



# *IN VITRO* SELEKTION VON SPIEGELMEREN GEGEN AFFINITÄTS-TAGS

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Katja Behling**

aus Zwickau

2010

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2006 bis September 2010 unter der Leitung von Prof. Dr. V. A. Erdmann am Institut für Chemie und Biochemie der Freien Universität Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. V. A. Erdmann
2. Gutachter: Prof. Dr. Burghardt Wittig

Tag der Disputation: 21.12.2010

# INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
I.1	APTAMERE .....	2
I.1.1	<i>In vitro</i> Selektion von Nukleinsäuren .....	2
I.1.1.1	Die Bibliothek .....	2
I.1.1.2	Der Selektionsprozess.....	3
I.1.2	Anwendung und Bedeutung von Aptameren .....	6
I.1.3	Stabilität von Aptameren .....	8
I.2	SPIEGELMERE .....	10
I.2.1	Spiegeltechnik .....	10
I.2.2	Anwendung und Bedeutung von Spiegelmeren .....	12
I.3	AFFINITÄTSPEPTIDE .....	14
I.3.1	Polyhistidin-Tag.....	16
I.3.2	Streptavidin-bindende Affinitäts-Tags.....	16
I.3.3	FLAG-Tag-Affinitätspeptid.....	17
I.4	KRISTALLISATION UND STRUKTURAUFKLÄRUNG .....	18
I.4.1	Kristallisation und Strukturaufklärung von Aptameren.....	18
I.4.1.1	G-Quadruplexstruktur von Aptameren .....	18
I.4.2	Strukturaufklärung von Locked Nucleic Acids (LNAs) .....	20
<b>II.</b>	<b>AUFGABENSTELLUNG</b> .....	<b>23</b>
<b>III.</b>	<b>METHODEN</b> .....	<b>25</b>
III.1	ENZYMATISCHE UND MIKROBIOLOGISCHE METHODEN .....	25
III.1.1	<i>Polymerasekettenreaktion</i> .....	25
III.1.1.1	PCR-Reaktionen mit <i>Taq</i> -DNA-Polymerase .....	25
III.1.1.2	PCR-Reaktionen mit <i>Phusion</i> -DNA-Polymerase.....	26
III.1.2	<i>Generierung einzelsträngiger DNA</i> .....	26
III.1.2.1	$\lambda$ -Exonuklease-Verdau .....	26
III.1.2.2	DNA-Doppelstrangtrennung mittels Hexaethylglykollinker .....	27
III.1.3	<i>Radioaktive Markierung von DNA</i> .....	27
III.1.3.1	5'-radioaktive Markierung von DNA .....	27
III.1.3.2	Interne radioaktive Markierung von DNA .....	28
III.1.4	<i>Klonierung</i> .....	28
III.1.4.1	Ligation .....	28
III.1.4.2	Transformation .....	29
III.1.4.3	Selektion positiver Klone mittels Kolonie-PCR.....	29
III.1.4.4	Isolierung von Plasmid-DNA und Sequenzierung .....	30
III.2	ANALYSE UND REINIGUNG VON DNA-, PEPTID- UND PROTEINPROBEN.....	30
III.2.1	<i>Quantifizierung von DNA und Proteinen</i> .....	30
III.2.1.1	UV-Konzentrationsbestimmung von DNA .....	30
III.2.1.2	Radioaktive Quantifizierung von DNA in Lösung .....	31

# INHALTSVERZEICHNIS

---

III.2.1.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	31
III.2.2	<i>Gelelektrophorese</i> .....	31
III.2.2.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	31
III.2.2.2	Polyacrylamidgelelektrophorese.....	32
III.2.2.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	33
III.2.2.4	Nachweis von DNA in Gelen.....	34
III.2.2.5	Nachweis von Proteinen in SDS-Gelen.....	35
III.2.3	<i>Extraktion und Reinigung von DNA und Proteinen</i> .....	36
III.2.3.1	Elution aus Agarosegelen.....	36
III.2.3.2	Elution aus Polyacrylamidgelen.....	36
III.2.3.3	Aufreinigung von DNA mittels Silika-Membran-Säule.....	36
III.2.3.4	Aufreinigung mittels Silica-Harz-Partikeln.....	36
III.2.3.5	Ultrafiltration von DNA-Proben.....	37
III.2.3.6	Phenol-Chloroform-Extraktion.....	37
III.2.3.7	Ethanol-fällung.....	37
III.2.3.8	Reinigung und Konzentrierung von Proteinproben.....	38
III.3	ÜBEREXPRESSION UND REINIGUNG VON FABP-FUSIONSPROTEINEN.....	38
III.3.1	<i>Transformation</i> .....	38
III.3.2	<i>Zellanzucht in Flüssigkultur</i> .....	38
III.3.3	<i>Zellaufschluss</i> .....	39
III.3.4	<i>Proteinaufreinigung</i> .....	39
III.4	IN VITRO SELEKTIONEN.....	40
III.5	ANALYSE DER APTAMERE UND SPIEGELMERE.....	42
III.5.1	<i>Bestimmung der Bindungsaffinitäten von Aptamer-Klonen</i> .....	42
III.5.2	<i>Bindungstest mit magnetischen Partikeln</i> .....	43
III.5.3	<i>Bindungstests mit Nitrocellulosefiltern</i> .....	43
III.5.4	<i>Bestimmung von Dissoziationskonstanten <math>K_d</math></i> .....	44
III.6	KRISTALLISATION.....	45
III.6.1	<i>Kristallisation der LNA-Duplex</i> .....	45
III.6.2	<i>Kristallisation von ST-146-A</i> .....	46
III.6.3	<i>Datenakquisition und -prozessierung</i> .....	46
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>47</b>
IV.1	SPIEGELMERE GEGEN AFFINITÄTS-TAGS.....	47
IV.1.1	<i>Die DNA-Startbibliothek</i> .....	47
IV.1.2	<i>Erstellung des Peptides Spiegel-Tag</i> .....	48
IV.1.3	<i>Validierung der Peptid-Zielmoleküle für die in vitro Selektionen</i> .....	48
IV.1.4	<i>Immobilisierung der Peptid-Zielmoleküle</i> .....	49
IV.1.5	<i>Separationsstrategie der in vitro Selektionen</i> .....	50
IV.1.6	<i>Verarbeitung bindender Moleküle während der Selektionsrunden</i> .....	51
IV.1.7	<i>Spiegelmere gegen das Strep-Tag-II-Affinitätspeptid</i> .....	52

# INHALTSVERZEICHNIS

---

IV.1.7.1	<i>Strep-Tag-II-SELEX</i> .....	52
IV.1.7.2	Primärstrukturanalyse <i>Strep-Tag-II</i> -bindender Aptamere.....	54
IV.1.7.3	Bindungsaffinitäten der <i>Strep-Tag-II</i> -Aptamere .....	57
IV.1.7.4	Sekundärstruktur <i>Strep-Tag-II</i> -bindender Aptamere .....	58
IV.1.7.5	Verkürzungsexperimente .....	63
IV.1.7.6	Bindungscharakteristika des Aptamers ST-146 .....	67
IV.1.7.7	Bestimmung der Bindungskonstante des Spiegelmers ST-146.....	74
IV.1.7.8	Bindung von <i>Strep-Tag-II</i> -Fusionsproteinen durch Spiegelmer ST-146 .....	75
IV.1.8	<i>Spiegelmere gegen den Spiegel-Tag</i> .....	83
IV.1.8.1	<i>Spiegel-Tag-SELEX</i> .....	83
IV.1.8.2	Primärstrukturanalyse <i>Spiegel-Tag</i> -bindender Aptamere.....	84
IV.1.8.3	Bindungsaffinitäten der <i>Spiegel-Tag</i> -Aptamere .....	87
IV.1.8.4	Aptamer SP-56.....	88
IV.1.8.5	Spiegelmer SP-56.....	92
IV.2	KRISTALLISATION UND STRUKTURAUFKLÄRUNG VON NUKLEINSÄUREN.....	94
IV.2.1	<i>Kristallisation und röntgenkristallografische Analyse einer LNA-Doppelhelix</i> .....	94
IV.2.2	<i>Struktur einer LNA/LNA-Doppelhelix</i> .....	96
IV.2.3	<i>Kristallisation des D-Strep-Tag-II-bindenden Aptamers ST-146-A</i> .....	96
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>99</b>
V.1	<i>IN VITRO</i> SELEKTIONEN GEGEN PEPTIDE.....	99
V.2	<i>STREP-TAG-II</i> -BINDENDE APTAMERE .....	101
V.3	CHARAKTERISIERUNG DER <i>STREP-TAG-II</i> -BINDUNG DURCH ST-146 .....	103
V.4	ANWENDUNG: DETEKTION EINES <i>STREP-TAG-II</i> -FUSIONSPROTEINS DURCH DAS SPIEGELMER ST-146.....	104
V.5	<i>SPIEGEL-TAG</i> -BINDENDE APTAMERE .....	106
V.6	SP-56 .....	107
V.7	KRISTALLISATION UND STRUKTURAUFKLÄRUNG EINER LNA/LNA-DOPPELHELIX.....	107
V.8	KRISTALLISATION DES <i>STREP-TAG-II</i> - BINDERS ST-146-A .....	108
	AUSBlick .....	108
	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>111</b>
	<b>SUMMARY</b> .....	<b>112</b>
	<b>REFERENZEN</b> .....	<b>113</b>
	<b>EIGENE PUBLIKATIONEN</b> .....	<b>127</b>
	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>128</b>
	<b>LEBENSlauf</b> .....	<b>129</b>
	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>130</b>
	<b>ANHANG</b> .....	<b>132</b>



# I. EINLEITUNG

---

Lange Zeit wurden *messenger* Ribonukleinsäuren (mRNAs), *transfer* RNAs (tRNAs) und ribosomale RNAs (rRNAs) als die einzig vorkommenden RNA-Moleküle betrachtet. Ihre Funktion wurde in der Informationsübertragung (mRNA und tRNA) und in der Strukturbildung des Ribosoms (rRNA) gesehen. In den frühen Jahren der 1980er Jahre begann sich das Bild zu wandeln, als entdeckt wurde, dass RNA auch katalytisch wirken kann (1; 2). Diese Entdeckung führte in der Folgezeit zu einer neuen Sicht auf die Eigenschaften und Funktionen der RNA. Sowohl in prokaryontischen, als auch in eukaryontischen Zellen wurden RNAs identifiziert, welche eine wichtige Rolle in regulatorischen Prozessen spielen (3; 4). Seit ihrer Entdeckung 1993 (5) zeigte sich, dass *micro* RNAs viele Schritte der Genexpression kontrollieren (6).

