

Abschlussbericht

Entwicklung von Aptamer-Sensoren zur *in situ* Detektion der VEGF-Freisetzung in 3D Zellkultursystemen

1. Motivation und Ziele

Das Ziel dieses Projekts war die Entwicklung von Aptamer-basierten optischen Sensoren (Aptasensoren), die in Hydrogel-basierte Zellkultursysteme integriert werden können. Bis dato sind die Möglichkeiten für *in situ* Zellaktivitätsanalysen, insbesondere auf Proteinebene, sehr begrenzt. Für viele Fragestellungen ist es aber von enormer Wichtigkeit die Proteinproduktion und -freisetzung direkt in der Zellkultur bestimmen zu können. Konventionelle Methoden, wie die Immunocytochemie, sind allein für Endpunkt-Bestimmungen einsetzbar und andere Methoden wie Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) erlauben es, Proteine nur in Zelllysaten oder Zellkulturüberstände „off-line“ zu bestimmen. Darüber hinaus stellen 3D Zellkultursysteme wie Hydrogele gewisse Diffusionsbarrieren dar, die die genaue Bestimmung von Proteinen im Zellkulturüberstand limitieren. Da aber 3D Zellkultivierungssysteme als „Brücke“ zwischen Monolayer-2D Kultivierungen und *in vivo* Bedingungen immer mehr an Bedeutung gewinnen, ist die Entwicklung von neuen Analyseverfahren notwendig. Das Ziel dieses Projekts ist die Herstellung von Aptamer-basierten Sensoren, die in die 3D Zellkultur eingebettet werden können und bei der Freisetzung von VEGF durch die Zellen ein konzentrationsabhängiges Fluoreszenzsignal erzeugen.

2. Durchführung und Ergebnisse

Aptamere sind kurze synthetische einzelsträngige Oligonukleotide, die über ihre sekundäre und tertiäre Strukturen spezifisch Zuckermoleküle, Peptide, Proteine und Zellen binden können. Ein Fluoreszenz-Aptasensor beruht auf dem Aptamer und einer zur Targetbindestelle des Aptamers komplementären Oligonukleotidsequenz. In Abwesenheit des Targetproteins hybridisiert das Oligonukleotid, welches mit einem Quencher modifiziert ist, mit dem Aptamer, welches mit einem Fluorophor gekoppelt ist. Dabei kommt es durch geeignete Positionierung von Fluorophor und Quencher zu einer Fluoreszenzauslöschung. In Anwesenheit des Targetproteins (VEGF) verdrängt dieses das komplementäre Oligonukleotid vom Aptamer, wodurch ein Fluoreszenzsignal generiert wird (Abbildung1).

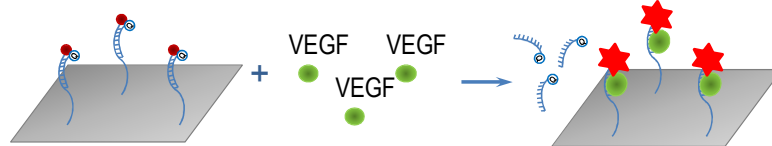


Abbildung 1. Schematische Darstellung des Detektionsmechanismus

Entwicklung des TIDs Mechanismus in der Lösung.

In dem ersten Schritt der Arbeit wurden die Affinität zwischen Aptamer und VEGF, sowie die Affinität zwischen Aptamer und komplementärem Oligonukleotid mit Hilfe von Microscale Thermophorese (MST) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das VEGF und das Oligonukleotid an das Fluorophor-gekoppelte Aptamer spezifisch binden; die ermittelten Dissoziationskonstanten liegen im nanomolaren Bereich (Abbildung 2).

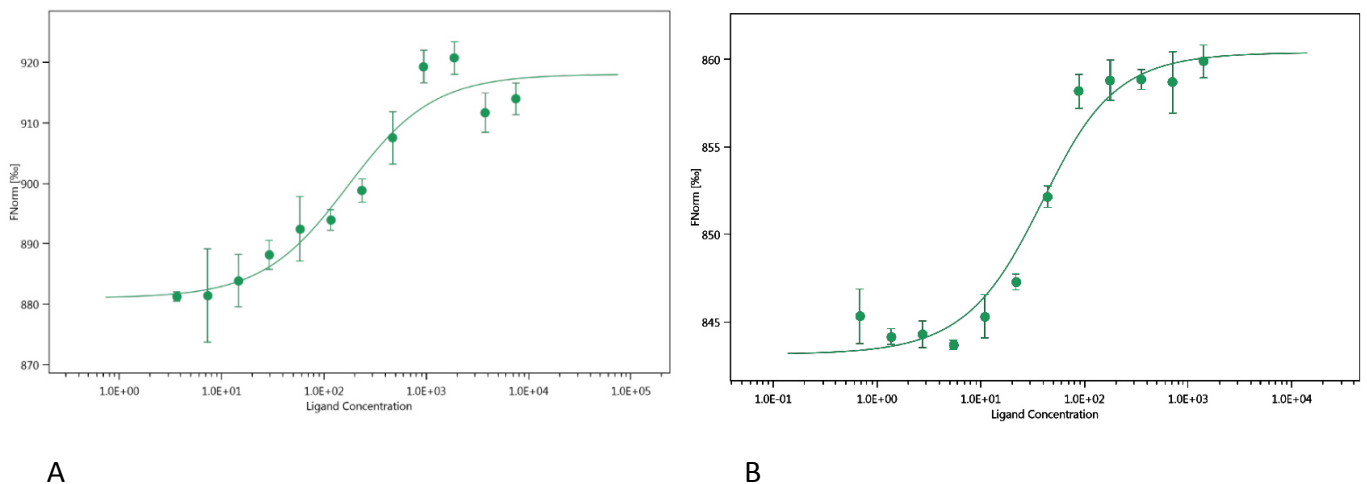


Abbildung 2. Bindungskurven von VEGF (A) und komplementärem Oligonukleotid (B) (Monolith NT.115, Nanotemper)

