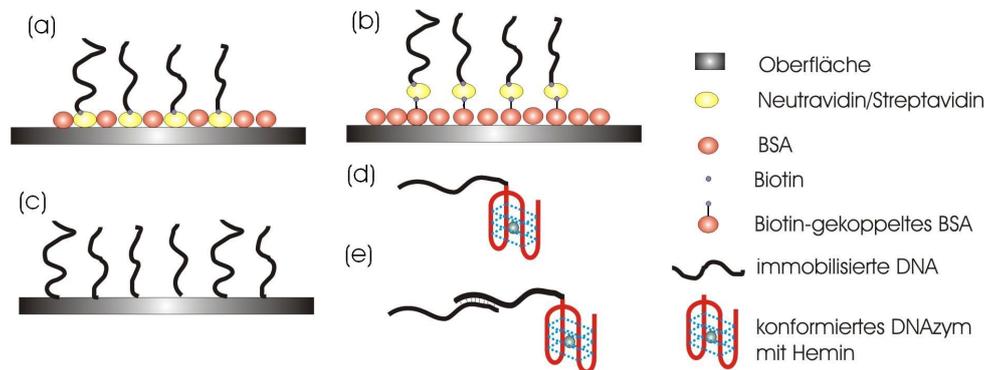


Abbildung 3.2: Darstellung der genutzten Immobilisierungsvarianten. (a) Immobilisierung über die Adsorption von Neutravidin/Streptavidin an die Oberfläche, Block durch BSA und Bindung eines biotinkoppelten Oligonukleotids. (b) Immobilisierung über die Adsorption von biotinkoppeltem BSA und ungekoppeltem BSA. Neutravidin dient als Bindeglied zwischen immobilisiertem Biotin-BSA-Konjugat und biotinkoppelter DNA. (c) Direkte Immobilisierung des aminomodifizierten Oligonukleotids durch Bindung an eine chemisch vorbehandelte Oberfläche. (d) DNAzym ist mit einer Aminogruppe oder mit Biotin modifiziert und bindet direkt an die Oberfläche. (e) DNAzym wird an das immobilisierte Oligonukleotid, welches mit Aminogruppe oder Biotin modifiziert ist, hybridisiert.

Es wurden mehrere 96-Well-Mikrotiterplatten und Beschichtungsmöglichkeiten verwendet. Die benutzten Platten waren (I) die 96-Well-Assay-plate (3610, Corning), (II) die High-bind-plate (Greiner), (III) die 96-Well-Microplate (Nunc) und (IV) die NOS-beschichtete DNA-Bind-Plate (Corning). Zudem wurden (V) Vantage Aldehyde Slides (Cel Associates) verwendet. Die Platten wurden während aller Inkubationsschritte mit Adhesive PCR Film (Thermo Scientific) abgeklebt und anschließend zentrifugiert um einen Flüssigkeitsverlust zu minimieren.

Die Platten (I), (II) und (III) wurden mit verschiedenen Mengen ($5\mu\text{g}$ - $0,5\mu\text{g}$) an Streptavidin (Sigma-Aldrich) bzw. Neutravidin (Pierce) in $50\mu\text{L}$ Coating-Puffer beschichtet. Dazu wurden die Platten mit dieser Lösung über Nacht im Kühlschrank (4°C) inkubiert. Der Überstand wurde entfernt und dreimal mit $200\mu\text{l}$ 1x TBS-T gewaschen. Zum Blocken wurden $200\mu\text{l}$ 2%(w/v) BSA in 1x TBS-T in die *Wells* gegeben, für 1h bei 37°C inkubiert und dreimal mit $200\mu\text{l}$ 1x TBS-T gewaschen (siehe Abbildung 3.2(a)). Um die Beladungsdichte zu überprüfen, wurden die *Wells* mit verschiedenen Mengen (288pmol - $7,2\text{pmol}$) an Biotin-Fluorescein (Pierce) in $50\mu\text{l}$ 0,1M Na_2CO_3 (pH 9,6) aufgetragen und 30min unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde dreimal mit $100\mu\text{l}$ 1x TBS-T gewaschen und bei 550nm als Anregungswellenlänge und einem Kantenfilter ($\lambda > 575\text{nm}$) ausgelesen.

Für eine weitere Neutravidinbeschichtung wurde ein BSA-Biotin-Konjugat hergestellt (siehe Abbildung 3.2(b)). Dazu wurden 2mg BSA in 2ml 0,1M Na_2CO_3 gelöst und $40\mu\text{l}$ BAC-Biotin-Lösung (24mg NHS-LC-Biotin (Pierce) in 2ml N,N-dimethylformamid) hinzugegeben. Der Ansatz wurde für 30min bei Raumtemperatur inkubiert [15]. Die Reinigung des Konjugats erfolgte über eine NAP 5 Säule (GE Healthcare), die mit 10ml Konjugatpuffer (0,1M Tris-HCl pH 8,0, 0,9%(w/v) NaCl, 0,05% NaN_3) äquilibriert wurde. Die Säule wurde mit $500\mu\text{l}$ Konjugationsansatz beladen und mit 4x $500\mu\text{l}$ Konjugatpuffer eluiert. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Fraktionen 1 und 2 wurden vereinigt und weiter verwendet. Mit jeweils $1\mu\text{g}$ Konjugat in $50\mu\text{L}$ Beschichtungs-Puffer (0,1M Na_2CO_3 , 0,9%(w/v) NaCl und 0,04% NaN_3) wurden die Platten (I), (II) und (III) beschichtet und für 24h bei Raumtemperatur inkubiert. Die *Wells* wurden zweimal mit $200\mu\text{l}$ 50mM Tris pH 8,0, 1%(w/v) BSA, 0,9%(w/v) NaCl und 0,04% NaN_3 gewaschen und 1h bei 37°C inkubiert. Zu diesem Gemisch wurden $0,8\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ Neutravidin gegeben und 24h bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Überprüfung der Beschichtung wurde ein Streptavidin-Cy3-Konjugat verwendet. $50\mu\text{l}$ ($1\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$) des Konjugats in 1x PBS wurde in die *Wells* pipettiert und für 1h inkubiert. Die *Wells* wurden daraufhin dreimal mit 1x SSC gewaschen, die Fluoreszenz bei 550nm angeregt und mit einem Kantenfilter ($\lambda > 575\text{nm}$) ausgelesen.

3.2.9 Immobilisierung der DNA

Zur Immobilisierung der biotinkoppelten Oligonukleotide an die mit Streptavidin bzw. Neutravidin beschichteten Oberflächen wurden jeweils 100pmol des entsprechenden Oligonukleotids in $50\mu\text{l}$ 1x PBS gelöst, in ein *Well* pipettiert und für 1h bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden zweimal mit $200\mu\text{l}$ 1x TBS-T und einmal mit $200\mu\text{l}$ Aqua bidest gewaschen. In den Hybridisierungsassays (siehe Abbildung 3.2(e)) wurden 150pmol der zu hybridisierenden Oligonukleotide (C) und (H) in $50\mu\text{L}$ Hybridisierungspuffer für 10 min auf 95°C erhitzt, auf die beschichtete Oberfläche pipettiert und 3h bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Immobilisierung der aminogekoppelten Oligonukleotide auf der Platte (IV) wurden 150pmol des entsprechenden Oligonukleotids in $50\mu\text{l}$ 1x PBS auf die Platte pipettiert und für 1h bei 37°C inkubiert. Die Platte wurde mit 100mM Tris, 0,9%(w/v) NaCl dreimal gewaschen und mit dieser Lösung für 30min zum Blocken inkubiert.

Auf die *Aldehyd-Slides* wurden pro *Spot* jeweils 1nl der aminomodifizierten Oligonukleotide in 3x SSC mit einem SciflexArrayer S5 (Scienion) gespottet. Der *Slide* wurde für 15min auf 75°C

erhitzt, für 5min in Block-Lösung (1g NaBH₄, 100ml Ethanol, 300ml 1x PBS) inkubiert und mit Aqua bidest viermal gewaschen.

Zur Überprüfung der Immobilisierung wurde das Oligonukleotid (G) verwendet. Dieses Oligonukleotid wurde im fünffachen Überschuss zur immobilisierten DNA in 36µl 1x Hybridisierungspuffer in die *Wells* bzw. auf den *Slide* gegeben. Die Oberflächen wurden mit 2x SSC+ 0,05% Tween20, 6x SSC, 2x SSC und 1x SSC gewaschen und bei 550nm angeregt und mit einem Kantenfilter ($\lambda > 575\text{nm}$) ausgelesen.