Auch die Anwendung synthetischer Nukleinsäuren in den Bereichen Diagnostik und Therapie von Krankheiten oder der Biosensorik erfuhr in den letzten beiden Jahrzehnten eine rasante Entwicklung. Hier sind neben den Aptameren vor allem die *Antisense*-Technologie und siRNAs (*small interfering RNAs*) von großer Bedeutung (7-10). Letztere binden durch komplementäre Basenpaarung direkt an die mRNA und entfalten so ihre Wirkung (11; 12).

Aptamere sind kurze, einzelsträngige RNA- oder Desoxyribonukleinsäure-Moleküle (DNA), die eine komplexe dreidimensionale Struktur ausbilden (13; 14). Dies ist die Grundlage für die hochaffine und -spezifische Bindung an ein Zielmolekül oder eine Zielstruktur (15; 16). Für die Auswahl der Zielmoleküle beziehungsweise Zielstrukturen gibt es hierbei theoretisch keinerlei Begrenzung, Aptamere können Aminosäuren, Antibiotika, Peptide, Proteine, Viren oder sogar ganze Zellen binden (17; 18). Die Bindung besteht dabei immer aus einer für die Struktur speziellen Kombination aus nicht-kovalenten Bindungsarten; zu diesen zählen Wasserstoffbrückenbindungen, Van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen (19; 20).

Die *in vitro* Selektion von Nukleinsäuren ist die Methode, mit der diese hochstrukturierten Binder aus einer kombinatorischen Bibliothek von Nukleinsäuren angereichert werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde die *in vitro* Selektion von Nukleinsäuren eingesetzt, um affine und spezifische Binder gegen Peptide zu generieren. Das Affinitätssystem bestehend aus Aptamer und Peptidzielmolekül kann zur Detektion und Affinitätsaufreinigung rekombinanter Proteine eingesetzt werden.

## I.1 APTAMERE

### I.1.1 IN VITRO SELEKTION VON NUKLEINSÄUREN

1990 erschienen unabhängig voneinander drei grundlegende Arbeiten zur *in vitro* Selektion von Nukleinsäuren. Tuerk und Gold identifizierten einen RNA-Liganden der DNA-Polymerase des Bakteriophagen T4 (14). Sie prägten für die Technik den Namen SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, Systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung). Zeitgleich veröffentlichten Ellington und Szostak die Identifizierung von RNA-Liganden gegen verschiedene organische Farbstoffe (13). Sie nannten die erhaltenen RNA-Moleküle *Aptamere*, abgeleitet vom lateinischen Wort *aptus* für passend und dem griechischen *meros* für Teil. Diese Wortwahl veranschaulicht die „Schlüssel-Schloss-Beziehung“ zwischen Aptameren und ihren Bindungspartnern. Die dritte der 1990 zur *in vitro* Selektion von Nukleinsäuren veröffentlichten Arbeiten gelang Robertson und Joyce, welche ein Ribozym selektierten, das einzelsträngige DNA schneidet (21).

#### I.1.1.1 Die Bibliothek

Den Ausgangspunkt für den eigentlichen Prozess der *in vitro* Selektion bildet eine durch Festphasensynthese hergestellte kombinatorische Nukleinsäure-Bibliothek (Abbildung I-1) aus zumeist  $10^{14}$  bis  $10^{15}$  verschiedenen Sequenzmotiven (22).



**Abbildung I-1: DNA-Bibliothek als Ausgangspunkt für die *in vitro* Selektion von Nukleinsäuren.** Zwei konservierte Sequenzen flankieren einen Bereich mit zufälliger Sequenz, wobei an jeder Stelle X eines der Nukleotide A, T, G oder C stehen kann. Jedes Molekül in der Bibliothek besitzt innerhalb des Zufallsbereiches eine unterschiedliche Basenabfolge und somit letztlich eine unterschiedliche Struktur. Die konservierten Primersequenzen werden für die Vermehrung der Moleküle in der Polymerasekettenreaktion benötigt. Im Falle einer RNA-*in vitro* Selektion bildet ebenfalls eine chemisch synthetisierte DNA-Bibliothek den Ausgangspunkt. Diese wird zunächst mittels einer Polymerasekettenreaktion in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Hierbei wird ein *Forward* Primer verwendet, der den T7-Promoter in das Molekül einführt. Dieser wird in der anschließenden T7 Transkription benötigt, bei der die DNA in RNA umgeschrieben wird. Die erhaltene RNA-Bibliothek kann anschließend in die Selektion eingesetzt werden.

Für die *in vitro* Selektion ist die Diversität der Bibliothek von entscheidender Bedeutung, wobei diese mit steigender Länge des Zufallsbereiches zunimmt. Für eine Länge des Zufallsbereiches von beispielsweise 50 Nukleotiden gäbe es  $4^{50}$ , also  $1,3 \times 10^{30}$



der Evolution - Selektion auf Grund eines bestimmten Merkmals und Vermehrung auf Grund der Durchsetzung dieses Merkmals in einer Population - im ‚Reagenzglas‘ nachgeahmt werden.

Einer der wichtigsten Schritte des gesamten SELEX-Verfahrens ist die effiziente Trennung der bindenden Moleküle von nicht-bindenden während der Selektion. Die Bibliothek kann hierzu entweder zu dem an eine feste Phase immobilisierten Zielmolekül hinzugegeben werden oder die Komplexbildung des Aptamers mit dem Zielmolekül findet frei in Lösung statt.

Für die Immobilisierung des Zielmoleküls an eine feste Phase stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Am häufigsten werden Partikel mit Streptavidinbeschichtung eingesetzt (26; 27). Das biotinylierte Zielmolekül wird hierbei unter der Ausnutzung der starken Bindung zwischen Streptavidin und Biotin (die Bindungskonstante liegt im femtomolaren Bereich) auf den Partikeln immobilisiert. Des Weiteren werden Partikel eingesetzt, welche Modifikationen zur kovalenten Verknüpfung des Zielmoleküls auf ihrer Oberfläche tragen (28). Häufig besitzen die für *in vitro* Selektionen verwendeten Partikel einen magnetischen Kern. Der Vorteil des Einsatzes von magnetischen Partikeln liegt in ihrer einfachen Handhabung, da die Separierung durch magnetfeldinduzierte Sedimentation herbeigeführt wird. Der gesamte Selektionsprozess kann so beschleunigt oder automatisiert werden. Es werden aber auch nicht-magnetische Partikel verwendet (29; 30), welche durch Zentrifugation sedimentiert werden. Eine weitere Immobilisierungsstrategie beruht auf der Verwendung von Matrices für die Affinitätschromatografie, bestehend aus Sepharose (31) oder Agarose (32; 33) mit verschiedenen Oberflächenmodifikationen.

Eine gebräuchliche Methode für die Separation ohne vorherige Immobilisierung des Bindungspartners ist die Ultrafiltration mittels Nitrocellulosefiltern (14; 34; 35). Der Komplex aus Aptameren und Bindungspartnern verbleibt auf der Membran, während nicht-bindende Nukleinsäure-Moleküle die Membran passieren. Diese Methode ist nur für größere Zielmoleküle oder -strukturen geeignet. Weitere Techniken, die zur Separation innerhalb der *in vitro* Selektion eingesetzt werden sind die Kapillargelelektrophorese (36; 37), *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA; (38)), Durchflusszytometrie (39; 40), Oberflächen-Plasmonen-Resonanz (41) oder Zentrifugation (42).

Der Einsatz von Streptavidin-beschichteten Partikeln ist auch bei der Separation ohne vorherige Immobilisierung des Bindungspartners möglich. Hierbei werden nach der Bildung des Komplexes aus Aptameren und Bindungspartner die Partikel zugegeben und somit der Komplex aus der Lösung separiert.

Nach der Separation des Komplexes kann dieser entweder direkt in die Amplifikationsreaktion eingesetzt werden (43; 44) oder die gebundene Nukleinsäure wird vom Bindungspartner eluiert. Hierzu werden Methoden oder Substanzen verwendet, welche

eine Denaturierung der Nukleinsäure zur Folge haben. Durch die Denaturierung wird die komplexe Faltung der DNA oder RNA aufgelöst und somit die Bindung unterbrochen. Beispiele für Techniken zur Elution sind die Hitzedenaturierung (18) oder die Zugabe denaturierender Substanzen wie Harnstoff, SDS (Natriumdodecylsulfat) oder EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure, (34; 45; 46)).

Anschließend findet eine Vermehrung der eluierten Moleküle durch die Polymerasekettenreaktion und eine Vorbereitung der Moleküle für die nächste Runde der *in vitro* Selektion statt. Hierbei unterscheidet sich die RNA- von der DNA-*in vitro* Selektion. Eluierte RNA-Moleküle werden zunächst mittels einer reversen Transkription in DNA umgeschrieben. Anschließend erfolgt eine Amplifikation der Moleküle durch die Polymerasekettenreaktion, gefolgt von einer T7 *in vitro* Transkription, in der die doppelsträngige DNA in einzelsträngige RNA umgeschrieben wird. Somit wird eine einzelsträngige RNA-Bibliothek für die nächste Runde der *in vitro* Selektion erhalten.

Die Bibliothek einer DNA-*in vitro* Selektion dagegen muss nach der Amplifikation in der Polymerasekettenreaktion einer Methode zur Generierung von einzelsträngiger DNA unterzogen werden, da für die nächste Runde nur der Aptamerstrang des DNA-Doppelstranges weiterverwendet wird. Zur Abtrennung des Matrizenstranges stehen verschiedene Techniken zur Verfügung. Beispiele hierfür sind die Strangtrennung durch asymmetrische PCR (47), durch das Streptavidin-Biotin-System (48) oder durch die Verwendung eines modifizierten Matrizenstranges und anschließender Gelaufreinigung des Aptamerstranges (49).

