

## 9 ANHANG

### 9.1 MATERIALIEN

#### 9.1.1 Puffer

##### Puffer

###### ABTS

###### Stammlösung:

35 mg ABTS  
100 ml 0,05 M Phosphat-Citrat-Puffer, pH 5,0

###### Arbeitslösung:

100 ml Stammlösung  
25 µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

###### BP (1x)

20 mM Tris/HCl, pH 7,6  
140 mM NaCl  
1 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 mM CaCl<sub>2</sub>  
5 mM KCl

###### BP-T (1x)

20 mM Tris/HCl, pH 7,6  
140 mM NaCl  
1 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 mM CaCl<sub>2</sub>  
5 mM KCl  
0,05 % Tween 20

###### 4-Chloro-1-Naphthol

###### Stammlösung:

30 mg 4-Chloro-1-Naphthol  
1 ml Ethanol

###### Arbeitslösung:

20 µl Stammlösung  
2 ml 50 mM Tris  
3 µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

###### 90 % Formamid

90 % (v/v) Formamid  
10 % 10x TBE  
0,0025 % (w/v) Bromphenolblau

###### Laufpuffer (Biacore)

20 mM Tris/HCl, pH 7,6  
140 mM NaCl  
1 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 mM CaCl<sub>2</sub>  
5 mM KCl  
0,005 % Tween 20

###### LB-Medium

10 g Trypton  
5 g Hefeextrakt  
10 g NaCl  
ad 1000 ml mit H<sub>2</sub>O

###### LB-Agar

15 g/l (w/v) LB-Medium  
→ autoklavieren (20 min / 120°C)  
→ bei ca. 55°C 100 µg/ml Ampicillin  
→ in sterile Petrischalen gießen

###### Loading Buffer (10x)

60 % (v/v) Glycerin  
50 mM Tris/HCl, pH 7,6  
0,0025 % (w/v) Bromphenolblau  
0,0025 % (w/v) Xylencyanol

###### 0,05 M Phosphat-Citrat-Puffer

25,7 ml 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
24,3 ml 0,1 M Citronensäure  
ad 100 ml mit H<sub>2</sub>O  
pH 5

###### PBS (1x)

50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
150 mM NaCl  
pH 7,5

###### PBS-T (1x)

50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
150 mM NaCl  
0,05 % Tween 20  
pH 7,5

###### TE (1x)

10 mM Tris  
1 mM EDTA  
pH 7,6

###### TB (10x)

1 M Tris  
1 M Borsäure  
pH 8,0

###### TBE (10x)(Roth)

1 M Tris  
1 M Borsäure  
20 mM EDTA  
pH 8,3

#### 9.1.2 Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'-3')	Ntd.
Primer B	CCAAGCTTGCATGCCTGCAG	20
Primer BioB	(BIO) CCAAGCTTGCATGCCTGCAG	20
Primer D	GGGAATTCGAGCTCGGTACC	20
Primer BioD	(BIO) GGGAATTCGAGCTCGGTACC	20
DNA40	GGGAATTCGAGCTCGGTACC-(N40)-CTGCAGGCATGCAAGCTTGG	80
10.10	GGGAATTCGAGCTCGGTACCATCTGTGTAAGGGGTAAGGGGTGGGGTGGGTACGCTCTAGCTGCAGGCATGCAAGCTTGG	80
10.10v	ACCATCTGTGTAAGGGGTAAGGGGTGGGGTGGGTACGCTCT	41
10.10q	AGGGGTAAGGGGTGGGGTGGGT	23
C1	GGGAATTCGAGCTCGGTACCGCTGCTTTGCTGCAGATTGTGGGTGGGTGGGTGATCTGCAGGCATGCAAGCTTGG	80
C2	GGGAATTCGAGCTCGGTACCGTACAGTACTGCATATCTCATACTTCCTAGATACCATCCCTGCATGCATGCAAGCTTGG	79

### 9.1.3 Enzyme

Name	Konzentration	Bezugsquelle
GoTaq <sup>®</sup> Flexi DNA Polymerase	[5 U/μl]	Promega
Neutravidin-HRP	Bindungskapazität: 5 μg (20,5 nmol) Biotin/mg Protein	Pierce
Phusion <sup>®</sup> DNA Polymerase	[2 U/μl]	Finnzymes
PvuII	[10 U/μl]	New England Biolabs
S1-Nuklease	[100 U/μl]	Fermentas Life Sciences
T4-DNA-Ligase	[3 U/μl]	Promega