3.2.10 Konformation und Messung an der Oberfläche

Für eine RCA an der Oberfläche wurden die unter 3.2.7 angegebenen RCA-Ansätze (a) und (b) in die *Wells* pipettiert. Zum Entfernen der Phi29 Polymerase wurde der Überstand abgenommen und zweimal mit 50µl 2x SSC, 0,005% Tween20 und einmal mit 1x SSC gewaschen. In jedes *Well* wurden 36µl Aqua bidest gegeben und die Platten auf 70°C für 10min erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 36µl Konformationspuffer mit 50mM Hemin gegeben und 3h inkubiert. Vor der Messung wurde dreimal mit 50µl 100mM Tris (pH 8,0) + 0,9%(w/v) NaCl gewaschen und die Messung mit 50 µl ABTS- bzw. Luminolpuffer gestartet.

Bei den *Aldehyd-Slides* wurden die oben angegebenden Lösungen für die RCA und die Konformation verwendet. Jeweils 36µl der einzelnen Lösungen wurden auf einen achter Gasket-Slide (Agilent Technologies) gegeben. Durch die Gummiringe auf dem *Gasket-Slide* entstehen Kammern auf dem *Aldehyd-Slide*, welche durch eine spezielle Hybridisierungskammer (Agilent Technologies) fixiert werden. Zur Durchmischung mit einer im *Gasket* enthaltenden Luftblase wurde die Hybridisierungskammer während der RCA und der Konformation auf einen Rotor gespannt und bei der jeweiligen Temperatur inkubiert. Nach den Waschsritten wurden die *Slides* zum Trocknen 5min bei 300rpm zentrifugiert. Zur Messung der Peroxidaseaktivität wurden die *Gaskets* mit 50µl ABTS-Puffer gefüllt und für 10min zusammen mit dem *Aldehyd-Slide* in der Hybridisierungskammer inkubiert. Die durch die beiden *Slides* gebildeten Kammern wurden nach der Peroxidase-Reaktion zur Auswertung fotografiert. Der *Gasket-Slide* wurde jeweils mit Aqua bidest gewaschen, mittels Druckluft getrocknet und mehrfach verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 DNAzyme in Lösung

Die Parameter, die für die Konformation des DNAzyms in Lösung und den verwendeten Assay von Bedeutung sind, wurden optimiert. Dazu gehörten die Zusammensetzung des Mess- und Konformationspuffers, das Hemin-DNA-Verhältnis und die Dauer der Konformation. Dafür wurde hauptsächlich das Oligonukleotid (C) (siehe Tabelle 3.1), welches ein DNAzym in einer 79nt langen Sequenz enthält, verwendet.

4.1.1 Standardisierung der Daten

Tabelle 4.1: Rohdaten einer photometrischen Messung in ABTS-Puffer mit $0,5\mu\text{M}$ Oligonukleotid (C) im Messansatz, welches in einem $25\mu\text{M}$ Ansatz mit $50\mu\text{M}$ Hemin konformiert wurde. Die Kontrolle enthielt den Konformationspuffer ohne DNAzym aber mit der gleichen Menge Hemin.

	Replikat 1	Replikat 2	Replikat 3	Kontrolle1	Kontrolle 2	Kontrolle 3
E (t = 0 min)	0,136	0,139	0,136	0,077	0,073	0,075
E (t = 10 min)	0,982	1,042	1,007	0,098	0,093	0,095
$\frac{\Delta E}{\text{min}}$	0,0846	0,0903	0,0871	0,0021	0,0020	0,0020

Um die Vergleichbarkeit der Werte zwischen verschiedenen Versuchen und Platten gewährleisten zu können, wurden Messergebnisse gegen die Negativ- und die Positivkontrolle standardisiert. Tabelle 4.1 zeigt nicht verrechnete Ursprungsdaten aus der photometrischen Messung von $0,5\mu\text{M}$ konformiertem Oligonukleotid (C) (entspricht $25\mu\text{M}$ im Konformationsansatz). Der Mittelwert der drei Sekantenanstiege betrug hier $0,0873\frac{1}{\text{min}}$, welcher in diesem Fall gleichzeitig dem Wert der Positivkontrolle entspricht. Nach der Standardisierung ergab sich ein Signalwert von 1. Die standardisierte Nachweisgrenze betrug $0,0252$. Daraus ergibt sich als korrigierter Messwert $S = 0,975 \pm 0,0033$.

4.1.2 Optimierung der Messpuffer

Als erster Parameter wurde die Zusammensetzung der Messpuffer optimiert. Ausgehend von dem von Cheglakov et al. publizierten Luminolpuffer [13] wurde der verwendete Luminolpuffer optimiert. Um den Messbereich des Luminometers am besten nutzen zu können, wurde der Puffer um den Faktor 8 verdünnt eingesetzt.

Zur Optimierung des ABTS-Puffers sollte die Aktivität des DNAzyms und seine Affinität zum Substrat ABTS bestimmt werden. Dafür wurde eine Michaelis-Menten-Kinetik mit ABTS als Substrat in variabler Konzentration und dem Oligonukleotid (C) aufgenommen (siehe Abbildung 4.1). Eine analoge Messung mit H_2O_2 als Substrat ergab keine typische hyperbolische

4 Ergebnisse

Kurve und wurde nicht weiter untersucht. Aus einer nicht-linearen Regression für die Messwerte erhielt man $K_M = 0,352 \pm 0,0496 \mu\text{M}$, eine Enzymaktivität $A = 0.279 \pm 0,008 \frac{1}{\text{min} \cdot \mu\text{M}}$ und eine Wechselzahl von $k_{\text{cat}} = 0,63 \frac{1}{\text{s}}$. Diese Aktivität konnte auch durch eine Erhöhung der Wasserstoffperoxidkonzentration nicht weiter erhöht werden. Es handelt sich um das Maximalsignal, welches auch in keiner weiteren Messung überschritten wurde. Ein 4mM ABTS-Puffer mit einer Messzeit von 5min am besten geeignet, da er das Maximalsignal erzeugt und die Extinktionen nicht über den Wert 2 steigen, was keinem linearen Messbereich entspräche.

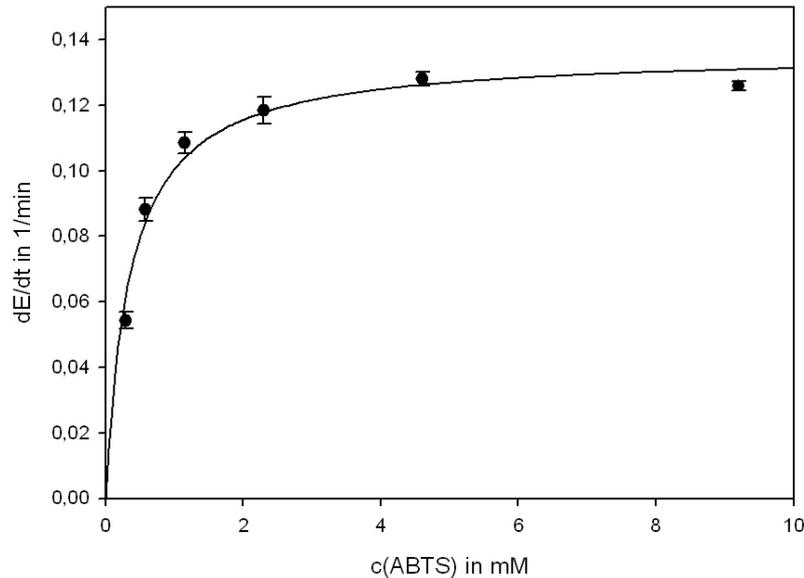


Abbildung 4.1: Michaelis-Menten-Diagramm, gemessen mit 0,03% H_2O_2 , $0,5 \mu\text{M}$ Oligonukleotid (C) im Messansatz, $\text{pH} = 5,0$ und $T = 298\text{K}$. Aus den Daten wurden mittels nicht-linearer Regression die Michaelis-Konstante und die Aktivität bestimmt. R^2 betrug dabei 0,978.