Eine zeit- und kostengünstige Methode ist die DNA-Doppelstrangtrennung mittels des  $\lambda$ -Exonuklease-Systems (50). Hierbei wird bei der Polymerasekettenreaktion ein phosphorylierter *Reverse* Primer verwendet, wodurch der phosphorylierte Matrizenstrang später ein Substrat für das Enzym  $\lambda$ -Exonuklease darstellt, welche spezifisch den phosphorylierten Strang einer doppelsträngigen DNA abbaut (51; 52). Die erhaltene einzelsträngige DNA wird anschließend einer neuen Selektionsrunde unterzogen.

Um eine Anreicherung von Sequenzen zu verhindern, welche spezifisch oder unspezifisch an die Selektionsmatrix binden wird entweder ab der ersten Runde oder ab einer der späteren Runden einer *in vitro* Selektion zumeist eine Präselektion durchgeführt. Hierbei wird die Nukleinsäure-Bibliothek mit der Selektionsmatrix ohne den immobilisierten Bindungspartner inkubiert und anschließend nur der Teil für die folgende Runde verwendet, welcher nicht an die Matrix gebunden vorliegt.

Im Gesamten wird der Prozess aus wechselnder Selektion und anschließender Vermehrung bindender Sequenzen solange wiederholt, bis sich die stärksten Binder in der Bibliothek angereichert haben. Diese sollten auf Grund der hohen Diversität der Ausgangsbibliothek

bereits in dieser enthalten sein (53). Zumeist dauert eine Anreicherung bindender Sequenzen 6 - 15 Runden (54).

Obwohl die Komplexität der Ausgangsbibliothek mit jeder Runde verringert wird, besteht die Bibliothek nach der letzten *in vitro* Selektionsrunde immer noch aus verschiedenen Sequenzen. Um diese zu isolieren und einzeln analysieren zu können, wird die Bibliothek der letzten Runde in einen Vektor kloniert. Die Vektorbibliothek wird in *Escherischia coli* (*E.coli*) transformiert und so vereinzelt. Die erhaltenen Plasmide werden aus den Bakterien isoliert, sequenziert und die Aptamere auf ihre Bindungseigenschaften untersucht.

Die Detektion der Anreicherung von bindenden Molekülen während des *in vitro* Selektionsvorgangs wird durch eine geeignete Markierungsmethode erreicht. Hierzu wird die Nukleinsäure vor jeder Runde radioaktiv markiert (13; 55; 56), was die Detektion vergleichsweise geringer Mengen Nukleinsäure erlaubt, jedoch ein gesundheitliches Risiko und das Problem der Entsorgung des radioaktiven Abfalls mit sich bringt. Eine weitere Möglichkeit zur Quantifizierung bietet der Einsatz fluoreszierender Reportergruppen (39; 42; 57).

## I.1.2 ANWENDUNG UND BEDEUTUNG VON APTAMEREN

Die durch *in vitro* Selektion gewonnen Aptamere binden ihre Bindungspartner gewöhnlich mit hoher Affinität, die  $K_d$ -Werte der Bindungen liegen zumeist im nanomolaren oder sogar im picomolaren Bereich (58; 59). Zudem ist die Bindung eines Aptamers an sein Zielmolekül eine hochspezifische Interaktion: Aptamere sind in der Lage Zielmoleküle zu unterscheiden, welche sich beispielsweise nur durch die An- beziehungsweise Abwesenheit einer Methylgruppe (58; 60) oder einer Hydroxylgruppe (61; 62) unterscheiden. Aptamere wurden gegen eine Vielzahl von verschiedenen Molekülen oder ganzen biologischen Einheiten selektiert, Tabelle I-1 gibt hierzu einen Überblick.

Die Eigenschaft ein Zielmolekül oder eine Zielstruktur hochspezifisch und hochaffin zu binden teilen Aptamere mit monoklonalen Antikörpern (54). Aptamere haben jedoch Eigenschaften, die denen von Antikörpern in einigen Gebieten überlegen sind. Hierzu zählt, dass Aptamere bisher keine oder nur sehr geringe Immunogenität zeigen; im Tiermodell konnte bisher keine Immunreaktion gegen ein therapeutisches Aptamer nachgewiesen werden (63).

Ein weiterer Vorteil ist die Herstellung von Aptameren mittels chemischer Synthese (64). Diese Herstellungsart ist vergleichsweise kostengünstig und es können problemlos maßgeschneiderte chemische Modifikationen eingeführt werden, etwa zur Stabilitätserhöhung oder der verbesserten pharmakologischen Wirkung des Aptamers. Zudem wird mittels dieser Herstellung eine hohe Reproduzierbarkeit erreicht.

# EINLEITUNG

**Tabelle I-1: Ausgewählte Zielmoleküle oder Zielstrukturen, gegen welche Aptamere generiert worden sind.** Die erste Spalte bezeichnet die Stoffklasse oder biologische Einheit, die zweite Spalte gibt das jeweilige Beispiel mit Quelle (Spalte drei) an.

Bindungspartner	Quelle
<b>Ionen</b>	Zn <sup>2+</sup> (65)
<b>Farbstoffe</b>	Malachitgrün (66)
<b>Nukleotide</b>	ATP (61)
<b>Aminosäuren</b>	L-Arginin (67)
<b>Antibiotika</b>	Streptomycin (68)
<b>Peptide</b>	Vasopressin (69) Substance P (70)
<b>Vitamine</b>	Vitamin B12 (71)
<b>Nukleinsäuren</b>	HIV-1 mRNA (72)
<b>Enzyme</b>	HIV-Reverse Transkriptase (73)
<b>Wachstumsfaktoren</b>	<i>Platelet-derived Growth Factor</i> (74)
<b>Immunglobuline</b>	Immunglobulin E (75)
<b>Viren</b>	Rous Sarcoma Virus (76)
<b>Blutkörperchen</b>	Humane rote Blutzellen (77)
<b><i>E.coli</i> Ribosomen</b>	Ribosomales Protein S1 (78)
<b>Zellen</b>	Tenascin-C (79)

Ein weiterer Vorteil von Aptameren gegenüber Antikörpern ist die Gewinnung der Moleküle *in vitro*. Aptamere können gegen kleine, nicht immunogene oder toxische Moleküle generiert werden, wohingegen bei der Erzeugung von Antikörpern nicht auf ein biologisches System verzichtet werden kann.

Die wachsende Anzahl an Publikationen, die sich auf Aptamere bezieht, unterstreicht deren zunehmende Akzeptanz und den wachsenden Einsatz für die Grundlagenforschung und für medizinische Anwendungen (80-82). Eines der Haupteinsatzgebiete für Aptamere ist die klinische Anwendung. Da Aptamere eine begrenzte Zellmembranpermeabilität aufweisen, werden zumeist extrazelluläre Proteine als Zielmoleküle ausgewählt. 2004 wurde durch die amerikanische Zulassungsbehörde FDA (*Food and Drug Administration*) das erste auf Aptameren basierende Medikament in den USA zugelassen. 2006 erfolgte die Zulassung auch in Europa (83; 84). Dieses unter dem Namen *Macugen* oder *Pegaptanib* bekannte, stark modifizierte RNA-Aptamer wurde 1998 gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) selektiert (85). Es wird zur Behandlung der feuchten altersbedingten Makuladegeneration eingesetzt (63; 86-91). Weitere Aptamere befinden sich derzeit in klinischen Studien beziehungsweise in präklinischen Testphasen. Hierzu gehören beispielsweise die als Antikoagulantien eingesetzten Aptamere gegen Thrombin (92) und Faktor IXa (93).

Neben der Anwendung als Therapeutika eignen sich Aptamere auch als Diagnostika. Hierbei werden sie vor allem auf dem Gebiet der *in vivo* Bildgebung (*in vivo Imaging*) eingesetzt, da bildgebende Elemente wie fluoreszierende Gruppen sehr leicht während der

Synthese des Aptamers eingebracht werden können. Die Detektion von pathogenen Zellen oder Geweben in der Tumorforschung ist hierfür ein Beispiel (79). Weitere Beispiele sind die HIV-Diagnostik (Humanes Immundefizienz-Virus, (94)) oder die Entwicklung aptamerbasierender Mikrochips für analytische Zwecke (95; 96).

Neben der medizinischen Anwendung werden Aptamere zunehmend als Analyten in verschiedenen Systemen zur Detektion von Biomolekülen eingesetzt (97; 98), da sie die sensitive Erkennung einer großen Bandbreite von Molekülen ermöglichen. Aptamere werden in modifizierten *Enzyme Linked Immunosorbent Assays* (ELISAs, (99; 100)) und *Western-Blot*-Analysen (27) eingesetzt, wobei sie hier in Konkurrenz zu antikörperbasierenden Systemen stehen. Aptamere werden zudem als hochspezifische Liganden in der Affinitätschromatografie (101), in der Affinitätskapillarelektrophorese (102) und in der Durchflusszytometrie (103) eingesetzt. Außerdem werden sowohl DNA- als auch RNA-Aptamere zur Separation und Aufreinigung von Proteinen und kleinen Molekülen verwendet (104).

