

Charakterisierung von Protein A-spezifischen DNA-Aptameren mittels SPR

Vicky Tröger¹, Beate Strehlitz², Regina Stoltenburg², Stefan Schmieder³, Frank Sonntag³

¹ Fraunhofer-Institut für Immunologie und Zelltherapie IZI, Perlickstr. 1, 04103 Leipzig
vicky.troeger@izi.fraunhofer.de

² Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung - UFZ, Permoserstr. 15, 04318 Leipzig

³ Fraunhofer-Institut für Werkstoff- und Strahltechnik IWS, Winterbergstr. 28, 01277 Dresden

Zusammenfassung:

In dieser Arbeit wird die Kombination des neuen DNA-Aptamers für Protein A (PA#2/8) mit dem etablierten ¹¹SPR-Messsystem vorgestellt. Dazu wurde eine universelle Methode zur spezifischen Aptamer-Funktionalisierung auf SPR-Chips mittels Nanospotting-Technologie charakterisiert und optimiert. Mit dieser konnte durch SPR-basierte Interaktionsstudien gezeigt werden, dass das DNA-Aptamer PA#2/8 zwischen Protein A als seinem spezifischen Zielmolekül und dem verwandten Immunglobulin-bindenden Protein G unterscheidet. Des Weiteren wurde anhand einer Konzentrationsreihe eine Nachweisgrenze von 100 nM und ein Detektionsmaximum von 100 µM Protein A ermittelt. Die Spezifität des Aptamers PA#2/8 für Protein A konnte durch SPR-Messungen mit den Proteinen BSA, Casein und humanem Thrombin gezeigt werden, welche zu keinem unspezifischen Bindungssignal führten. Damit konnte erfolgreich ein Assay zur Charakterisierung von Protein A-spezifischen DNA-Aptameren etabliert werden.

Schlagwörter: Aptamer, Oberflächenplasmonenresonanz (SPR), Protein A, Nanospotting

1. Einleitung

Aptamere sind synthetische Nukleinsäureliganden, die über ihre 3D-Struktur mit hoher Affinität und Spezifität Aminosäuren, Pharmaka, Proteine und andere Moleküle binden können. Aufgrund zahlreicher Vorteile sind Aptamere im medizinischen Bereich (Therapie, Diagnostik) und insbesondere als molekulare Erkennungselemente beispielsweise in Biosensoren (Aptasensoren) für verschiedenste analytische Anwendungen gefragt [1].

Mit Hilfe des SELEX-Prozesses (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) können Aptamere gezielt für ein bestimmtes Target selektiert werden. Dabei befindet sich das Zielmolekül vorzugsweise auf Säulen oder Magnetbeads immobilisiert. Ausgehend von einer SELEX-Bibliothek mit bis zu 10¹⁵ verschiedenen, synthetischen Oligonukleotiden werden durch einen sich wiederholenden Kreislauf aus Selektion, Amplifikation und Aufreinigung diejenigen Oligonukleotide aus der Bibliothek selektiert und angereichert, die besonders gut an das vorgegebene Zielmolekül binden. Der Selektionsfortschritt bzw. die Anreicherung targetspezifischer Aptamere kann dabei mittels geeigneter Messmethoden

überwacht werden [2]. Eine Fluoreszenzmarkierung der Oligonukleotide erlaubt beispielsweise deren direkte Quantifizierung während des SELEX-Prozesses. Bei einer fehlenden oder ungeeigneten Prozessüberwachung besteht jedoch das Risiko, dass unspezifisch bindende Oligonukleotide stark coselektiert werden [3]. Die Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (SPR) bietet sich hier zur Überwachung eines Aptamerselektionsprozesses unter anderem durch ihre einfache Handhabung sowie der Möglichkeit zu labelfreien Echtzeitmessungen an [4]. Zudem konnte diese Methode bereits erfolgreich zur SELEX-Prozessüberwachung genutzt werden [5, 6]. Darüber hinaus eignet sich die SPR-Spektroskopie sehr gut für die Charakterisierung der Bindungseigenschaften (Affinität, Spezifität) selektierter Aptamere.