4.1.3 Untersuchung des Hintergrundsignals

Die zu Oligonukleotiden (A) und (C) komplementären Oligonukleotide wurden auf ihre Peroxidaseaktivität getestet. Beide zeigten kein Signal. Steigende Konzentrationen an Hemin haben ohne DNA ein steigendes Signal zur Folge. Dieser Effekt ist bei Luminolmessungen besonders stark ausgeprägt. Beispielsweise zeigte eine $0,375 \mu\text{M}$ Lösung von Oligonukleotid (C) ein Signal von $6.535.230 \frac{\text{counts}}{\text{s}}$ mit einem Hintergrund von $3.811.517 \frac{\text{counts}}{\text{s}}$ also 58% des Signals. Eine analoge Messung mit ABTS ergab einen Wert von $0,0871 \frac{1}{\text{min}}$ mit einem Hintergrundsignal von $0,0009 \frac{1}{\text{min}}$, also 1% des Signals. Aufgrund dessen wurden die meisten Messungen mit ABTS durchgeführt.

4.1.4 Heminbindung

Zur Bestimmung der optimalen Heminkonzentration und der besten Waschmethode für oberflächengekoppelte DNAzyme wurde eine Bindungskurve von Hemin an den gefalteten G-Quadruplex aufgenommen (siehe Abbildung 4.2). Dabei bindet ein Hemin-Molekül genau an ein Oligonukleotid. Aus der durch nicht-lineare Regression ermittelten Dissoziationskonstante von

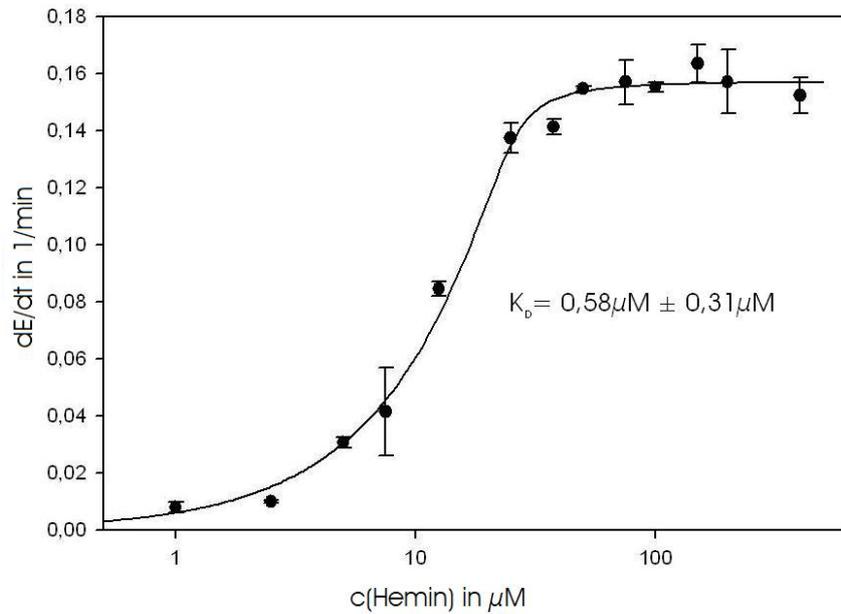


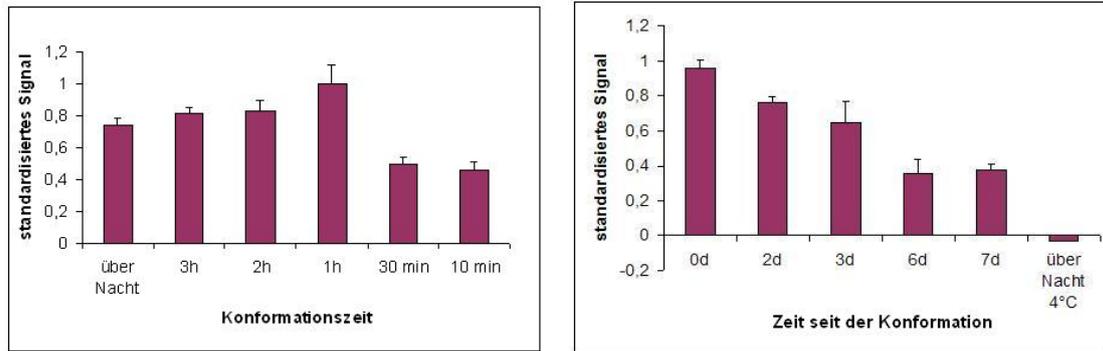
Abbildung 4.2: Bindungskurve von Hemin an den G-Quadruplex. $25\mu\text{M}$ Oligonukleotid (C) wurden mit $1\times$ Konformationspuffer und steigenden Heminkonzentrationen konformiert. Die Messungen wurden mit ABTS bei $T = 298\text{K}$ durchgeführt. Das Signal wurde um die Negativkontrolle korrigiert. Die Daten wurden nach Gleichung 3.2 nicht-linear angepasst. Es ergab sich ein R^2 von 0,997.

$K_D = 0,58 \pm 0,31\mu\text{M}$ lässt sich ableiten, dass die Bindung im Vergleich mit anderen biologischen Bindungen eher schwach ist. Die Waschschrte für oberflächengekoppelte DNAszyme müssen vorsichtig mit wenig Waschpuffer durchgeführt werden. Dabei muss auf Substanzen mit höherer Löslichkeit für Hemin wie DMSO verzichtet werden. Ein steigendes DNAszym-Hemin-Verhältnis führt zu einer Steigerung des Signals. Bei einer Steigerung der Heminkonzentration steigt aber auch das Hintergrundsignal. Als Kompromiss wurde in folgenden Versuchen die doppelte DNAszym-Konzentration an Hemin verwendet. Ab dieser Konzentration beginnt der Sättigungsbereich der Bindung. Höhere Konzentrationen an Hemin würden nur das Hintergrundsignal erhöhen.

4.1.5 Untersuchung der Konformation

Die Konformation stellt eine intrinsische Eigenschaft der DNAszym-Sequenz dar. Kalium und Hemin konnten als essentielle Komponenten der Konformation bestätigt werden, da ohne Zugabe von Kalium und Hemin reproduzierbar keine Signale gemessen werden konnten.

Die Ausbildung des DNAszyms ist bereits nach 1h Konformation vollständig abgeschlossen (siehe Abbildung 4.3(a)). Um ein reproduzierbares Signal zu erhalten wurde die Konformation immer für mindestens 2h durchgeführt. Das ausgebildete DNAszym behält über mindestens 1 Woche bei Raumtemperatur eine messbare Aktivität, welche stetig abnimmt (siehe Abbildung 4.3(b)). Nimmt man ein einfach exponentielles Modell für den Signalabfall an, erhält man eine Halbwertszeit von 5d, bei einem $R^2=0,97$ als Parameter für die Güte des Modells. Die Aufbewahrung bei 4°C führt hingegen schon nach einem Tag zu einem absoluten Verlust an enzymatischer Aktivität.



(a) Dauer der Konformation

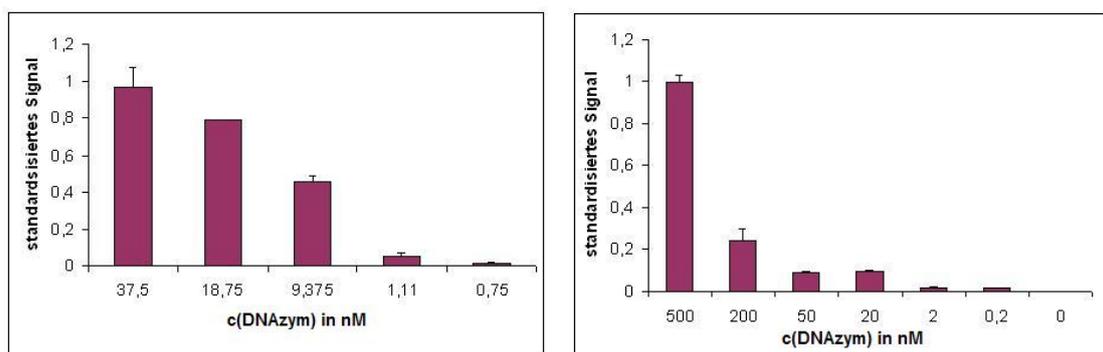
(b) Stabilität des konformierten Produkts

Abbildung 4.3: Zeitabhängigkeit der Konformation. $25\mu\text{M}$ Oligonukleotid (C) mit $50\mu\text{M}$ Hemin dienten als Probe. Die Aktivität wurde mit ABTS gemessen und über die Zeit beobachtet.