### 9.1.4 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Geräte

#### Chemikalien

ABTS tablets	Sigma
Agarose	Peqlab
Ampicillin	Sigma
Ammoniumperoxodisulfat	Roth
Biotin	Sigma
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Sigma
CaCl <sub>2</sub>	Sigma
4-Chloro-1-Naphthol	Sigma
Daunorubicin	Fluka
Dimethylformamid	Sigma
Doxorubicin	Fluka
Dithiothreitol	Sigma
Ethidium Bromide Solution	GibcoBRL
EZ-Link <sup>®</sup> Sulfo-NHS-SS-Biotin	Pierce
Formamid	Fluka
Glycerin	Sigma
Glycogen [20 mg/ml]	Roche
Harnstoff	Roth
8-Hydroxychinolin	Merck
KCl	Roth
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Roth
MgCl <sub>2</sub>	Roth
NaCl	Roth
Quant-iT <sup>™</sup> OliGreen <sup>®</sup> ssDNA Quantitation Reagent	Molecular Probes <sup>™</sup> TM
Quant-iT <sup>™</sup> PicoGreen <sup>®</sup> dsDNA Quantitation Reagent	Molecular Probes <sup>™</sup> TM
Roti <sup>®</sup> -Block	Roth
Roti <sup>®</sup> -Phenol	Roth
Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 40 (Acrylamid/Bisacrylamid 29:1)	Roth
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	Roth
Tetracyclin	Sigma
Tris	Roth
Triton X-100	Argos Organics
Tween <sup>®</sup> 20	Roth
Xylencyanol	Sigma

#### Verbrauchsmaterialien

Biacore Sensor Chip	Biacore Sensor Chip SA	Biacore AB
DC-Platten	Alugram Sil G/UV254	Macherey-Nagel
Kryoröhrchen		Greiner
Magnetic Beads	Dynabeads <sup>®</sup> M-280 Streptavidin (10 mg/ml)	Dynal Biotech ASA
Mikrotiter-Platten	Microlon, high binding	Greiner Bio-One
Streptavidin-Mikrotiter-Platten	Reacti-Bind Streptavidin Coated Black Plates, 96-Well Format, blocked with SuperBlock Blocking Buffer	Pierce
Nitrocellulosestreifen		Securetec Detektions-Systeme AG
Reaktionsgefäße (1,5 ml, silikonisiert)	DNA LoBind Tube	Eppendorf
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)		Greiner

**Geräte**

Biacore	Biacore X	Biacore AB
BioSprint	BioSprint 15	Qiagen
Dokumentationsanlage	ChemImager™ Ready	Alpha Innotech Corporation
Elektroelution	ELUTRAP® Electro-Separation System	Schleicher und Schuell
Fluoreszenzspektrometer	Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer	Varian
Gelkammer (7x8 cm, Agarose)	Model B1A EasyCast™ Mini Gel	Owl Separation Systems
	Electrophoresis System	
Gelkammer (9x11 cm, Agarose)	Model B1 EasyCast™ Mini Gel	Owl Separation Systems
	Electrophoresis System	
Gelkammer (8x8,5 cm, PAGE)	Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System	Biorad
Gelkammer (14x16 cm, PAGE)	P9DS Emperor Penguin™ Dual Gel Vertical	Owl Separation Systems
	Electrophoresis System	
Geltrockner	Unigeldryer	UniEquip
Kühlfalle	Refrigerated Vapor Trap RVT100	Savant
Magnet	Magnetic Particle Concentrator (MPC-S)	Dynal
Mikrotiterplatten-Fluorometer	Fluoroskan®	Thermo Electron Labsystems
Mikrotiterplatten-Spektrophotometer	Multiskan®	Thermo Electron Labsystems
PCR	DNA Engine Gradient Cycler PTC-200	MJ Research
pH-Meter	inoLab® Serie 720	WTW
Phosphoimager	Typhoon 8600	Molecular Dynamics
Schwenkschüttler	Unimax 1010	Heidolph Instruments
Speedvac	SpeedVac Plus SC110A	Savant
Spektrometer	NanoDrop ND-1000	NanoDrop Technologies Inc.
	Cary 100 Bio UV-Visible Spectrophotometer	Varian
	Electrophoresis Power Supply E865	Consort
	Thermomixer Comfort	Eppendorf
	Chemie-Hybrid-Pumpe RC5	Vacuubrand
	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
	Centrifuge 5415 D	Eppendorf
	Biofuge fresco	Heraeus