In einer Arbeitsgruppe am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung – UFZ in Leipzig wurde eine Variante der *in vitro* Prozedur zur Aptamerselektion entwickelt, der FluMag-SELEX-Prozess [7]. Dabei konnte ein neues DNA-Aptamer (PA#2/8) für Protein A selektiert werden [8]. Protein A ist ein natürlicher Bestandteil der Zellwand des Bakteriums

Staphylococcus aureus und hat eine Größe von 40-60 kDa [9]. Das Protein bindet außerdem mit hoher Affinität an humanes Immunglobulin G. Das Aptamer PA#2/8 besteht aus 76 nt und enthält 4 G-Cluster, wodurch die Bildung einer G-Quartett-Struktur möglich ist. Die Bindungseigenschaften hinsichtlich Affinität und Spezifität des Aptamers zu seinem Target wurden am UFZ umfangreich untersucht (Publikation in Vorbereitung). Es eignet sich daher sehr gut als Modellsystem für aptamerbasierte Anwendungen des ¹¹SPR-Messsystems. Diese universelle SPR-Plattform, entwickelt vom Fraunhofer IOF und Fraunhofer IWS, stellt ein miniaturisiertes System dar, welches auf dem Prinzip der Oberflächenplasmonenresonanz beruht und das simultane Charakterisieren eines Analyten erlaubt [10-12]. Die vorliegende Arbeit beschreibt verschiedene Messreihen zur Bindungsanalyse zwischen Protein A und dem durch Nanospotting immobilisierten Aptamer PA#2/8 mittels des Fraunhofer SPR-Systems.

Material und Methoden

2.1 Der SPR-Biosensor

Die SPR-basierten Messungen wurden am etablierten Fraunhofer ¹¹SPR-System (capitalis technology GmbH, Berlin, Deutschland), entwickelt vom Fraunhofer IOF in Jena unter Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer IWS in Dresden, durchgeführt [12-14]. Es besteht aus einem Spektrometer mit dazugehöriger Software, einem Probenhandlungssystem sowie einem *lab-on-chip*-System, zusammengesetzt aus einer temperierbaren *on-chip*-Mikrofluidik und dem entsprechenden Sensorchip (Abb. 1).



Abb. 1. Fraunhofer SPR-Messgerät mit *on-chip*-Mikrofluidik und SPR-Chip im Vordergrund.

Die SPR-Chips in Objektträgerformat (76 x 26 x 4 mm³) sind als Einwegartikel ausgelegt und werden aus Cyclo-Olefin-Copolymer (TOPAS[®], KDS Radeberger Präzisions-Formen- und

Werkzeugbau GmbH) gefertigt. Die optischen Linsenelemente sind direkt in den Chip integriert und ermöglichen sowohl eine justageunkritische Kopplung zum Auslesegerät als auch eine Vereinfachung des gesamten optischen Aufbaus. Auf der Oberfläche des SPR-Chips befindet sich eine 45 nm dicke und 12 x 3 mm² große, rechteckige Goldschicht. Auf dieser Fläche können mittels Spotten mit einem Nanoplotter[™] bis zu 180 Messflächen realisiert werden [14].

Das Fraunhofer SPR-Spektrometer misst Winkeländerungen bei einer konstanten Wellenlänge. Als Lichtquelle dient eine LED mit einer Wellenlänge von 810 nm.

Die *on-chip*-Mikrofluidik (Fraunhofer IWS, Dresden) besteht aus einer PDMS-Messflusszelle mit einer Kanalstruktur für die Mikrofluidik. Diese kann entweder über ein Kühlungs- und Heizungszirkulationsbad Ministad 125 von Huber SE, Berching oder elektrisch durch einen Heizwiderstand temperiert werden. Vor der Messung wird die *on-chip*-Mikrofluidik mittels integrierter Vakuunkammern durch Unterdruck am Chip arretiert.

2.2 Der Nanoplotter[™]

Zum Spotten von SPR-Chips wurde der Nanoplotter NP2.1[™], entwickelt von der Firma GeSiM (Gesellschaft für Silizium-Mikrosysteme mbH), genutzt. Kern des Systems sind die mikrotechnisch gefertigten piezoelektrischen Pipetten, die nach dem *Drop-on-Demand*-Verfahren simultan oder individuell dosieren können (Abb. 2). Dieses berührungslose Freistrahilverfahren ermöglicht die präzise und reproduzierbare Immobilisierung von winzigen Spots auf beliebigen Oberflächen. Dabei haben die Tropfen immer die gleiche Größe. Die Abweichung beträgt bei einer Dosierung von 1000 Tropfen ca. 2 % [15].