Die Konformation läuft bei 66°C mit gleicher Effizienz im Vergleich zur Raumtemperatur ab. Zudem ist die, der Konformation vorangehende, Erhitzung auf 94°C nicht notwendig für die Ausbildung des DNAzyms. Dieser Schritt wurde trotzdem beibehalten, um eine Ausbildung der G-Quadruplex-Struktur auf dem stark verknäuelten RCP zu begünstigen.

4.1.6 Untersuchung der Sensitivität

Die Sensitivität des Luminol- und des ABTS-Puffers wurde durch Verdünnungsreihen des DNAzyms untersucht. Beide Puffer zeigen nach Standardisierung in etwa die gleiche Sensitivität (siehe Abbildung 4.4). Konzentrationen von bis zu 1nM DNAzym zeigten Signale oberhalb der Nachweisgrenze. DNAzym-Konzentrationen größer als $50\mu\text{M}$ lieferten Signale, die der verwendete Luminometer nicht mehr messen konnte. Die Messung mit ABTS führte, wie aus der Aktivität des DNAzyms (siehe 4.1.2) ersichtlich ist, erst bei millimolaren Konzentrationen des DNAzyms zu Problemen mit dem photometrischen Messbereich.



(a) Luminol-Messung

(b) ABTS-Messung

Abbildung 4.4: Sensitivität der Messpuffer. Das Oligonukleotid (C) wurde in verschiedenen Konzentrationen mit der doppelten Heminkonzentration konformiert.

4.1.7 Optimierung des Abstands zwischen benachbarten DNAzymen

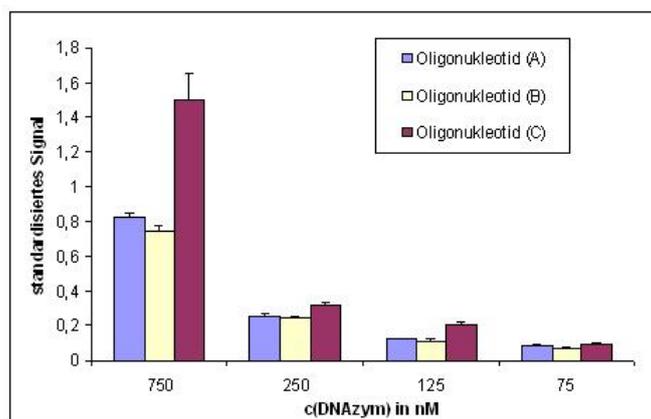


Abbildung 4.5: Vergleich der Oligonukleotide mit einem, zwei bzw. drei DNAzymen auf einer 79nt langen Sequenz. Die Konzentrationen wurden jeweils auf die theoretisch gleiche DNAzym-Konzentration eingestellt und mit der jeweils doppelten Konzentration an Hemin konformiert. Die Messung wurde photometrisch bei ABTS-Umsatz durchgeführt.

Zur Untersuchung der optimalen DNAzym-Dichte auf einem Strang wurden die drei Oligonukleotide (A), (B) und (C) mit drei, zwei und einer DNAzym-Sequenz in einem 79nt langen ssDNA-Molekül auf die Ausbildung der DNAzyme untersucht. Bei gleicher theoretischer DNAzym-Konzentration erzeugte das Oligonukleotid (C) das stärkste Signal (siehe Abbildung 4.5). Nicht alle DNAzyme in den Oligonukleotiden (A) und (B) mit mehreren DNAzym-Sequenzen haben sich ausgebildet. Bei dem Oligonukleotid (B) hat sich wahrscheinlich jeweils nur eines der beiden DNAzyme auf dem Strang ausgebildet, da die Signalintensität etwa halb so hoch wie die von Oligonukleotid (C) ist. Bei Oligonukleotid (A) tritt wiederum die halbe Signalintensität von Oligonukleotid (C) auf. Es bildeten sich wahrscheinlich teilweise zwei der drei möglichen DNAzyme aus. Dies lässt schließen, dass der Abstand zweier DNAzyme auf einem Strang größer als bei Oligonukleotid (B) (17nt) gewählt werden muss.

4.2 RCA in Lösung

4.2.1 Kontrollen der RCA

Für den RCA-Assay wurde die lineare Matrize (D) durch Hybridisierung beider Enden mit einem Hilfsoligonukleotid (E) zirkularisiert und ligiert. Mit einem Primer, der als Analyt diente und mit der zirkulären Matrize hybridisieren kann, wurde eine RCA-Reaktion durchgeführt. Durch das Auftrennen des Ligationsansatzes und seines Eduktgemisches im Acrylamidgel konnte zwischen zirkularisierter und nicht zirkularisierter Matrize unterschieden werden. Das zirkularisierte Produkt läuft langsamer im Gel, was durch die geringere Flexibilität und Mobilität eines DNA-Ringes gegenüber einer linearen DNA zu begründen ist (siehe Abbildung 4.6). Weitere Produkte sind durch Ligation zweier oder dreier Matrizen miteinander entstanden. Diese Concatemere konnten durch einen Exonukleaseverdau entfernt werden und lagen demnach nicht zirkularisiert vor.

4 Ergebnisse

Trennt man das *rolling circle product* (RCP) im Acrylamidgel auf, erkennt man oft eine intensive Bande bei einer Länge von 110-120nt, die sich mit steigender Reaktionsdauer nicht mehr verändert. Dabei könnte es sich um ein abgebrochenes RCA-Produkt handeln. Der Abbruch könnte durch die Ausbildung eines stabilen Hairpins oder eine spontane Faltung zu einem G-Quadruplex erklärt werden. Die Phi29 Polymerase wird in einem Puffer mit viel Kalium aufbewahrt. Durch Zugabe der Polymerase zum Amplifikationsansatz enthält auch dieser Kalium, was die Ausbildung von G-Quadruplexstrukturen ermöglichen kann. Eine geringe, über dem Hintergrund liegende Peroxidaseaktivität kann nach Zugabe von Hemin ohne Konformationspuffer zum RCA-Ansatz beobachtet werden. Die Abbruchbande tritt trotz gleicher RCA-Ansätze nicht immer auf.

Nach etwa 20min Reaktionsdauer ist zusätzlich in den Taschen des Gels eine hohe DNA-Menge zu detektieren. Dabei handelt es sich um das RCP, welches so groß ist, dass es nicht mehr in die Poren des Gels eindringen kann. Demnach läuft die RCA-Reaktion mit der DNazym-Matrize ab.

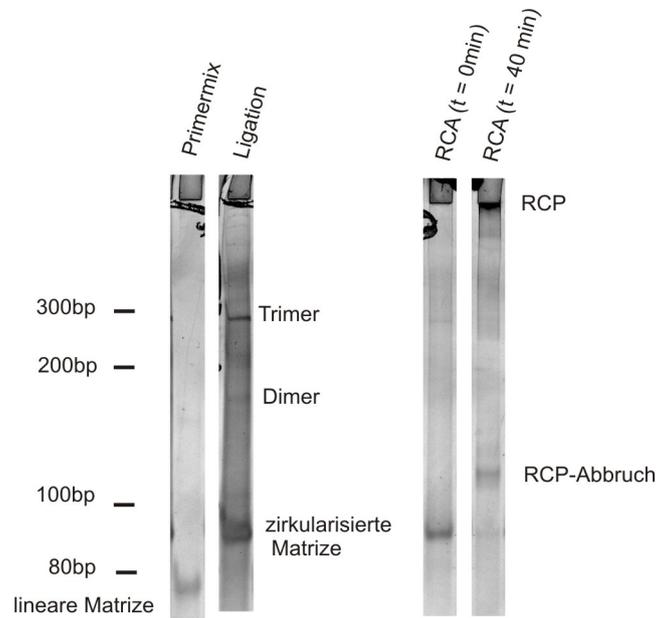


Abbildung 4.6: Elektrophoretische Analyse der RCA. In einem 7%igen Acrylamidgel wurden die lineare und die zirkularisierte Matrize sowie das RCP analysiert. Das Gel wurde mit SYBR-Green I gefärbt. Das Bandenmuster in der Bahn RCA ($t=0$) entspricht dem eines aufgetrennten Produkts eines Exonuklease VII-Verdaus.