### I.1.3 STABILITÄT VON APTAMEREN

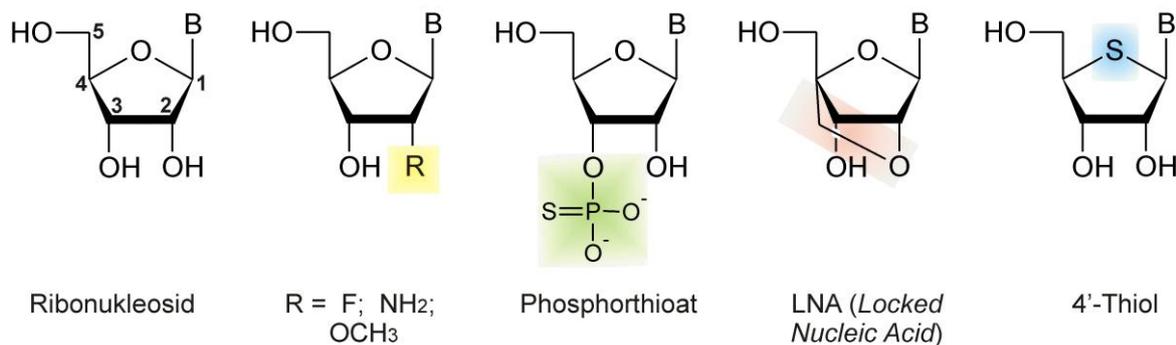
Einer der größten Nachteile für den Einsatz von Aptameren in verschiedenen Anwendungsgebieten ist deren mangelnde Stabilität. Sowohl DNA-, aber vor allem RNA-Aptamere sind stark vom Abbau durch Nukleasen betroffen. Die Hydroxylgruppe der C2'-Position der Ribose besitzt eine hohe Reaktivität, was zu einem Angriff auf die benachbarte Phosphodiesterbindung und zur Bildung eines zyklischen 2', 3'-Phosphodiesters führt. In der Folge kommt es zu einem Bruch im Phosphatrückgrat des Aptamers (105). Diese Reaktion wird sowohl von einigen Übergangsmetallen, als auch von vielen in biologischen Medien präsenten Ribonukleasen katalysiert. Das Resultat ist eine stark verminderte Lebensdauer der Aptamere (106; 107), was eine Anwendung im diagnostischen oder medizinischen Bereich stark einschränkt.

Um dieses Hindernis zu umgehen steht eine Vielzahl unterschiedlicher Methoden zur Stabilisierung von Aptameren zur Verfügung (108), wobei grundsätzlich zwischen prä- und post-*in vitro* Selektions-Modifikationen unterschieden werden muss. Abbildung I-3 fasst diese Modifikationen zusammen.

Im Falle von prä-Selektions-Modifikationen werden die Veränderungen bereits vor und während dem Selektionsvorgang in die Nukleinsäuren eingebracht, indem modifizierte Bibliotheken benutzt werden. Dies hat den Vorteil, dass die Modifikation nicht zu einer Einschränkung beziehungsweise zum Verlust der Bindung an den Bindungspartner führt. Allerdings können hierbei nur Modifikationen verwendet werden, welche von den eingesetzten Enzymen während der Amplifikations- und Vorbereitungsschritte innerhalb der Selektionsrunden toleriert werden. Hauptsächlich werden RNA-Bibliotheken an der C2'-

Position der Ribose modifiziert, indem die 2'-OH-Gruppe der Pyrimidine durch eine 2'-NH<sub>2</sub>-Gruppe oder eine 2'-F-Gruppe (109; 110) ersetzt wird. Ist die aus der *in vitro* Selektion resultierende Aptamersequenz jedoch sehr purinreich, trägt diese Modifikation nur schwach zu einer verbesserten Stabilität bei. Des Weiteren werden Bibliotheken verwendet, bei denen einer der nicht-bindenden Sauerstoffe der Phosphatgruppe durch Schwefel ersetzt wird (111).

Im Falle von post-SELEX-Modifikationen werden diese nach abgeschlossener *in vitro* Selektion an das Aptamer angebracht. Hierbei besteht die Gefahr, dass solche Modifikationen die Bindungsfähigkeit des Aptamers mit seinem Bindungspartner stark herabsetzen oder ganz unterbinden. Gründe hierfür können die Veränderung der spezifischen Faltung des Aptamers sein, eine Störung des Kontakts zwischen den Bindungspartnern oder eine Kombination beider Möglichkeiten (112). Beispiele für post-SELEX-Modifikationen sind der Austausch der 2'-OH-Gruppe der Ribose gegen 2'-F-, 2'-NH<sub>2</sub>-oder 2'-O-Methylgruppen (85; 109).



**Abbildung I-3 Modifikationen zur Stabilisierung von RNA-Aptameren.** Zur Stabilisierung von RNA-Aptameren werden verschiedene Modifikationen an der Ribose vorgenommen. Die bevorzugte Position für Modifikationen ist die C2'-Position. Die 2'-Hydroxylgruppe wird entweder durch reaktionsträge Gruppen substituiert (Nucleosid 2) oder durch die Einführung einer Methylenbrücke zum C4' blockiert (Nucleosid 4). Weiterhin wird das gesamte Phosphatrückgrat durch die Einführung von Phosphorthioaten modifiziert (Nucleosid 3). Eine weitere Modifikation besteht in der Substitution des ringinternen Sauerstoffs durch eine Sulfidgruppe.

Die 5'- und 3'-Enden der Moleküle werden mit verschiedenen Kappen versehen, die vor einem Abbau durch Exonukleasen schützen sollen. Hierbei werden zum Beispiel invertierte Thymidine als 3'-3'-Kappe (90) oder verschiedene 5'-Kappen, modifiziert mit Aminen, Phosphaten oder PEG (Polyethylenglykol) eingesetzt (113; 114). Eine weitere Strategie zur Stabilisierung von Aptameren ist der Einsatz von sogenannten *Locked Nucleic Acids* (115; 116).

Eine andere Stabilisierungsmethode betrifft die Bioverfügbarkeit von Aptameren in biologischen Seren. Therapeutisch eingesetzte Aptamere werden oft am 5'- oder am 3'-Ende mit PEG-Einheiten versehen, um die Halbwertszeit der Aptamere nach intravenöser Injektion

deutlich zu erhöhen und die vorzeitige renale Ausscheidung zu vermeiden. Das bereits erwähnte Aptamer *Pegaptanib* zum Beispiel trägt neben verschiedenen prä- und postselektiv eingebrachten Modifikationen zusätzlich zur Verhinderung der vorzeitigen renalen Ausscheidung eine 40 kDa große PEG-Kappe am 5'-Ende (90).

Ein vollkommen anderer Ansatz zur Stabilisierung hochaffiner Nukleinsäuren wurde 1996 von Fürste und seinen Mitarbeitern mit der Anwendung der Spiegeltechnik auf die *in vitro* Selektion von Nukleinsäuren entwickelt (117; 118).

## I.2 SPIEGELMERE

### I.2.1 SPIEGELTECHNIK

Der Nachteil der Anwendung von Aptameren besteht in ihrer begrenzten Halbwertszeit durch die Degradation durch Nukleasen. Um das Stabilitätsproblem zu lösen entwickelte Fürste 1996 (117; 118) eine Variation der „Reflektionsselektion“, welche durch die Pionierarbeit von Peter Kim und Mitarbeitern begründet wurde (119). Diese selektierten in einer Abwandlung der Methode des Phagen-*Display*, die sie *Mirror-Image Phage Display* nannten, proteolytisch resistente D-Peptide als Liganden eines Proteins in seiner natürlich auftretenden Händigkeit L.

Fürste und Mitarbeiter publizierten 1996 die Selektion von nukleasestabilen L-RNAs gegen D-Adenosin (117) und gegen L-Arginin (118). Sie prägten für die Moleküle den Namen Spiegelmere. Spiegelmere besitzen alle Vorteile von Aptameren bezüglich der Bindungsspezifität und -affinität, werden aber aufgrund der Enantioselektivität von Desoxy- und Ribonukleasen nicht erkannt und demnach auch nicht abgebaut.

Der theoretische Hintergrund der Spiegeltechnik beruht auf der Chiralität (Abbildung I-4), beziehungsweise Händigkeit der Moleküle. Als chiral werden Gegenstände oder Systeme bezeichnet, die durch Drehung nicht zur Deckung mit ihrem eigenen Spiegelbild gebracht werden können, ein Beispiel hierfür ist die rechte und die linke Hand.

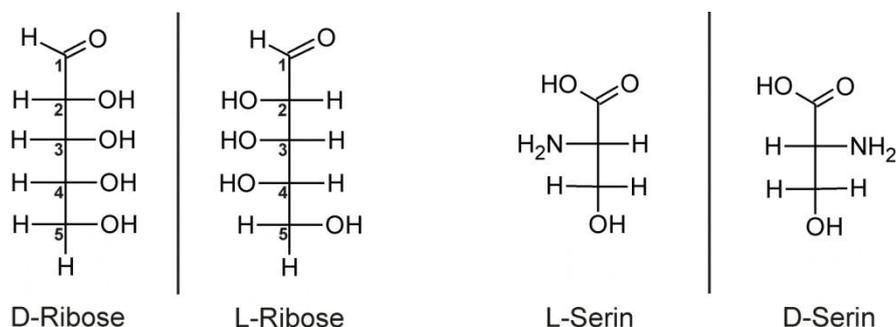


**Abbildung I-4: Chiralität.** Die Chiralität (Händigkeit) gibt die Eigenschaft eines Gegenstandes oder eines Moleküls an, dass sich Bild und Spiegelbild nicht durch Drehung zur Deckung bringen lassen. Sowohl die rechte und die linke Hand des Menschen (links), als auch rechts- und linksdrehende Schneckenhäuser (rechts, (120)) sind chirale Beispiele aus der Natur.

Auf molekularer Ebene kann ein Molekül durch ein Atom ein stereogenes Zentrum besitzen oder mehrere Atome bilden mehrere stereogene Zentren innerhalb des Moleküls. Des Weiteren kann die gesamte Molekülgestalt die Chiralität bestimmen. Die zwei spiegelbildlichen Formen eines Moleküls werden als Enantiomere bezeichnet. Die Mischung zweier Enantiomere ist ein racemisches Gemisch.

Bis auf wenige Ausnahmen (121; 122) bestehen alle natürlich vorkommenden Biomoleküle aus Monomeren der gleichen Chiralität, dies wird als Homochiralität bezeichnet. In allen Naturstoffklassen liegt jeweils ein Enantiomer bevorzugt, beziehungsweise ausschließlich vorhanden vor. So bestehen Proteine aus L-Aminosäuren und Polysaccharide aus verknüpften D-Zuckern. Natürlich vorkommende Nucleinsäuren enthalten ausschließlich D-Ribose beziehungsweise D-Desoxyribose und werden daher als D-Nucleinsäuren bezeichnet.