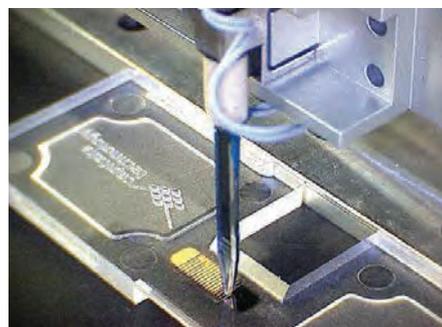


Abb. 2. Berührungsfreie Funktionalisierung eines SPR-Chips mit dem Nanoplotter[™].

Jeder Tropfvorgang verläuft nach einem Pipettierzyklus. Zuerst wird die Probe aus einer Mikrotiter-Platte aufgenommen. Daraufhin wird über einen automatischen Funktionstest mittels

Stroboskop die Funktion der Pipettenspitze nach der Probenaufnahme überprüft. Während die Mikropipette dauerhaft dispensiert, erzeugt die Stroboskopbeleuchtung ein virtuelles Standbild eines Tropfens (Abb. 3). Auf diese Weise kann die Tropfenform, die Satellitenbildung und die Flugbahn untersucht werden. Durch Einstellen der Dosierparameter Spannung, Pulsweite und Frequenz des Piezoaktors wird der Energieeintrag in den Tropfen bestimmt und an die physikalischen Eigenschaften der Probenflüssigkeit angepasst. Daraufhin kann ein beliebiges Tropfen-Muster (Array) erzeugt werden. Dabei kann das abgegebene Flüssigkeitsvolumen über die Anzahl der Tropfen an jeder Dosierposition individuell angepasst und für einzelne Proben berechnet werden (je nach Pipette beträgt das Volumen einzelner Tropfen entweder ca. 0,1 nl oder 0,4 nl).

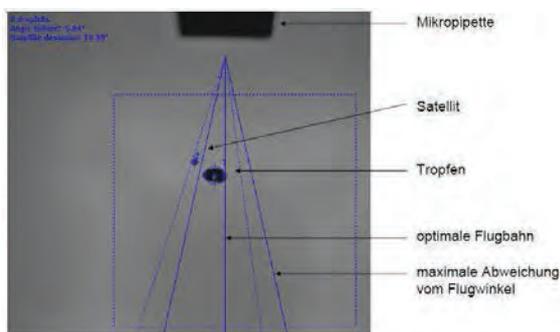


Abb. 3. Bildschirmfenster des Funktionstests mit dem Stroboskop. Abgebildet sind ein Tropfen und sein Satellit, welche von der automatischen Mustererkennung identifiziert werden (blaue Markierung um die Tropfen). Das Ergebnis der Mustererkennung ist oben links im Standbild eingeblendet.

Die Arbeitsfläche bietet Platz für eine Ablage von bis zu 55 SPR-Chips. Zum Abschluss eines Pipettiervorgangs wird die Pipette an der Waschstation gewaschen. Dazu wird in der Waschstation mit Hilfe des Diluters Systemflüssigkeit durch die Pipetten gedrückt. Gleichzeitig erfolgt eine Reinigung der Spitzen von außen, indem extern zugeführtes Wasser an der Außenseite der Spitzen restliche Probenbestandteile entfernt. Anschließend wird der Ausgangszustand der Spitzen durch Abtupfen verbliebener Reste an Systemflüssigkeit auf einem saugfähigen Vlies wiederhergestellt. Dieser effektive Spül- und Trocknungsprozess verhindert Kreuzkontaminationen zwischen aufeinanderfolgenden Pipettierschritten. Mit Hilfe des Nanoplotters lassen sich zudem die Möglichkeiten des Fraunhofer SPR-Systems optimal ausnutzen. Dieses verfügt über 3 separat ansteuerbare Lichtquellen, mit denen bis zu 3 benachbarte 1D-Arrays ausgeleuchtet und damit multiplex vermessen werden können [14].