Weiterhin wurden mittels MST in Lösung Bedingungen (z.B. Puffer, Oligonukleotidkonzentrationen etc.) für die Oligonukleotid-Aptamer Hybridisierung gefunden und das Fluorophor-Quenching optimiert. Die Target-induzierte Dissoziation des Oligonukleotids in Anwesenheit von VEGF wurde detektiert, die scheinbare Dissoziationskonstante beträgt dabei 62 nM.

Übertragung auf Oberflächen.

Um den Einfluss der Immobilisierung auf das Detektionssystem zu bestimmen, wurden Fluorophor-gekoppelte Aptamere auf Aldehyd-Slides (PolyAn GmbH, Berlin, Deutschland) mit Hilfe eines kontaktfreien Microarraydruckers (Nano-Plotter, GeSIM) gespottet. Das

verwendete Microarray-Format ermöglichte dabei ein simultanes Screening von 10 verschiedenen Aptamer Konzentrationen in jeweils 10 Replikaten. Anschließend wurde mit dem Fluoreszenz-markierten Oligonukleotid (cV7t1-Cy5) und VEGF in verschiedenen Puffern inkubiert. Eine konzentrationsabhängige Fluoreszenzabnahme durch die VEGF-induzierte Verdrängung des Oligonukleotids konnte detektiert werden (Abbildung 3),

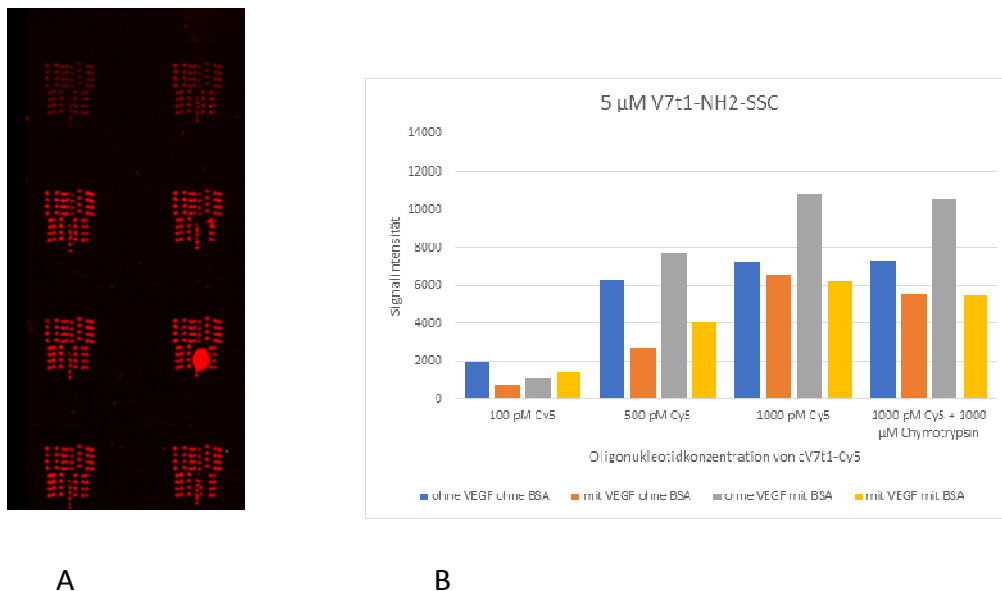


Abbildung 3.: (A) Microarray mit unterschiedlichen Oligonukleotidkonzentrationen mit VEGF (obere Reihe) und ohne VEGF (untere drei Reihen), (B) Abhängigkeit der Signalintensität von der Oligonukleotidkonzentration.

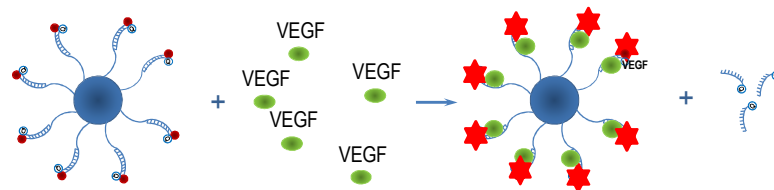


Abbildung 4. Schematische Darstellung des Detektionsmechanismus auf Microbeads

Der Aptasensor konnte sowohl in der Lösung als auch immobilisiert auf der Oberfläche von Microarrays etabliert werden und kann in weiteren Arbeiten auf den 3D-carboxymodifizierten Microbeads (20 µm Durchmesser, PolyAn GmbH) immobilisiert und getestet werden (Abbildung 4). Mit Aptasensoren modifizierte Microbeads können in 3D Zellkulturen (Hydrogelen) eingebettet und angewendet werden.