Ein Spiegelmer ist das stereochemische Spiegelbild eines ‚natürlichen‘ D-Aptamers. Die Spiegelung des Aptamers erfolgt durch die Synthese des Spiegelmers aus L-Nucleotiden, bei welcher statt der natürlichen D-Ribose L-Riboseeinheiten verwendet werden (Abbildung I-5 links). Für die Generierung von Spiegelmeren muss das Zielmolekül zunächst ebenfalls in gespiegelter Form vorliegen. Handelt es sich hierbei um ein Peptid, wird das gespiegelte Zielmolekül durch chemische Peptidsynthese dargestellt, bei der ausschließlich unnatürliche D-Aminosäuren (Abbildung I-5 rechts) als monomere Bausteine verwendet werden.

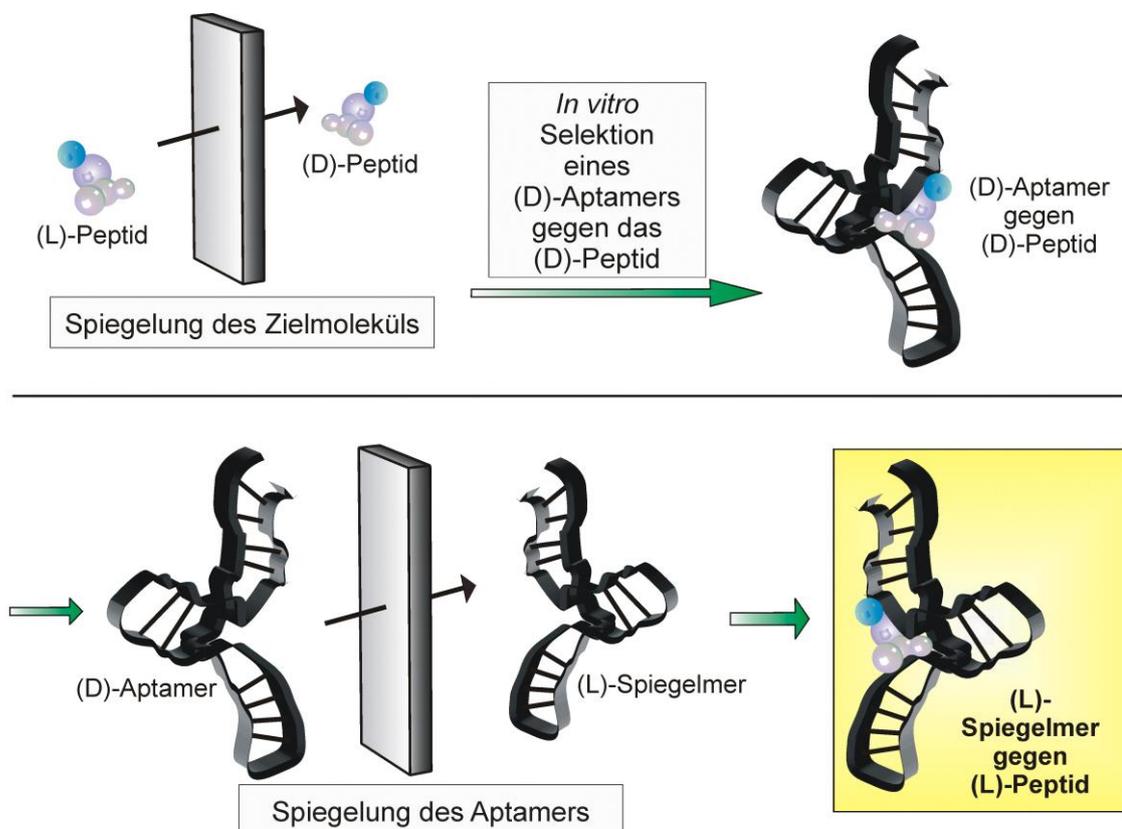


**Abbildung I-5: Enantiomere der Ribose (links) und der Aminosäure Serin (rechts).** Die Spiegelung eines Aptamers in das korrespondierende Spiegelmer erfolgt durch die Synthese des Spiegelmers aus L-Monomeren. Diese enthalten L-Ribose statt der natürlich vorkommenden D-Ribose. Die für die Selektion von Spiegelmeren verwendeten gespiegelten Peptide werden mittels der Synthese aus D-Aminosäuren dargestellt. Proteine in der Natur bestehen nahezu ausschließlich aus L-Aminosäuren.

Das Prinzip der Spiegeltechnik beruht auf einem einfachen Konzept: Wenn ein D-Aptamer sein natürliches L-Zielmolekül bindet, dann bindet demnach auch das Spiegelbild des Aptamers das Spiegelbild des natürlichen Liganden gleichermaßen. Wird der Prozess der *in vitro* Selektion von Nucleinsäuren gegen ein unnatürliches Spiegelbild des Zielmoleküles (zum Beispiel ein D-Peptid) durchgeführt, dann wird als Ergebnis ein D-Aptamer erhalten

(Abbildung I-6). Durch die Spiegelung des D-Aptamers wird anschließend das enantiomere Spiegelmer durch eine Synthese aus L-Nukleotiden gebildet. Das Spiegelmer bindet dann nach den Regeln der Homochiralität das natürliche Zielmolekül, also das Spiegelbild des in der Selektion verwendeten unnatürlichen Zielmoleküls. Auf diese Weise kann biochemisch ein nukleasestabiles L-Aptamer gegen ein L-Peptid generiert werden.

Mit Hilfe der Spiegeltechnik können sowohl RNA- als auch DNA-Spiegelmerer generiert werden (123). Bezüglich der Bindungsstärken und -affinitäten wurden nahezu identische Werte für Aptamere und korrespondierende Spiegelmerer festgestellt (117; 123).



**Abbildung I-6: Das Prinzip der Spiegeltechnik zur Generierung eines Spiegelmers gegen ein Peptid mittels der *in vitro* Selektion von Nukleinsäuren.** Zunächst wird das Zielmolekül, gegen welches ein Spiegelmer generiert werden soll in seine gespiegelte Form durch Synthese des Peptides aus D-Aminosäuren überführt. Durch den Prozess der *in vitro* Selektion von Nukleinsäuren wird anschließend ein Aptamer gegen das unnatürliche Zielmolekül selektiert. Die Spiegelung dieses Aptamers durch eine Synthese aus L-Nukleotiden ergibt das Spiegelmer, welches das ungespiegelte Peptid bindet.

## I.2.2 ANWENDUNG UND BEDEUTUNG VON SPIEGELMEREN

Spiegelmerer besitzen eine ungleich höhere Stabilität gegenüber dem Abbau durch Nukleasen als Aptamere. Während ein Aptamer im humanen Serum bereits nach wenigen Sekunden abgebaut wird, konnte für Spiegelmerer selbst nach mehreren Tagen in diesem

# EINLEITUNG

Medium kein Abbau detektiert werden (117). Die Verbindung von sehr hohen Affinitäten zu ihrem Zielmolekül und nahezu unbegrenzter Haltbarkeit gegenüber dem Abbau durch Nukleasen machen die Spiegelmerer zu exzellenten Kandidaten als medizinische Wirkstoffe zur Behandlung verschiedener Krankheiten. Nach der Einführung der Spiegeltechnik für die *in vitro* Selektion von Nukleinsäuren durch Fürste und seine Mitarbeiter wurden Spiegelmerer gegen eine Vielzahl von Zielmolekülen entwickelt. Tabelle I-2 fasst die bisher publizierten Spiegelmerer und ihre Zielmoleküle zusammen.

**Tabelle I-2: Spiegelmerer als potentielle Therapeutika.** Die Tabelle gibt einen Überblick über die bisher publizierten Spiegelmerer gegen verschiedene Zielmoleküle. Spalte zwei erläutert in welchen Bereichen das Zielmolekül wirksam ist. Spalte drei bezeichnet die Indikationen für das Spiegelmerer als Therapeutikum. Spalte vier gibt die dazugehörige Quelle und das Jahr an.

Zielmolekül	Wirkungskreis	Indikationen	Jahr; Quelle
<b>Vasopressin</b>	Antidiurese	kongestive Herzinsuffizienz	1997; (69) 2006; (124)
<b>GnRH</b> ( <i>Gonadotropin-Releasing-Hormone</i> )	Beeinflussung steroidabhängiger Sexualhormone	Prostatakrebs; Mammakarzinom; Endometriose	2002; (123; 125)
<b>SEB</b> (Staphylokokken Enterotoxin B)	Bakterielles Toxin	Lebensmittelvergiftung; Rheumatoide Arthritis; Toxischer Schock	2003; (126)
<b><math>\alpha</math>-CGRP</b> ( <i>Migraine Associated Calcitonin Gene Related Peptide</i> )	Vasodilatation	Migräne	2003; (127; 128)
<b>Nociceptin/Orphanin</b>	Regulation von Streß, Angst und Schmerz	Schmerz; Angst	2004; (129)
<b>Ghrelin</b> ( <i>Growth Hormone Release Inducing Peptide</i> )	Regulation von Wachstumshormonen; Nahrungsaufnahme	Adipositas	2004; (130-133)
<b>Substance P</b>	Vasodilatation; Muskelkontraktion; Schmerzübertragung	Schmerz; Übelkeit; Depression	2005; (134)
<b>CCL2 / MCP-1</b> ( <i>C-C motif ligand 2 / Monocyte Chemotactic Protein-1</i> )	Entzündungsreaktionen	Diabetische Nephropathie	2007; (135-139)
<b>CXCL2 / SDF-1</b> ( <i>C-X-C motif ligand 2 / Stromal Cell-Derived Factor-1</i> )	Mobilität hämatopoetischer Stammzellen	Multiples Myelom	2008; (140)

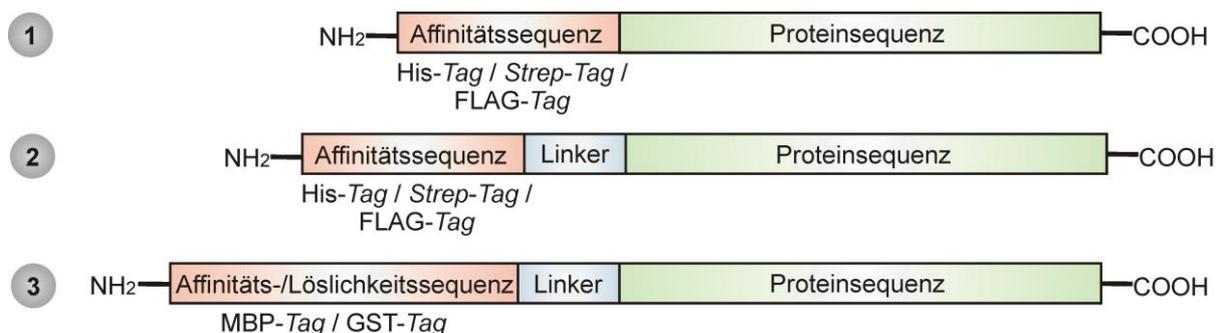
Derzeit befinden sich zwei Spiegelmerer in der klinischen Testphase I. Das entzündungshemmende Spiegelmerer NOX-E36 (138) soll zur Behandlung von diabetischer Nephropathie und anderen Komplikationen im Zusammenhang mit Diabetes eingesetzt werden. Es befindet sich seit Mitte 2010 in der klinischen Testphase Ib, in der es mit

steigenden Mehrfachdosen an Gesunden und Kranken des Diabetes Mellitus Typ II getestet wird.