2.3 SPR-Experimente

Zu Beginn aller SPR-Experimente wurde die Goldfläche der Sensorchips gereinigt. Dazu wurden die Chips mit 10 Tropfen NH_3 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany) gespült und dann für 2,5 min in eine Neutralisationslösung bestehend aus NH_3 (25 %, VWR International GmbH, Germany), H_2O_2 (30 %, Merck KGa, Germany) und dH_2O (1:1:5) gelegt und abschließend mit dH_2O gespült. Daraufhin wurden die Sensorchips mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptavidin (New England Biolabs, Germany) überschichtet, für eine Stunde inkubiert und daraufhin mit dH_2O gespült. Mittels Nanoplotter NP2.1TM wurden die SPR-Chips mit jeweils 7 Linien mit 20 μM 3'-biotinyliertem Aptamer PA#2/8 (BioSpring GmbH, Germany) und als Referenz ohne Affinität zu Protein A mit 20 μM 3'-biotinylierter SELEX-Bibliothek BANK-C (BioSpring GmbH, Germany), entsprechend dem Array in Abb. 4, gespottet. Der Linienabstand betrug 0,42 cm und der Abstand zwischen den einzelnen Spots 0,05 cm.

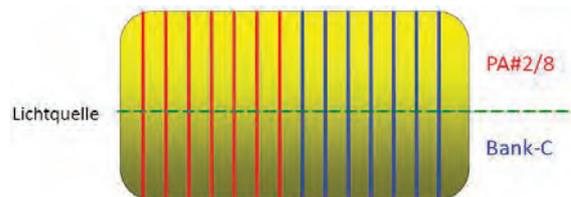


Abb. 4. Spotting-Array: Aptamer PA#2/8 und BANK-C wurden linienförmig, parallel nebeneinander gespottet.

Zur Verhinderung einer zu schnellen Verdunstung der Proben und einer Verbesserung der Homogenität der Aptamer-Arrays diente ein Spottingzusatz aus 100 mM MgCl_2 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany) und einer 5 %-igen Glycerinlösung (VWR International GmbH, Germany). Nach einstündiger Inkubation der funktionalisierten SPR-Chips im NanoplotterTM bei einer Luftfeuchte von 75 % erfolgte eine 30-minütige Blockung der gesamten Oberfläche mit 0,5 mg/ml HSA (VWR International GmbH, Germany), zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen. Der Lauf- und Bindungspuffer setzte sich aus 100 mM NaCl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany), 20 mM Tris/HCl (pH 7,6) (AppliChem GmbH, Germany), 10 mM MgCl_2 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany), 5 mM KCl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany), 1 mM CaCl_2 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany) und 0,005 % TWEEN 20 (Merck KGa, Germany) zusammen. Die Wechselwirkungen des immobilisierten Aptamers bzw. der BANK-C mit rekombinanten Protein A (P7837, Sigma-Aldrich Chemie

GmbH, Germany) verschiedener Konzentrationen wurden mittels SPR gemessen. Zur Untersuchung der Aptamer-Spezifität wurden zusätzlich Protein G (GE Healthcare Bio-Science AB, Schweden), Casein (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany), humanes Thrombin (Haematologic Technologies Inc., USA) und BSA (VWR International GmbH, Germany) injiziert. Zwischen den einzelnen Protein A-Injektionen erwies sich eine Regenerationslösung aus 1 M NaCl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany) zur Spaltung des Aptamer-Protein-A-Bindungskomplexes als geeignet.

Ergebnisse und Diskussion

Zur Charakterisierung der Interaktion von Aptamer PA#2/8 mit Protein A wurde eine Konzentrationsreihe mit Protein A vermessen.

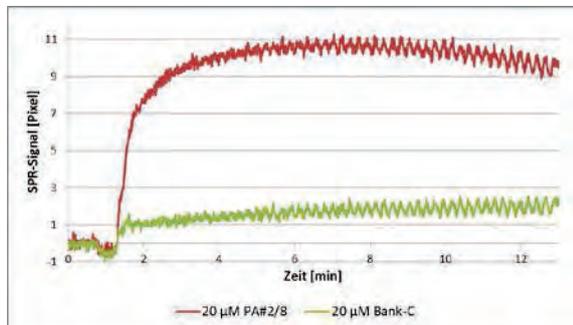


Abb. 5. Sensorgramm bei einer Injektion von 1000 nM Protein A auf 20 µM PA#2/8 und 20 µM BANK-C funktionalisierten Flächen.