Als zusätzlicher Beleg für den Ablauf der RCA-Reaktion dient die Inkorporation von Biotin-dUTP in das RCA-Produkt. Der Einbau des modifizierten Nukleotids wurde mit Hilfe eines Dot-Blots, der mit Streptavidin-Cy3 gefärbt wurde, analysiert. Es ist ein deutlicher Signalanstieg am Ende der RCA zu erkennen. Dem hingegen zeigen die Kontrollen ein sehr geringes Signal (siehe Abbildung 4.7).

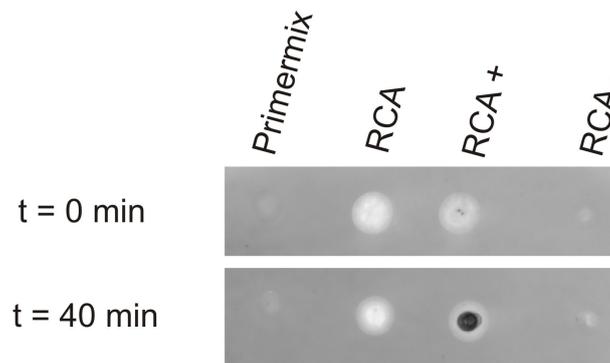


Abbildung 4.7: Dot-Blot der RCA-Ansätze. Die Proben wurden mit UV-Licht an die Nitrocellulosemembran quervernetzt und mit Streptavidin-Cy3 gefärbt. Primermix: Gemisch der linearen Matrize (D) und des Hilfsoligonukleotids (E) der Ligation; RCA: vollständiger RCA-Ansatz; RCA+: Positivkontrolle der RCA, in welche Biotin-dUTP inkorporiert wurde; RCA-: Ansatz ohne Phi29 Polymerase

4.2.2 Optimierung der RCA

Zur Optimierung der gemessenen Peroxidase-Aktivität wurde das Konzentrationsverhältnis zwischen Phi29 Polymerase und Matrize und die Amplifikationszeit untersucht. Mit der Positivkontrolle der Konformation ($25\mu\text{M}$ konformiertes Oligonukleotid (C)) vergleichbare Signale der Enzymaktivität zeigten sich erst bei einem Verhältnis von $2,25\text{pmol}$ (15U) Polymerase : $2,5\text{pmol}$ Matrize (siehe Abbildung 4.8(a)) nach 20 min.

Die Enzymaktivität steigt mit der Dauer der RCA an (siehe Abbildung 4.8(b)), bleibt ab etwa 40min beim oben angebenenden Konzentrationsverhältnis zwischen Polymerase und Matrize stabil. Entweder erfolgt ein Abbruch der Synthese des RCPs, eine sterische Hinderung der neu erzeugten DNAsyme oder die Hemin- bzw. Kaliumkonzentrationen ist für die Ausbildung weiterer DNAsyme zu gering.

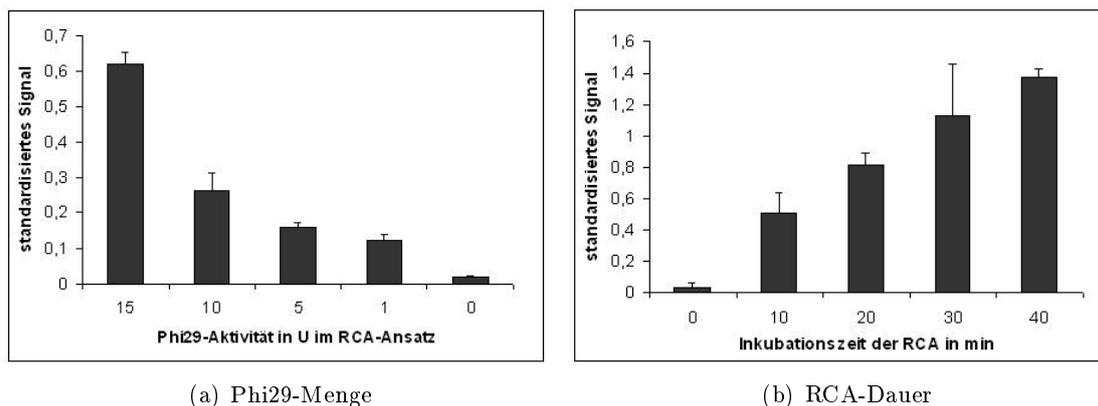


Abbildung 4.8: Signale der RCA in Lösung. Die Ansätze enthielten jeweils $2,5\text{pmol}$ Matrize in einem Gesamtvolumen von $50\mu\text{l}$. Sie wurden mit $5\mu\text{M}$ Hemin konformiert. Die Messung erfolgte mit einem ABTS-Puffer (nach Tian et al. [14]). (a) Die Ansätze wurden nach 20min Reaktion inaktiviert. (b) Die Ansätze enthielten jeweils 15U Phi29 Polymerase.

4.3 Immobilisierte DNAzyme

Tabelle 4.2: Ergebnisse der verschiedenen Immobilisierungsvarianten. (I) 96-Well-Assay-plate (Corning); (II) High-bind-plate (Greiner); 96-Well-Microplate (Nunc); (IV) DNA-bind-plate (Corning); (V) Aldehyd-Slides (CEL); a: Erfolg der Oberflächen-Behandlung; b: Erfolg der Immobilisierung der DNA; c: Peroxidaseaktivität eines immobilisierten DNAzyms; c: Nachweisbarkeit eines RCP; NA: nicht bestimmt, +++: sehr erfolgreich; + erfolgreich, -: nicht nachweisbar

Platte	Oberflächen-Beschichtung	immobilisierte DNA	a	b	c	d
(I)	Neutravidin	biotingekoppelt	+	+	-	-
(II)	Neutravidin	biotingekoppelt	+	+	-	-
(III)	Neutravidin	biotingekoppelt	+	+	-	-
(III)	Biotin-BSA/Neutravidin	biotingekoppelt	+++	NA	-	-
(III)	Biotin-BSA/Neutravidin	Hybridisierung	+++	+++	+++	-
(IV)	NOS	aminogekoppelt	NA	NA	-	-
(V)	aldehydbeschichtet	aminogekoppelt	NA	+++	-	+

Es wurde untersucht, ob ein immobilisiertes DNAzym an der Oberfläche Peroxidase-Aktivität zeigt. Verschiedene Oberflächenbeschichtungen und Linkerlängen zur Oberfläche wurden getestet. Dafür wurden Oberflächen mit Neutravidin bzw. Streptavidin beschichtet bzw. kommerziell erhältliche, aminogruppenbindende Oberflächen verwendet (siehe Tabelle 4.2). Bei Luminolmessungen war der Hintergrund bei Proteinbeschichtungen besonders hoch, weshalb auf Luminolmessungen bei den Plattenversuchen verzichtet wurde. Eine direkte Immobilisierung des Oligonukleotids (C) an oberflächengekoppeltes Streptavidin oder aminobindende Oberflächen zeigte keine Enzymaktivität. Auch veränderte Linkerlängen führten zu keinem Signal. Die Immobilisierung des biotinmodifizierten Oligonukleotids (C) an adsorbiertes Streptavidin konnte nicht nachgewiesen werden. Nur die Bindung des biottingekoppelten Oligonukleotids (C) an die Doppelbeschichtung aus BSA-Biotin-Konjugat und Neutravidin konnte durch Hybridisierung mit dem fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid (G) an die DNAzym-Sequenz nachgewiesen werden. Dieser Aufbau ist nicht thermostabil (siehe Abbildung 4.9). Ein Erhitzen auf 70°C löst die Beschichtung ab, was durch die Denaturierung der Proteine zu erklären ist. Dabei kommt es bereits nach 10min zur vollständigen Ablösung des biotinmodifizierten Oligonukleotids (C). Deshalb wurde in diesem Fall auf das Erhitzen des Ansatzes vor der Konformation verzichtet. An der doppelt mit Protein beschichteten Oberfläche konnte die Bindung von biotinmodifiziertem Oligonukleotid (C) gezeigt werden. Bei direkter Bindung des DNAzym tragenden Oligonukleotids an die Oberfläche wurde aber keine Enzymaktivität oberhalb der Nachweisgrenze gemessen. Erst ein Hybridisierungsassay, bei dem die DNAzym tragende Sequenz (C) an eine immobilisierte DNA (H) hybridisiert wurde, zeigte ein deutliches Signal (siehe Abbildung 4.10). Dazu wurde das Analytenoligonukleotid (H) an das Neutravidin gebunden und dann mit dem Oligonukleotid (C) hybridisiert.