Das Spiegelmer NOX-A12 befindet sich seit Ende 2009 in der klinischen Testphase I. Es bindet und blockiert das Chemokin SDF-1, wodurch eine erhöhte Freisetzung hämapoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark erreicht wird (140). Das Spiegelmer soll als Therapeutikum für Patienten mit Multiplem Myelom oder Non-Hodgkin-Lymphom eingesetzt werden.

### I.3 AFFINITÄTSPEPTIDE

Mit den rasanten Fortschritten auf den Gebieten der Genomik, Proteomik und Bioinformatik wächst exponentiell auch der Bedarf an Proteinen, die mittels rekombinanter Techniken hergestellt und durch Affinitätschromatografie aufgereinigt werden (141). Bei Ansätzen des Auswahlverfahrens mit Hochdurchsatz (*High throughput screening approaches*) werden zeitgleich Tausende von Proteinen auf ihre Eignung als industrielle Enzyme und für Anwendungen in den Bereichen Therapie und Diagnostik untersucht (142). Um dem Bedarf an rekombinanten Proteinen nachzukommen wurden verschiedene Organismen als Expressionssysteme etabliert, hierzu gehören Bakterien wie *Escherichia coli* (143;144), Hefezellen wie *Saccharomyces cerevisiae* (145; 146) und Insekten- oder Säugerzellen (147; 148).



**Abbildung I-7: Mögliche Konstrukte für die rekombinante Herstellung eines Proteins.** Dargestellt sind verschiedene Fusionsproteine inklusive der Sequenzen, welche zur Affinitätschromatografie und der Entfernung der Affinitätssequenz benötigt werden. Die dargestellten Konstrukte zeigen jeweils nur N-terminale Fusionen. **(1)** Fusionsprotein aus Affinitätssequenz und Proteinsequenz. In diesem Konstrukt wird eine kurze Peptidsequenz, wie das Polyhistidinpeptid oder das *Strep-Tag*-II-Peptid N-terminal mit der Proteinsequenz fusioniert. **(2)** Das Fusionsprotein ähnelt dem Konstrukt (1), jedoch wird in diesem Falle zwischen die Protein- und die Affinitätssequenz ein *Linker* eingefügt. Dieser enthält eine Erkennungssequenz für Endopeptidasen, welche eine Entfernung der Affinitätssequenz von dem nativen Protein ermöglichen. **(3)** Hier besteht die Affinitätssequenz aus einer ganzen Proteindomäne (Beispielsweise dem Maltose-Bindungsprotein) und dem darzustellenden Protein. Diese wird neben der Aufreinigung auch zur erhöhten Löslichkeit des Fusionsproteins eingesetzt. Die mehrere kDa große Domäne wird nach der Chromatografie von dem nativen Protein mittels Endopeptidasen entfernt.

# EINLEITUNG

Methoden wie das Auswahlverfahren von Proteinen mittels Hochdurchsatz wären nicht durchführbar, wenn für jedes einzelne Protein eine individuelle Aufreinigungsstrategie gefunden werden müsste. Daher kommen Affinitätspeptide zum Einsatz, welche mit den Proteinen koexprimiert werden. Ganz verschiedene Proteine können so mittels ein und derselben Methode exprimiert und aufgereinigt werden.

Affinitätssequenzen bestehen aus einer Peptid- oder Proteinsequenz, welche N- oder C-terminal fusioniert mit dem aufzureinigenden Protein koexprimiert wird. Abbildung I-7 zeigt schematisch den Aufbau solcher Fusionsproteine. Die Affinitätssequenz besitzt eine hohe Affinität zu einem biologischen oder chemischen Liganden und wird nach der Expression durch Affinitätschromatografie aufgereinigt. Abhängig von der nachfolgenden Anwendung erfolgt anschließend eine Entfernung des Affinitätspeptides von dem rekombinanten Protein. Affinitätssequenzen dienen neben der Aufreinigung auch der Immobilisierung und dem Nachweis des fusionierten Proteins. Tabelle I-3 gibt einen Überblick über die gebräuchlichsten Affinitätssysteme.

**Tabelle I-3: Häufig verwendete Affinitätssysteme für die Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine.** Spalte zwei gibt die zur Affinitätssequenz passende Matrix für die Affinitätschromatografie an. In der dritten Spalte sind die Bedingungen für die Elution der jeweiligen Affinitätssequenz angegeben. Die Tabelle fasst Affinitätssequenzen für Streptavidin und dessen Derivat *Strep-Tactin* zusammen (Zeile drei). In Zeile vier und fünf folgen die großen Fusionsaffinitätsproteine (*GST-Tag* und *MBP-Tag*). *Flag-Tag* und *C-myc-Tag* sind Affinitätspeptide, welche durch Antikörper-basierende Chromatografie-Matrices aufgereinigt werden.

Affinitätspeptid/ -protein	Chromatografie- Matrix	Elutions- bedingungen	Quelle
<b>Polyhistidine (<i>Poly-His-Tag</i>)</b>	Ni <sup>2+</sup> -NTA; Talon	Imidazol; niedriger pH-Wert	(149-151)
<b><i>Strep-Tag-II</i>-Peptid</b>	<i>Strep-Tactin</i> (modifiziertes Streptavidin)	Desthiobiotin	(152; 153)
<b>Nano-Tag-Peptid</b>	Streptavidin	Biotin	(154; 155)
<b>Streptavidin-Bindungs- peptid (<i>SBP-Tag</i>)</b>	Streptavidin	Biotin	(156)
<b>Glutathione S-transferase (<i>GST-Tag</i>)</b>	Glutathion	Reduziertes Glutathion	(157)
<b>Maltose-Bindungs-Protein (<i>MBP-Tag</i>)</b>	Quervernetzte Amylose	Maltose	(158)
<b>FLAG-Tag</b>	monoklonaler Antikörper <i>Anti-FLAG</i>	EDTA; ph-Wert 3,0	(159; 160)
<b>C-myc-Tag</b>	Monoklonaler Antikörper <i>Anti-C-myc</i>	Niedriger pH-Wert	(161)

## I.3.1 POLYHISTIDIN-TAG

Der Polyhistidin-*Tag* (*His-tag*) ist das meist verwendete Affinitätspeptid zur Aufreinigung rekombinant exprimierter Proteine. Fusionsproteine mit Polyhistidinresten werden mittels immobilisierter Metallionen aufgereinigt (*immobilized metal-affinity chromatography, IMAC*, (162; 163)). IMAC basiert auf der Interaktion zwischen einem an einer Matrix immobilisierten Übergangsmetall wie Nickel oder Cobalt und dem Imidazolring des Histidins. Hochuli setzte als Erster chelatisierende Nitriloessigsäure (NTA) als Adsorbens für die Chromatografie ein (149; 164). Neben NTA wird häufig TALON als Adsorbens gewählt. TALON besteht aus Cobalt-Carboxymethylaspartat ( $\text{Co}^{2+}$ -CMA), welches an einen Träger wie Sepharose gekoppelt wird und mildere Elutionsbedingungen erlaubt.

Polyhistidinsequenzen können sowohl N- als auch C-terminal verwendet werden. Die Aufreinigung kann unter denaturierenden und unter nativen Bedingungen durchgeführt werden (163). Die Polyhistidinaffinitätsaufreinigung ist nicht für Proteine geeignet, welche Metallionen enthalten. Sowohl Cysteine als auch histidinreiche Regionen der Wirtsorganismen binden an die Aufreinigungsmatrix, was eine relativ hohe Koaufrreinigung unspezifischer Proteine zur Folge haben kann. Der Einsatz von TALON an Stelle von NTA als Affinitätsmatrix verringert unspezifische Bindung, was eine höhere Reinheit des rekombinanten Proteins zur Folge hat (151). Außerdem kann das zur Elution von der Matrix eingesetzte Imidazol die Kristallisation beeinflussen, Kompetitionsstudien stören oder eine Aggregation des Proteins fördern (150).

Tsuji et al. entwickelten 2009 RNA-Aptamere gegen das Polyhistidin-Affinitätspeptid (165). Dieses kann an Stelle von Antikörpern gegen den Polyhistidin-*Tag* zur Detektion des Affinitätspeptides in *Western Blots*, ELISAs oder Immunopräzipitationen eingesetzt werden.