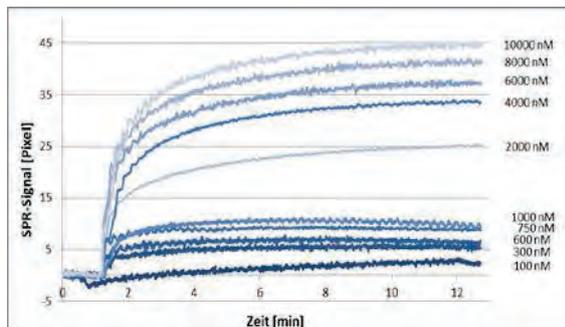


Abb. 6. Sensorgramm der Protein A-Konzentrationsreihe (von unten nach oben: 100 nM, 300 nM, 600 nM, 750 nM, 1000 nM, 2000 nM, 4000 nM, 6000 nM, 8000 nM, 10000 nM) auf 20 µM PA#2/8 funktionalisierten Flächen. Die Referenzsignale der Negativkontrolle BANK-C wurden von den Bindungssignalen abgezogen.

In Diagramm 5 ist exemplarisch die Interaktion zwischen Protein A und dem Aptamer PA#2/8 im Vergleich zur SELEX-Bibliothek BANK-C, welches die Negativkontrolle zum selektierten Aptamer darstellt, abgebildet.

Zur Ermittlung der Nachweisgrenze und der Aufnahme konzentrationsabhängiger Mess-

reihen wurden Protein A-Konzentrationen von 100 bis 100000 nM injiziert (Abb. 6). Die Nachweisgrenze lag bei 100 nM, das Detektionsmaximum bei 100000 nM Protein A.

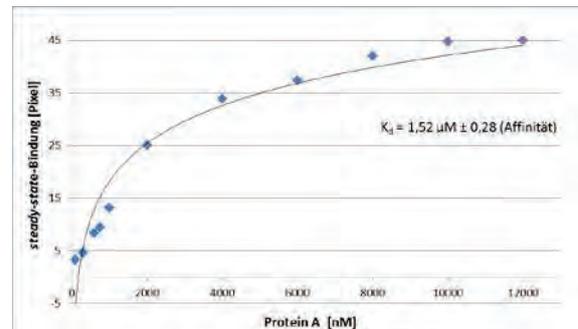


Abb. 7. Sättigungskurve des PA#2/8-Aptamers.

Aus den Bindungssignalen der Protein A-Konzentrationen wurde eine Sättigungskurve erstellt (Abb. 7). Für das rekombinante Protein A wurde eine *steady-state*-Affinität von 1,52 µM ermittelt.

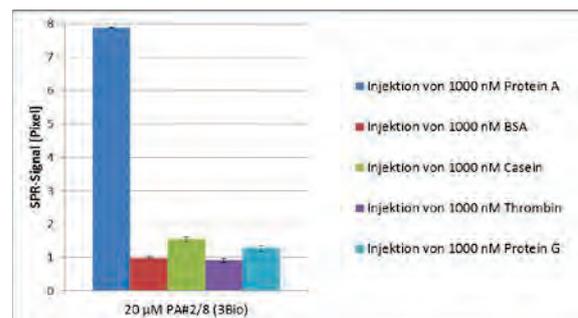


Abb. 8. Untersuchung der Spezifität des Aptamers PA#2/8.

Um die Spezifität des Aptamers PA#2/8 zu untersuchen, wurden Protein G, BSA, Casein und humanes Thrombin in einer Konzentration von 1000 nM als Negativkontrollen verwendet. Das Aptamer PA#2/8 kann eindeutig zwischen Protein A als seinem spezifischen Target und dem ebenfalls IgG-bindenden Protein G unterscheiden (Abb. 8). Eine unspezifische Bindung an den Negativkontrollen konnte nicht beobachtet werden.