4 Ergebnisse

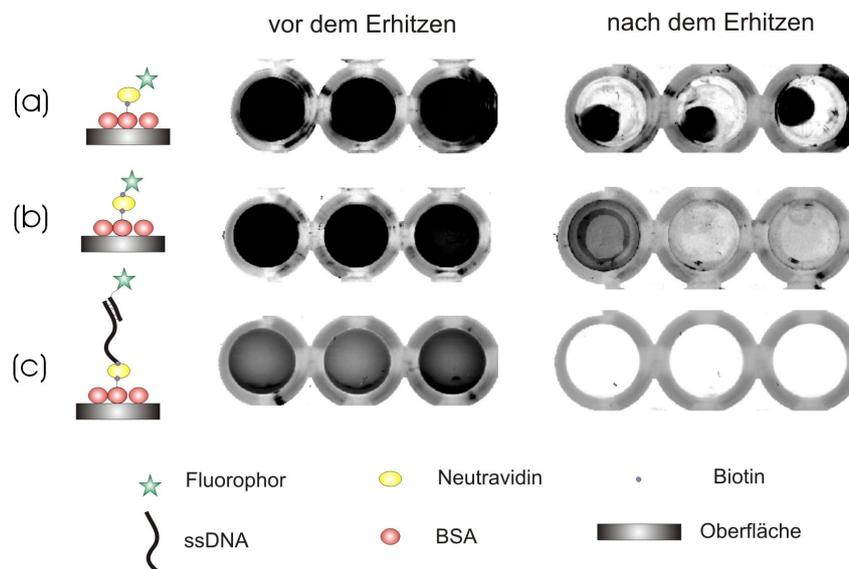


Abbildung 4.9: Überprüfung der Oberflächenbeschichtung. Jede Schicht der Oberflächenbeschichtung wurde einzeln auf ihren Erfolg und ihre Thermostabilität getestet. Dazu wurden die *Wells* jeweils mit einem speziellen Fluorophorkonjugat für 1h inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde die Anwesenheit des Fluorophorkonjugats überprüft. Die Platte wurde für 10min auf 70°C erhitzt, gewaschen und erneut mit dem jeweiligen Fluorophorkonjugat inkubiert. Die Abbildung zeigt das Fluoreszenzsignal in je drei Replikaten. (a) Test der Adsorption des BSA-Biotin-Konjugats mit einem Streptavidin-Cy3-Konjugat (b) Test der Bindung von Neutravidin an das BSA-Biotin-Konjugat mit einem Biotin-Fluorescein-Konjugat (c) Test der Immobilisierung von biotinmodifiziertem Oligonukleotid (C) mit dem Alexa532-gekoppelten Oligonukleotid (G)

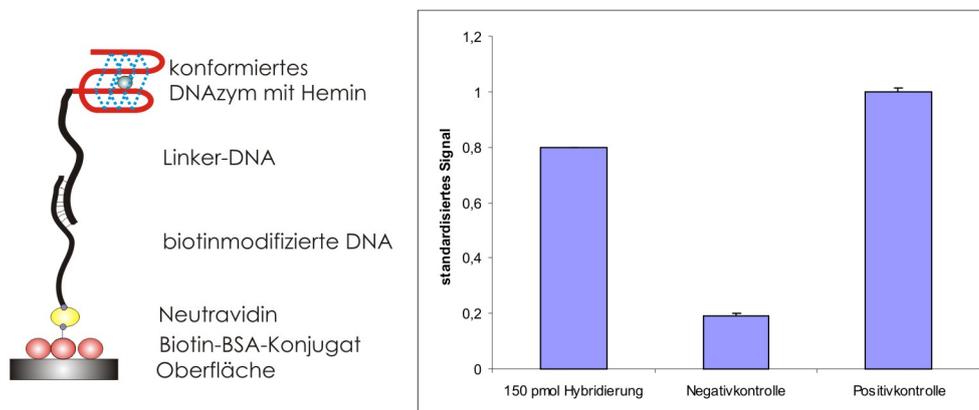


Abbildung 4.10: Schema des Hybridisierungsassays. An eine Platte, die mit einer Kombination von Proteinen beschichtet ist, wurden 150pmol Oligonukleotid (H), der eine Biotinmodifikation trägt, gebunden und 150pmol Oligonukleotid (C) daran hybridisiert. Dieser Ansatz wurde mit 300pmol Hemin ohne Hitzeschritt konformiert und mit ABTS gemessen. Als Negativkontrolle wurde ein analoger Ansatz ohne Oligonukleotid (C) gemessen. Als Positivkontrolle dienten 0,5µM des konformierten Oligonukleotids (C) im Messansatz.

Die erfolgreiche Immobilisierung des aminogekoppelten Oligonukleotids (C) an einer *Aldehyd-Slide* konnte mit Oligonukleotid (G) nachgewiesen werden. Eine enzymatische Aktivität dieses Oligonukleotids konnte aber nicht beobachtet werden. Auch die Bindung an eine NOS-beschichtete Oberfläche hatte kein Signal zur Folge.

4.4 RCA-Assay an der Oberfläche

Der vollständige Assay bestehend aus Oberflächenkopplung, RCA, Konformation und Substratumsatz war an keiner Oberfläche erfolgreich. In vielen Fällen zeigte die Negativkontrolle sogar höhere Signale als die Probe. Nur bei den auf die Aldehydoberfläche gespotteten Analyten-Matrizen-Komplexen konnte mit dem fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid (G), welcher an die DNAzym-Sequenz hybridisiert, die Ausbildung eines RCP gezeigt werden. Die Fluoreszenzintensität war dabei aber gering. Das intensivste Fluoreszenzsignal war auf Stellen zu sehen, die mit $0,1\mu\text{M}$ Matrize bespottet wurden. Höhere und niedrigere Mengen führten zu verminderten Fluoreszenzsignalen.

5 Diskussion

5.1 Ausleseprinzipien

Der Vergleich des ABTS-Puffers mit dem Luminolpuffer zeigt deutliche Vorteile des ABTS-Puffers. Der Literatur folgend [16] sollten Chemolumineszenz-Assays wesentlich sensitiver sein als photometrische Assays. Aufgrund von hohen Hintergrundsignalen bei den Luminolmessungen war die Sensitivität mit dem Luminolpuffer eher gering und vergleichbar mit der Sensitivität der ABTS-Messung (siehe 4.1.6). Der Hintergrund kann durch die relative Instabilität des Luminols gegenüber Sauerstoff erklärt werden. Hemin kann zudem Sauerstoff binden, was das Hintergrundsignal besonders verstärkt. Durch das injektionsbasierte Messprinzip war es nicht zu verhindern, dass Sauerstoff in den Messansatz gelangt. Der Messbereich des Luminometers war nach oben hin eingeschränkt, was, in Kombination mit der Sensitivität, zu einem Messbereich für das DNAzym von 1-50nM führte. Mit ABTS können hingegen DNAzym-Konzentrationen von 1-1000nM gemessen werden.