## I.3.2 STREPTAVIDIN-BINDEnde AFFINITÄTS-TAGS

Die Bindung zwischen Streptavidin und Biotin ist die stärkste bekannte, natürlich vorkommende, nicht-kovalente Bindung. Daher gab es Bestrebungen das Streptavidin/Biotin-System für die Affinitätschromatografie rekombinant exprimierter Proteine auszunutzen. Durch Biotin als Elutionsmittel sollte sich jedes an Streptavidin gebundene Affinitätspeptid eluieren lassen. Zunächst wurde 1993 das *Strep-Tag-I*-Peptid entwickelt (166), welches allerdings nur C-terminal an das Protein fusioniert werden kann. Daher wurde das *Strep-Tag-II*-Peptid entwickelt (152). Dieses Oktapeptid kann sowohl N- als auch C-terminal an das entsprechende rekombinante Protein fusioniert werden und gehört heute neben dem Polyhistidin-*Tag* zu den meist verwendeten kurzen Affinitätspeptiden für die Aufreinigung und Detektion rekombinanter Proteine. Das *Strep-Tag-II*-Peptid bindet an Streptavidin mit einer Bindungskonstante von  $K_d = 13 - 72 \mu\text{M}$  (152). Neben dem Affinitätspeptid selbst wurde auch

das Streptavidin für eine bessere Eignung zur Affinitätschromatografie für das *Strep-Tag-II*-Peptid optimiert (153). Diese Streptavidinmutante namens *Strep-Tactin* erlaubt eine Elution des gebundenen Fusionsproteins mittels des Biotinanalogs Desbiotin. Die reversible Bindung des Desbiotins ermöglicht eine Wiederverwendung der Affinitätsmatrix. Das *Strep-Tag-II*-Peptid bindet *Strep-Tactin* mit einer Bindungskonstante von  $K_d = 1 \mu\text{M}$  (153).

Das *Strep-Tag-I*- und das *Strep-Tag-II*-Peptid zeigen Bindungsstärken im zweistelligen micromolaren Bereich, daher wurden weitere Versuche unternommen eine stärkere Bindung zwischen Streptavidin und einem Peptid-Liganden zu erzeugen. 2001 wurde der *SBP-Tag* (*Streptavidin Binding Peptide*) entwickelt, ein Affinitätspeptid mit einer Länge von 38 Aminosäuren, welches Streptavidin mit einer Bindungskonstante im einstelligen nanomolaren Bereich bindet (156; 167).

Alle bis 2003 publizierten Streptavidin-bindenden Affinitätssequenzen besitzen das zentrale Bindungsmotiv aus den Aminosäuren Histidin-Prolin-Glutamin (HPQ-Motiv). Lamla et al. wendeten 2003 die Methode des *Ribosome Displays* an, um Streptavidin-bindende Peptide zu selektieren (154; 155). Der beste Binder, bestehend aus 15 Aminosäuren, wies eine Bindungskonstante von 4 nM auf und besaß kein HPQ-Motiv. Die Verkürzung des Peptides auf neun Aminosäuren bindet mit einem  $K_d$ -Wert von 17 nM an Streptavidin. Dies entspricht einer tausendfach stärkeren Bindung verglichen mit anderen Streptavidin-bindenden Affinitätspeptiden ähnlicher Länge. Auf Grund der Bindung im nanomolaren Bereich wurde das neue Affinitätspeptid *Nano-Tag* genannt.

### I.3.3 FLAG-TAG-AFFINITÄTSPEPTID

Ein weiteres häufig verwendetes Affinitätspeptid ist das *Flag-Tag*-Affinitätspeptid (159). Das hydrophile Peptid ist acht Aminosäuren lang und die Aufreinigung von Fusionsproteinen beruht auf einer Antikörper-basierenden Affinitätsmatrix (160). Das *Flag-Tag*-Peptid kann sowohl N- als auch C-terminal fusioniert werden und erlaubt eine Aufreinigung unter nativen Bedingungen. Die Elution erfolgt entweder durch ein chelatisierendes Reagenz wie EDTA oder durch eine Verringerung des pH-Wertes.

Das *Flag-Tag*-Peptid besitzt eine interne Peptidylschnittstelle für die Endopeptidase Enterokinase (168), was eine Entfernung des Affinitätspeptides von dem nativen Protein erleichtert. Ein Nachteil des *Flag-Tag*-Affinitätssystems ist die geringere Stabilität der Antikörper-basierenden Affinitätsmatrix im Vergleich zu  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA oder *Strep-Tactin*.

## I.4 KRISTALLISATION UND STRUKTURAUFKLÄRUNG

In den vergangenen Jahren stiegen die Erkenntnisse um die Vielzahl der biologischen Funktionen von Nukleinsäuren rapide an. Die Funktion der Moleküle ist hierbei eng mit der Struktur verknüpft. Daher wuchs auch das Interesse der Strukturbiologie die komplexe dreidimensionale Faltung von DNA- und RNA-Molekülen aufzuklären. Die Strukturaufklärung von Nukleinsäuren dient hierbei zum Erkenntnisgewinn bezüglich des Zusammenhangs von Struktur und Funktion des Moleküls. Zur Aufklärung der Tertiärstruktur von Nukleinsäuren auf atomarer Ebene werden die NMR-Spektroskopie (*Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, (169)) und die Röntgenstrukturanalyse (170) eingesetzt.

Für die hochauflösende dreidimensionale Röntgenstrukturanalyse werden Einkristalle mit einem hohen Grad an interner Ordnung benötigt. Zudem muss die zu kristallisierende Probe in ausreichender Menge und hinreichender Reinheit verfügbar sein. Eine häufig angewendete Methode zur Generierung von Kristallen für die Röntgenstrukturanalyse ist die Dampfdiffusion mit hängenden oder sitzenden Tropfen (171).

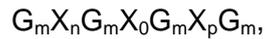
### I.4.1 KRISTALLISATION UND STRUKTURAUFKLÄRUNG VON APTAMEREN

In den vergangenen Jahren wurden mehrere Kristallstrukturen von Aptameren im Komplex mit ihrem Zielmolekül bestimmt (172). Es konnte gezeigt werden, dass das Aptamer eine Art Käfig um das Zielmolekül bildet, wenn es sich bei dem Liganden um ein kleines Molekül handelt (173). Im Falle von Aptameren gegen Nukleinsäure-bindende Proteine dagegen bindet das Aptamer an die Nukleinsäure-Bindungsstelle des Proteins (174). Oft werden hierbei die natürlichen Interaktionen von dem Aptamer imitiert (175).

Ein Beispiel für die röntgenkristallografische Analyse eines Aptamers im Komplex mit dem Zielmolekül ist die Kristallstruktur des Thrombin-bindenden DNA-Aptamers (176; 177). Bis jetzt ist dies die einzige Kristallstruktur eines Aptamers im Komplex mit einem Protein, welches nicht natürlicherweise an Nukleinsäuren bindet. Es wurde gezeigt, dass die DNA hierbei mit einem als *Exosite-1* bekannten Bereich der Oberfläche des Thrombins über Van-der-Waals-Kontakte und Wasserstoffbrückenbindungen interagiert. Das Bindungsmotiv und wesentliches strukturelles Element des Thrombin-bindenden Aptamers bildet eine intramolekulare G-Quadruplexstruktur.

#### I.4.1.1 G-Quadruplexstruktur von Aptameren

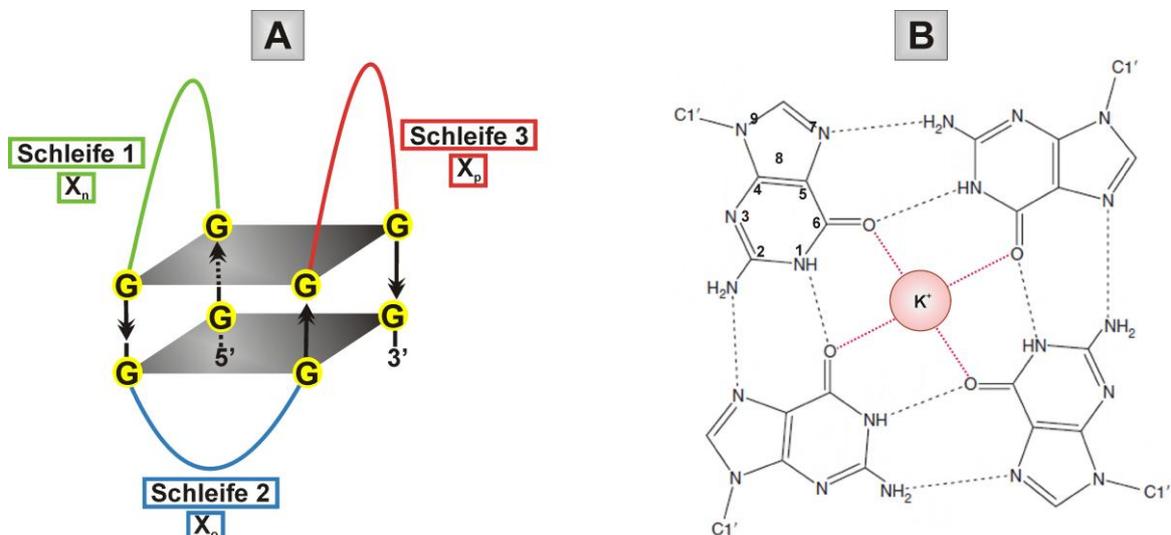
G-Quadruplexstrukturen sind vertikale Anordnungen aus hydrophoben Stapelungen mindestens zweier planarer Guanosinquantette (178; 179). Kommen diese G-Quantette innerhalb eines Moleküls vor, werden diese als unimolekular bezeichnet. Unimolekulare G-Quadruplex-Sequenzen werden mit folgender allgemeingültiger Formel beschrieben (180):



wobei  $m$  die Anzahl der Gs angibt, welche direkt in die Formation der Quadruplexstruktur involviert sind.  $X_n$ ,  $X_0$  und  $X_p$  bezeichnen jegliche Kombination von Nukleotiden, welche sich in den Schleifen befinden, die die planaren G-Quartette umgeben (Abbildung I-8 A). Die Länge dieser Schleifen ist variabel und kann ebenfalls Gs enthalten. G-Quadruplexe können nach der Polarität der Stränge als parallel oder antiparallel eingeordnet werden.