## 9.2 BIOSPRINT 15-PROTOKOLLE

### Beads\_Kopplung

Well	Aktion	Zeit	Geschwindigkeit	Sammeln der Beads	
A	1	Bind	10:00 min	very slow	no
	2	Mix	0:15 min	bottom medium	no
	3	Bind	10:00 min	slow	no
	4	Mix	0:15 min	bottom medium	no
	5	Bind	10:00 min	very slow	no
	6	Mix	0:30 min	bottom medium	5x
C	1	Wash	0:10 min	bottom slow	no
	2	Wash	3:00 min	slow	no
	3	Mix	0:15 min	bottom medium	5x
D	1	Wash	0:10 min	bottom slow	no
	2	Wash	3:00 min	slow	no
	3	Mix	0:15 min	bottom medium	5x
E	1	Wash	0:10 min	bottom slow	no
	2	Wash	3:00 min	slow	no

### Beads\_Wash

Well	Aktion	Zeit	Geschwindigkeit	Sammeln der Beads	
B	1	Mix	0:15 min	bottom medium	5x
C	1	Wash	0:10 min	bottom slow	no
	2	Wash	3:00 min	slow	no
	3	Mix	0:15 min	bottom medium	5x
D	1	Wash	0:10 min	bottom slow	no
	2	Wash	3:00 min	slow	no
	3	Mix	0:15 min	bottom medium	5x
E	1	Wash	0:10 min	bottom slow	no
	2	Wash	3:00 min	slow	no

## SELEX\_DRN (Standardprotokoll)

Well	Aktion	Zeit	Geschwindigkeit	Sammeln der Beads	
<b>A</b>	1	Bind	7:00 min	very slow	no
	2	Mix	0:15 min	bottom medium	no
	3	Bind	7:00 min	very slow	no
	4	Mix	0:15 min	bottom medium	no
	5	Bind	7:00 min	very slow	no
	6	Mix	0:15 min	bottom medium	no
	7	Bind	7:00 min	very slow	no
	8	Mix	0:15 min	bottom medium	no
	9	Bind	7:00 min	very slow	no
	10	Mix	0:15 min	bottom medium	no
	11	Bind	7:00 min	very slow	no
	12	Mix	0:15 min	bottom medium	5x
<b>B</b>	1	Wash	0:10 min	bottom slow	no
	2	Wash	3:00 min	slow	no
	3	Mix	0:15 min	bottom medium	5x
<b>C</b>	1	Wash	0:10 min	bottom slow	no
	2	Wash	3:00 min	slow	no
	3	Mix	0:15 min	bottom medium	5x
<b>D</b>	1	Wash	0:10 min	bottom slow	no
	2	Wash	3:00 min	slow	no
	3	Mix	0:15 min	bottom medium	5x
<b>E</b>	1	Elution	1:00 min	medium	no

Variationen zu SELEX-Standardprotokoll (SELEX\_DRN1 bis SELEX\_DRN10):

DRN1	DRN2	DRN3	DRN4	DRN5	DRN6	DRN7	DRN8	DRN9	DRN10
--	E1: 30 min	E1: 30 min	E1: 30 min	D2: 30 min E1: 30 min	D2: 30 min E1: 30 min	D2: 30 min E1: 30 min	D2: 30 min E1: 30 min	B2: 30 min C2: 30 min D2: 30 min E1: 30 min	B2: 30 min C2: 30 min D2: 30 min E1: 30 min
			+ VS	+ VS	+ VS	+ VSx2	+ VSx4	+2x VSx2	+2x VSx2

VS = Vorsäule (ein Vorsäulenvolumen entspricht dem Säulenvolumen der Hauptsäule)

VSx2 = doppeltes Säulenvolumen

VSx4 = vierfaches Säulenvolumen

## SELEX\_Vorsäule

Well	Aktion	Zeit	Geschwindigkeit	Sammeln der Beads	
A	1	Bind	7:00 min	very slow	no
	2	Mix	0:15 min	bottom medium	no
	3	Bind	7:00 min	very slow	no
	4	Mix	0:15 min	bottom medium	no
	5	Bind	7:00 min	very slow	no
	6	Mix	0:15 min	bottom slow	5x
	7	Dry	0:30 min	--	no
<b>Wechsel der Fünf-Kammern-Strips</b>					
8	Elution	1:00 min	medium	no	