5.2 Eigenschaften des verwendeten DNAzyms

Das Oligonukleotid (C), welches eine DNAzym-Sequenz mit flankierenden Regionen besitzt, zeigte in Experimenten, dass die enzymatische Aktivität eine intrinsische Eigenschaft des DNAzyms ist. Kalium und Hemin sind essentielle Komponenten für die Ausbildung des DNAzyms bzw. für die katalytische Aktivität. Zur Bestimmung der Bindungsparameter zwischen dem Hemin und der DNA wurde eine Bindungsisotherme aufgenommen (siehe Abbildung 4.2). Zur Berechnung der Dissoziationskonstante wurde von einem einfachen Bindungsmodell ausgegangen, dass von einer vollständigen Faltung des DNAzyms und einer nachfolgenden Bindung des Hemins ausgeht (siehe 3.2.5). Sollte diese Annahme nicht zutreffen, ist die tatsächliche Dissoziationskonstante wahrscheinlich größer. Der für die Dissoziationskonstante ermittelte Wert ($K_D = 0,58 \pm 0,31 \mu\text{M}$, $T = 298\text{K}$) liegt im Bereich anderer DNAzyme mit ähnlicher Sequenz, aber um den Faktor 20 über dem DNAzym mit der stärksten Bindung [10]. Die Sequenz dieses publizierten DNAzyms (PS2.M) unterscheidet sich nur durch das Fehlen flankierender Regionen von der in dieser Arbeit eingesetzten DNAzym-Sequenz. Von Chinnapen und Sen [17] wurde bereits gezeigt, dass diese flankierenden Regionen einen Einfluss auf die Heminbindung haben. Der Einfluss wurde auch beim Vergleich der Oligonukleotide (A), (B), (C) mit drei, zwei bzw. einer DNAzym-Sequenz beobachtet. Die Signalintensität deutet darauf hin, dass sich bei dem Oligonukleotid (C) mit einer DNAzym-Sequenz auf einem Strang ein Großteil der DNAzyme ausbildet, während es auf dem Strang mit zwei DNAzym-Sequenzen nur zur Ausbildung der Hälfte der DNAzyme kommt (siehe Abbildung 4.5). Ein Grund dafür könnte sterische Hinderung sein. Weiter könnte sich aus zwei DNAzym-Sequenzen auf einem Strang durch Interaktion beider Sequenzen nur ein G-Quadruplex ausgebildet haben. Das Oligonukleotid (A) mit drei DNAzymen auf dem Strang ergab das halbe Signal des Oligonukleotids (C). Es müssen sich zum Teil

zwei und teilweise nur ein DNAzym ausgebildet haben. In diesem DNAzym liegen die beiden äußeren DNAzym-Sequenzen weiter voneinander entfernt und sind geringen sterischen Effekten ausgesetzt. Demnach kann als minimal nötiger Abstand zwischen zwei DNAzymen auf einem Strang 25nt angenommen werden, was dem Abstand der beiden außen liegenden DNAzymen auf Oligonukleotid (A) entspricht. Um diese Schlussfolgerung zu bestätigen, müssten mehr Abstände getestet werden. Im RCP betrug der direkte Abstand zweier DNAzyme 62nt. Durch die Länge und Verknäulung des RCPs sind aber Interaktionen zwischen weiter auseinanderliegenden Regionen des Polynukleotids wahrscheinlich.

Das Oligonukleotid (C) zeigt mit dem Substrat ABTS eine typische Michaelis-Menten-Kinetik (siehe Abbildung 4.1). Die ermittelte Michaelis-Konstante liegt mit $K_M = 0,352 \pm 0,0496\text{mM}$ ($T = 298\text{K}$, $\text{pH } 5,0$) nahe dem der Meerrettich-Peroxidase ($K_M = 0,27\text{mM}$) [18]. Die Wechselzahl ist mit einem Wert von $0,63 \frac{1}{\text{s}}$ weit unter der des Enzyms ($810 \frac{1}{\text{s}}$), was auch eine wesentlich geringere Effizienz des DNAzyms zur Folge hat. Die Stabilität des DNAzyms bei Raumtemperatur ist auch schlechter als die der Meerrettich-Peroxidase [19]. Das Protein ist zudem bei Kühlschranktemperatur über mehrere Jahre stabil, während das DNAzym innerhalb weniger Stunden bei 4°C seine Aktivität verliert.

Der Vergleich der Eigenschaften zeigt, dass Meerrettich-Peroxidase in Bezug auf Stabilität und Aktivität deutlich besser ist als das verwendete DNAzym. Der Vorteil des DNAzyms ist, dass die spezifischen Bindungen zu Analytenmolekülen leichter z.B. über Hybridisierung herzustellen sind. Des Weiteren ist eine Verstärkung durch Amplifikation des DNAzyms in einem Assay möglich und das DNAzym ist wesentlich kostengünstiger.

5.3 RCA in Lösung

Die Amplifikation der DNAzym-Sequenz durch die RCA war erfolgreich. Es zeigte sich im Acrylamidgel neben dem RCP oft eine zusätzliche Bande, die wahrscheinlich ein Abbruchprodukt ist (siehe Abbildung 4.6). Die Entstehung eines solchen Produktes kann mit der DNAzym-Sequenz zusammenhängen. Die Bedingungen der RCA unterscheiden sich bezüglich der Pufferzusammensetzung und der Temperatur nur wenig von denen der Konformation. Während der RCA-Reaktion könnten bereits G-Quadruplex-Strukturen entstehen, die Phi29 Polymerase behindern und zu einem Abbruch führen. Da sich in mehreren Wiederholungen der RCA oft die gleiche Bande bei einer Länge von etwa 120nt zeigte, ist davon auszugehen, dass der Abbruch favorisiert nach dem ersten Umlauf der Polymerase um die Matrize erfolgt. Diese Bande könnte aber auch ein Artefakt sein, da sie nicht immer auftrat, trotz identischer Versuchsbedingungen.

Das RCP zeigte nach der Konformation eine gut messbare, katalytische Aktivität, die mit der Inkubationzeit ansteigt (siehe Abbildung 4.8(b)). Der Anstieg der Aktivität erklärt sich aus der Zunahme der DNAzym-Menge im RCP. Es kommt nach 40min zu keinem weiteren Anstieg des Signals. Das Plateau ist wahrscheinlich mit einem Abbruch der RCA oder fehlendem Hemin bzw. Kalium zu begründen. Es könnte auch durch inter- und intramolekulare Interaktion der Stränge zu einer Behinderung der Konformation kommen.

Die Prozessivität der Polymerase beträgt $50 \frac{\text{nt}}{\text{s}}$ [20]. Unter optimalen Bedingungen bedeutet dies, dass 15U (2,25pmol) Polymerase in 30min maximal 0,2mmol Nukleotide verknüpfen.

Bei einer 79nt langen Matrize mit einem DNAzym entspricht dies $2,6\mu\text{mol}$ DNAzym im RCP nach der RCA. Die erhaltenden Signale der Peroxidaseaktivität des RCP entspricht DNAzym-Konzentrationen im nanomolaren Bereich. Eine Vielzahl von Gründen könnte diese Diskrepanz erklären: Es gab sicher keine 100%ige Ligationseffizienz. Die Ausbildung von Quadruplexstrukturen könnte zu einem frühzeitigen Abbruch der RCA führen. Auch könnte die Konformation nicht bei allen DNAzym-Sequenzen abgelaufen sein. Es könnte nicht genügend Hemin für die große Menge an potenziellem DNAzym vorhanden sein. Zu hohe Hemin-Konzentrationen würden das Hintergrundsignal dramatisch steigen lassen. Wahrscheinlich kann sich aufgrund gegenseitiger Behinderung auch nur ein Bruchteil der vorhandenen DNAzym-Sequenzen konformieren.

Prinzipiell sind die Ergebnisse und beobachteten Effekte der Lösungsversuche der RCA mit dem von Tian et al. publizierten Assay vergleichbar [14].

5.4 Oberflächenkopplung

Die Oberflächenkopplung des Oligonukleotids (C) führte nur im Fall einer Hybridisierung des Oligonukleotids mit dem an die Oberfläche gekoppelten Primer (H) zu einer messbaren katalytischen Aktivität. Die Immobilisierung des biotinkoppelten Oligonukleotid (C) an die Oberfläche aus adsorbierten Streptavidin bzw. Neutravidin führte zu einer kaum messbaren Bindung. Die Erklärung dafür könnte sein, dass die Proteine ihre Struktur während der Adsorption verändern und somit die Biotin-Bindung schlechter funktioniert. Dieses Problem wurde durch eine zweilagige Immobilisierung gelöst. Biotinkoppeltes BSA wurde an die Oberfläche adsorbiert und Neutravidin daran gebunden. Freie Bindestellen des Neutravidins standen dann für die Bindung eines biotinkoppelten Oligonukleotids zur Verfügung. Die Funktionalität dieses Aufbaus wurde nachgewiesen (siehe Abbildung 4.9). Bei 70°C verliert diese Beschichtung allerdings ihre Oberflächenanhaftung. Dies kann durch die Denaturierung der Proteine erklärt werden. Demnach ist ein Erhitzungsschritt im Assay nicht möglich.