Zusammenfassung

Zur Charakterisierung des Protein A-spezifischen Aptamers PA#2/8 konnte erfolgreich ein Protokoll zur Funktionalisierung durch *non-contact-printing* mittels Nanoplotter™ für SPR-Messungen entwickelt und etabliert werden.

Für die Detektion von Protein A wurde eine Nachweisgrenze von 100 nM ermittelt werden. Das Detektionsmaximum für Protein A lag bei 100 µM. Des Weiteren konnte durch Spezifitätsuntersuchungen gezeigt werden, dass das

Aptamer PA#2/8 zwischen eng verwandten Targets unterscheidet.

Diese Ergebnisse zeigen eine konzentrationsabhängige Bindung des Aptamers PA#2/8 und bestätigen eindeutig die Spezifität des Aptamers; und sind in diesem Zusammenhang vergleichbar mit den Resultaten am UFZ, welche am Biacore X100 durchgeführt wurden.

Danksagung

Die Autoren danken dem Freistaat Sachsen und der Europäischen Union (SAB Projekt UNILOC), sowie dem BMWI (ZIM Projekt SPREVALMED) für die finanzielle Unterstützung.

Quellen

- [1] E. Luzi, M. Minunni, et al.: New trends in affinity sensing: aptamers for ligand binding, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2003, 22, 810-818.
- [2] R. Stoltenburg et al.: SELEX—A (r)evolutionary method to generate highaffinity nucleicacid ligands, *Biomol. Eng.* 2007, 24, 381-403.
- [3] T. Schütze, B. Wilhelm, et al.: Probing the SELEX Process with Next-Generation Sequencing, *PLoS ONE* 2011.
- [4] J. Homola: Present and future of surface plasmon resonance biosensors, *Analytical and bioanalytical chemistry* 2003, 377, 528-539.
- [5] T.S. Misono, P.K.R. Kumar: Selection of RNA aptamers against human influenza virus hemagglutinin using surface plasmon resonance, *Analytical biochemistry* 2005, 342, 312-317.
- [6] A. Tahiri-Alaoui, L. Frigotto, et al.: High affinity nucleic acid aptamers for streptavidin incorporated into bi-specific capture ligands, *Nucleic acids research* 2002, 30.
- [7] R. Stoltenburg, C. Reinemann and B. Strehlitz: FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection, *Anal. Bioanal. Chem.* 2005, 383: 83-91.
- [8] R. Stoltenburg, B. Strehlitz: Aptamere, die spezifisch sind für Immunglobulin bindende Zellwandproteine, DE 102011006610.1 (31.03.2011), PCT/EP2012/055655 (29.03.2012).
- [9] A. Forsgren: Significance of protein A production by staphylococci, *Infection and Immunity* 1970, 2, 672–673.
- [10] A. Kick, M. Bönsch, B. Katzschner, J. Voigt, A. Herr, W. Brabetz, M. Jung, F. Sonntag, U. Klotzbach, N. Danz, S. Howitz, M. Mertig: DNA microarrays for hybridization detection by surface plasmon resonance spectroscopy, *Biosens. Bioelectron.* 2010, 26, 1543–1547.
- [11] V. Tröger, S. Malik, F. Sonntag, S. Schmieder: Generation of ready-to-use SPR chips using automated nano-spotting, 46. DGBMT Jahrestagung 2012, In *Proceedings*.
- [12] A. Henseleit, S. Schmieder, T. Bley, F. Sonntag, N. Schilling, P. Quenzel, N. Danz, U. Klotzbach, E. Boschke: A compact and rapid aptasensor platform based on surface plasmon resonance, *Engineering in Life Sciences* 2011, 11, 573–579.
- [13] N. Danz, A. Kick, F. Sonntag, S. Schmieder, B. Höfer, U. Klotzbach, M. Mertig: Surface plasmon resonance platform technology for multi-parameter analyses on polymer chips. *Eng. Life Sci.* 2011, 11, 566-572.
- [14] M. Mertig, A. Kick, M. Bönsch, B. Katzschner, A novel platform technology for the detection of genetic variations by surface plasmon resonance. *Proceedings of IEEE SENSORS 2009 Conference*, Christchurch, New Zealand 2009, pp. 392-395.
- [15] GeSiM (2009), Benutzerhandbuch Nanoplotter™ 2.1/Software NC16 Version 2.15.46.