## Separation\_ds

Well	Aktion	Zeit	Geschwindigkeit	Sammeln der Beads	
A	1	Bind	5:00 min	very slow	no
	2	Mix	0:15 min	bottom medium	no
	3	Bind	5:00 min	very slow	no
	4	Mix	0:30 min	bottom medium	5x
B	1	Wash	0:10 min	bottom slow	no
	2	Wash	3:00 min	slow	no
	3	Mix	0:15 min	bottom medium	5x
C	1	Wash	0:10 min	bottom slow	no
	2	Wash	3:00 min	slow	no
	3	Mix	0:15 min	bottom medium	5x
D	1	Wash	0:10 min	bottom slow	no
	2	Wash	3:00 min	slow	no
	3	Mix	0:15 min	bottom medium	5x
E	1	Mix	4:45 min	medium	5x
	2	Dry	2:00 min	--	no
<b>Wechsel der Fünf-Kammern-Strips</b> <b>Neutralisierung well E (Strip a): + 760 µl PBS + 40 µl 1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>					
3	Elution	1:00	medium	no	

## Stripwechsel

Well	Aktion	Zeit	Geschwindigkeit	Sammeln der Beads	
E	1	Bind	0:30 min	bottom medium	5x
A	1	Dry	0:45 min	--	no
	<b>Wechsel der Fünf-Kammern-Strips</b>				
2	Elution	1:00 min	medium	no	

## 9.3 EIGENE PUBLIKATIONEN

### Artikel

Aniela Wochner & Jörn Glökler (2007). Nonradioactive fluorescence microtiter plate assay monitoring aptamer selections. *Biotechniques* **42**, 578-582.

Aniela Wochner, Marcus Menger, Martina Rimmele (2007). Characterisation of aptamers for therapeutic studies. *Expert Opinion on Drug Discovery* **2(9)**, 1205-1224.

Aniela Wochner, Birgit Cech, Marcus Menger, Volker A. Erdmann, Jörn Glökler (2007). Semi-automated selection of DNA aptamers using magnetic particle handling. *Biotechniques* **43**, 344-353.

Aniela Wochner, Marcus Menger, Dagmar Orgel, Birgit Cech, Martina Rimmele, Volker A. Erdmann, Jörn Glökler (2007). A single-stranded DNA aptamer with high affinity and specificity for therapeutic anthracyclines. *Analytical Biochemistry*, **373**, 34-42.

### Patent

Aniela Wochner. Anthracyclin-Aptamere. DE-Patentanmeldung vom 23.03.2007.

### Poster

Aniela Wochner, Marcus Menger, Martina Rimmele, Jörn Glökler. Semi-automatic selection of aptamers against small molecules. *Symposium: RNA Chemistry meets Biology*. 29.-30. September 2006, Lund, Schweden.

Aniela Wochner, Marcus Menger, Martina Rimmele, Jörn Glökler. Semi-automatic selection of aptamers against small molecules. *4th Meeting of the GBM study section 'RNA-Biochemistry': RNA Biochemistry & Workshop microRNAs*. 12.-15. Oktober 2006, Kassel.

Aniela Wochner, Marcus Menger, Dagmar Orgel, Birgit Cech, Martina Rimmele, Volker A. Erdmann, Jörn Glökler. A single-stranded DNA aptamer with high affinity and specificity for therapeutic anthracyclines. *3rd Nucleic Acid Chemical Biology (NACB) PhD Summer School*. 24.-28. Juni 2007, Odense, Dänemark.





## 9.4 DANKSAGUNG

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn **Prof. Dr. Volker A. Erdmann** für die wissenschaftliche Unterstützung meiner Doktorarbeit, seine steten Ermutigungen und Ratschläge sowie die freundliche Aufnahme in die Seminare seiner Arbeitsgruppe.

Bei Herrn **Prof. Dr. Hans Lehrach** möchte ich mich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Der RiNA GmbH danke ich für die finanzielle Unterstützung während meiner Doktorarbeit. **Dr. Jörn Glökler** bin ich für die Bereitstellung des interessanten Themas, die zahlreichen Diskussionen und seinen unerschöpflichen Ideenreichtum zu großem Dank verpflichtet. Ganz besonders danken möchte ich außerdem **Birgit Cech** und **Dagmar Orgel** für ihre unermüdliche wissenschaftliche und mentale Unterstützung sowie ihre zahllosen Ratschläge in jeder Lebenslage. Auch **Dr. Marcus Menger**, **Dr. Martina Rimmele** und **Doreen Wüstenhagen** möchte ich von Herzen für ihre Unterstützung und das sorgfältige Korrekturlesen danken.

Meinen Eltern danke ich für ihren immer währenden Rückhalt und ihre Ermutigungen.

Mein größter Dank schließlich gilt **Dr. Stefan Dietze** für sein Verständnis, seine Motivation und seine nahezu endlose Geduld.