5.5 DNAzym-Aktivität an der Oberfläche

Die direkte Kopplung des Oligonukleotids (C) führte zu keiner messbaren Aktivität. Die Konformation könnte vielleicht an der Oberfläche sterisch gehindert sein. Das Hemin könnte heraus gewaschen worden sein. Nur eine Hybridisierung des DNAzym tragenden Oligonukleotids an eine an der Oberfläche gekoppelte Nukleinsäure führte zu einer messbaren Aktivität (siehe Abbildung 4.10). Der durch die Hybridisierung erhöhte Abstand zur Oberfläche könnte erklären, weshalb es zu der Ausbildung des DNAzyms kommen kann. Ein doppelsträngiger Bereich könnte durch Einschränkung der Flexibilität des Oligonukleotids eine Faltung begünstigen. Bei der Kopplung von aminomodifizierten Oligonukleotiden an NOS- bzw. Aldehydoberfläche konnte in keinem Fall eine katalytische Aktivität nachgewiesen werden. Die Begründung dafür könnte sein, dass die Purinbasen Guanin und Adenin primäre Aminogruppen besitzen und diese auch an die Oberfläche binden können. Die guaninreiche DNAzym-Region stellt damit einen besonders aktiven Partner für die Oberfläche da.

5.6 RCA-Assay an der Oberfläche

Die DNA lässt sich an die Oberfläche immobilisieren und die RCA erfolgt mit dem immobilisierten Oligonukleotid. Dies konnte durch ein an die DNAzym-Sequenz bindendes, fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid gezeigt werden. Das Fluoreszenzsignal dieses Oligonukleotids war allerdings sehr gering, was entweder mit wenig bzw. nur kurzem RCP oder wenigen freizugänglichen Hybridisierungsstellen zu erklären ist. Solche Effekte wurden auch in anderen nicht publizierten Versuchen der Arbeitsgruppe beobachtet. Die gleichen Gründe können die mangelnde Enzymaktivität erklären. Das RCA-Produkt könnte auf Grund der hohen Dichte an DNA-Molekülen nicht konformieren oder es ist zu wenig RCP entstanden. Die Oberflächendichte der Matrize ist ein allgemeines Problem. Bei zu hoher Oberflächendichte kann die Polymerase die Matrizen nicht optimal erreichen oder die verschiedenen Produkte stören sich gegenseitig bei ihrer Synthese. Eine zu geringe Dichte führt zu einem geringen Signal. Das Optimum muss für jede Oberfläche neu gefunden werden. Durch eine Verdünnung der Matrize konnte gezeigt werden, dass mehr freizugängliche DNAzym-Sequenzen entstehen, was an einem erhöhten Fluoreszenzsignal bei Hybridisierung mit dem Oligonukleotid (G) zu erkennen war. Das gebundene Hemin könnte während der Waschschriffe, die nicht gebundenes Hemin entfernen sollten, herausgewaschen worden sein. Durch die dichte Packung des RCPs konnten sich vielleicht die Quadruplex-Strukturen nicht ausbilden oder das Hemin konnte diese nicht erreichen. Das gleiche Problem könnte auch für das Substrat ABTS aufgetreten sein.

5.7 Ausblick

In zukünftigen Experimenten muss geklärt werden, ob die Konformation eines RCP an der Oberfläche möglich ist. Dazu könnte ein in Lösung gewonnenes RCP an die Oberfläche gekoppelt werden und dort konformiert werden. Weiter muss überprüft werden, ob das Hemin an die Quadruplexstruktur gebunden bleibt. Das Hemin könnte dafür beispielsweise fluoreszenz- oder radioaktiv markiert werden. Zudem sollten weitere Peroxidase-Substrate auf ihre Sensitivität und ihr Signal-Rausch-Verhältnis beim Umsatz mit einem DNAzym untersucht werden. Der Assay könnte nach seiner Optimierung als alternative Methode zur Auslesung von Microarrays genutzt werden. Die Amplifikation durch die enzymatische Reaktion und die Vervielfältigung des DNAzyms durch die RCA könnte eine höhere Sensitivität als in gängigen Assays erreichen.

Literaturverzeichnis

- [1] C. Guerrier-Takada, K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, and S. Altmann. The rna moiety of ribonuclease p is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*, 35:849–857, 1983.
- [2] K. Kruger, P.J. Grabowski, A.J. Zaug, J. Sauds, D.E. Gottschling, and T.R. Cech. Self-splicing rna: autoexcision and autocyclisation of the ribosomal rna intervening sequence of tetrahymena. *Cell*, 31:147–157, 1982.
- [3] A.D. Ellington and J.W. Szostak. Selection in-vitro of single-stranded dna molecules that fold into specific ligand-binding structures. *Nature*, 355:850–852, 1992. doi: 10.1038/355850a0.
- [4] G.E. Lienhard. Enzymatic catalysis and transition-state theory. *Science*, 180(82):149–154, 1973.
- [5] Y. Li and R.R. Breaker. Deoxyribozymes: new players in the ancient game of biocatalysis. *Curr Opin Struct Biol.*, 9(315-323), 1999.
- [6] I. Willner, B. Shlyahovsky, M. Zayats, and B. Willner. Dnazymes for sensing, nanobiotechnology and logic gate applications. *Chem Soc Rev.*, 37(6):1153–1165, 2008.
- [7] Y. Li and D. Sen. A catalytic dna for porphyrin metallation. *Nat Struct Biol*, 3(9):743–747, 1997.
- [8] Y. Li and D. Sen. Toward an efficient dnazyme. *Biochemistry*, 36:5589–5599, 1997.
- [9] T. Li, B Li., and S. Dong. Aptamer-based label-free method for hemin recognition and dna assay by capillary electrophoresis with chemiluminescence detection. *Anal Bioanal Chem*, (389):887–893, 2007.
- [10] P. Travascio, A.J. Bennet, D.Y. Wang, and D. Sen. A ribozyme and a catalytic dna with peroxidase activity: active sites versus cofactor-binding sites. *Chemistry and Biology*, 6(11): 779–787(9), 1999.
- [11] W. Gilbert and D. Dressler. Dna replication: The rolling circle model. In *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, volume 33, pages 473–484, 1968.
- [12] Z. Cheglakov, Y. Weizmann, B. Basnar, and I. Willner. Diagnosing viruses by the rolling circle amplified synthesis of dnazymes. *Org. Biomol. Chem.*, 5:223–225, 2007.
- [13] Z. Cheglakov, Y. Weizmann, M.K. Beissenhirtz, and I. Willner. Ultrasensitiv detection of dna by the pcr-induced generation of dnazymes: The dnazyme primer approach. *ChemComm*, pages 3205–3207, 2006.
- [14] Y. Tian, Y. He, and C. Mao. Cascade signal amplification for dna detection. *ChemBioChem*, (7):1862–1864, 2006.

- [15] F.-B. Wu, Y.-F. He, and S.-Q. Han. Matrix interference in serum total thyroxin (t4) time-resolved fluorescence immunoassay (trfia) and its elimination with the use of streptavidin-biotin separation technique. *Clinica Chimica Acta*, 308:117–126, 2001.
- [16] F. Lottspeich and J.W. Engels, editors. *Bioanalytik*. Spektrum, 2 edition, 2006.
- [17] D.J.F. Chinnapen and D. Sen. Hemin-stimulated docking of cytochrome c to a hemin-dna aptamer complex. *Biochemistry*, 41(16):5202–5211, 2002.
- [18] J.K. Kamal and D.V. Behere. Activity, stability and conformational flexibility of seed coat soybean peroxidase. *J Inorg Biochem.*, 94(3):236–242, 2003.
- [19] http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Biochemicals/Enzyme_Explorer/Analytical_Enzymes/Peroxidase_Enzymes.html#Technical.
- [20] G. Nallur, C. Luo, L. Fang, S. Cooley, V. Dave, J. Lambert, K. Kukanskis, S. Kingsmore, R. Lasken, and B. Schweitzer. Signal amplification by rolling circle amplification on dna microarrays. *Nucleic Acids Res.*, 29(23):E118, 2001.

Danksagung

Ich möchte mich vor allem bei Daniela Köster für die gute Zusammenarbeit, die viele Hilfe und für das große Verständnis bedanken. Weiter möchte ich mich bei Dr. Harald Seitz für das Einbringen immer neuer Aspekte in das Projekt bedanken. Mein Dank gilt auch beiden für die unzähligen Arbeitsmethoden und Techniken, die sie mir beigebracht haben.

Vielen Dank.