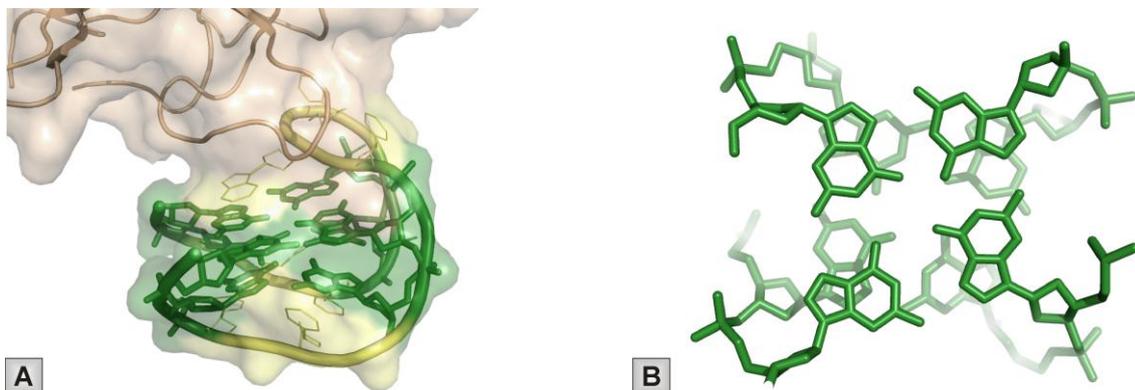
Die G-Quartette der G-Quadruplexe werden durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Weiterhin findet eine zusätzliche Stabilisierung der Anordnung durch die koordinative Bindung eines Kations im Zentrum des G-Quadruplexes statt (Abbildung I-8 B). Grund dafür sind die stark negativen elektrostatischen Potentiale der Guanin-O6-Sauerstoffatome, welche einen zentralen Kanal innerhalb der Quadruplexstruktur formen (178; 179). Es konnte gezeigt werden, dass Kaliumionen einen weitaus stabilisierenderen Effekt auf die G-Quadruplexstruktur haben als Natriumionen (181).

Unimolekulare Quadruplexe können abhängig von der Polarität der Schleifen drei verschiedene Formen bilden; diese werden in den Propeller-, lateralen- und diagonalen Typ unterteilt. Die Art der Schleife kann nur mittels NMR-Spektroskopie oder der Röntgenstrukturanalyse der Moleküle zweifelsfrei aufgeklärt werden.



**Abbildung I-8: (A) Schematische Darstellung eines G-Quadruplexes der Formel  $G_2X_nG_2X_0G_2X_pG_2$  nach Burge et al. (180).** Jeweils vier Guanosinreste formen ein G-Quartett, zwei dieser planaren Anordnungen formen vertikal den G-Quadruplex. Die Schleifen, bestehend aus den Nukleotiden  $X_n$ ,  $X_0$  und  $X_p$ , verbinden die G-Paare untereinander. **(B) G-Quartett einer Ebene eines G-Quadruplexes mit einem Kaliumion im zentralen Kanal.** Die Struktur des G-Quadruplex wird durch ein Wasserstoffbrückennetzwerk stabilisiert. Eine zusätzliche Stabilisierung erfahren G-Quadruplexe durch die geometrische Anordnung von Ionenpaaren durch Elektronen der vier Sauerstoffatome am C6-Atoms des Guanins (182). Diese koordinieren ein monovalentes Kation, wobei Kaliumionen einen stabilisierenderen Effekt haben als Natriumionen (181). Wasserstoffbrückenbindungen sind als schwarze gepunktete Linien dargestellt, die Koordination des Kaliumions als rot gepunktete Linien. C1' bezeichnet das C1'-Atom der Desoxyribose des Guanosins.

G-Quadruplexformationen wurden bei vielen Aptameren identifiziert (183). Beispiele hierfür sind das DNA-Aptamer gegen das Enzym Integrase des HIV (184) oder das DNA-Aptamer gegen das Protein Nucleolin (185). Das bekannteste Beispiel jedoch ist die G-Quadruplexstruktur des Thrombin-bindenden Aptamers (177; 186-188). Abbildung I-9 A zeigt die G-Quadruplexstruktur des Thrombin-bindenden DNA-Aptamers im Komplex mit dem Zielmolekül, Abbildung I-9 B eine Aufsicht auf eine Ebene des G-Quadruplex. Neben der Röntgenkristallografie wurde zur Strukturaufklärung der G-Quadruplexstruktur innerhalb des Thrombin-bindenden Aptamers auch die NMR-Spektroskopie eingesetzt.

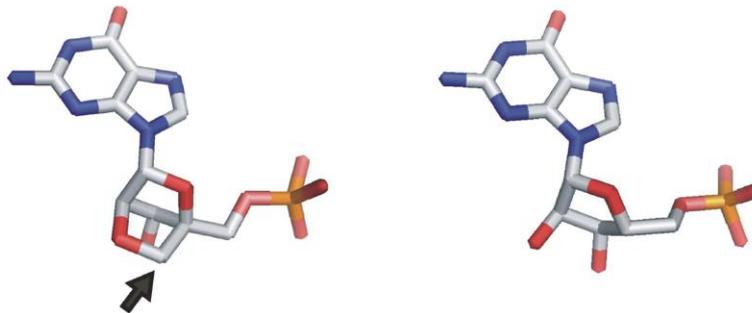


**Abbildung I-9: Die G-Quadruplexformation des Thrombin-bindenden DNA-Aptamers (186).** (A) zeigt die Interaktion des G-Quadruplex des Aptamers mit dem als *Exosite-1* bekannten Bereich des Thrombins. (B) zeigt die Aufsicht auf eine Ebene der G-Quadruplexformation. Unter der ersten Ebene des G-Quartetts ist die zweite Ebene zu erkennen. In (A) und (B) ist das G-Quartett der G-Quadruplexstruktur jeweils in grün dargestellt, die Schleifen des G-Quadruplex in gelb. Das Protein Thrombin ist in beige dargestellt. Die Struktur ist in der Proteindatenbank mit dem Eintrag 1HUT hinterlegt.

## I.4.2 STRUKTURAUFKLÄRUNG VON *LOCKED NUCLEIC ACIDS* (LNAs)

Für einen therapeutischen Einsatz müssen DNA- und RNA-Moleküle stabilisiert werden, um eine längere Anwendungsdauer zu ermöglichen. Zum Schutz der Moleküle vor dem Abbau durch Nukleasen oder zur Erhöhung der Thermostabilität stehen verschiedene Stabilisierungsstrategien bereit (Abschnitt I.1.3).

„Locked“ Nucleinsäuren gehören zu einer Familie zuckermodifizierter Nucleinsäuren. Das bekannteste Beispiel sind 2'-O-4'-C-Methylen- $\beta$ -D-Ribofuranose-modifizierte Nucleotide (LNAs, Abbildung I-10 links), welche zur Stabilisierung von RNA eingesetzt werden (189). Durch die Methylenbrücke zwischen der C2'-Hydroxylgruppe und dem C4'-Atom besitzen LNA-modifizierte RNAs eine erhöhte Nukleaseresistenz und Thermostabilität (190; 191).



**Abbildung I-10: LNA- und RNA-Guanosin.** Im Falle des 2'-O-4'-C-Methylen- $\beta$ -D-Ribofuranose-Nukleotids (links) ist die Ribose durch eine Methylenbrücke zwischen dem Sauerstoff am C2' und dem Kohlenstoff C4' modifiziert. Im Vergleich zu diesem ‚verriegelten‘ Nukleotid ist das unmodifizierte RNA-Monomer (rechts) dargestellt.

Durch die Methylenbrücke der 2'-O-4'-C-Methylen- $\beta$ -D-Ribofuranose wird die LNA in der C2'-*exo*-Konformation ‚verriegelt‘. Dies bewirkt eine Konformation des Phosphatrückgrates, welche sich durch einen geringeren Entropieverlust bei der Ausbildung einer Helix auszeichnet. Die Stapelung der Nukleobasen ist somit innerhalb der Helix effizienter.

Diese Erkenntnisse bezüglich der Struktur und Konformation von LNA-Molekülen wurden mittels der NMR- oder Röntgenstrukturanalyse von Duplexen gewonnen, welche Hybride aus LNA-DNA oder LNA-RNA darstellen (192). Auch die strukturellen Charakteristika von LNA-teilsubstituierten Strängen sind wohldokumentiert (193; 194). Bislang fehlte die Struktur einer komplett aus LNA-Monomeren bestehenden Homoduplex. Diese würde zu einer Vervollständigung der Erkenntnisse bezüglich Aufbau und Struktur dieser modifizierten Nucleinsäuren beitragen.



## II. AUFGABENSTELLUNG

---

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Generierung von Spiegelmeren gegen Affinitäts-*Tags*. Affinitäts-*Tags* sind kurze Peptidsequenzen, welche fusioniert an Proteine der Detektion und Aufreinigung rekombinanter Proteine dienen. Eine sensitive und hochspezifische Erkennung von Affinitätspeptiden wie beispielsweise dem *Strep-Tag-II* ist daher unerlässlich für verschiedene Anwendungen wie der Überwachung des Herstellungsprozesses, der Immobilisierung oder der Affinitätsaufreinigung von Fusionsproteinen. Spiegelmeren, welche gegen Affinitätspeptide gerichtet sind würden solch eine hochaffine und -spezifische Detektion und Affinitätsaufreinigung ermöglichen. Durch ihre hohe Stabilität in biologischen Medien wären die L-Nukleinsäuren besonders für verschiedene Anwendungsgebiete geeignet. Sie würden eine Erweiterung und Verbesserung bereits bestehender Detektionssystemen bedeuten.

Für die Generierung eines Spiegelmers gegen das *Strep-Tag-II*-Peptid soll zunächst eine *in vitro* Selektion zur Erzeugung von D-*Strep-Tag-II*-bindenden Aptameren durchgeführt werden. Die erhaltenen Aptamere sollen bezüglich ihrer Eigenschaften und Bindungscharakteristika untersucht werden. Anschließend soll die Sequenz des bindungsstärksten Aptamers zu einer Synthese des korrespondierenden Spiegelmers verwendet werden. Nachdem die Bindungs-Äquivalenz der Enantiomere sicher gestellt ist, soll anschließend die Bindung von *Strep-Tag-II*-Fusionsproteinen durch dieses Spiegelmer gezeigt werden. An Hand der Ergebnisse soll das Potential des Spiegelmers zur Detektion und Affinitätsaufreinigung von *Strep-Tag-II*-Fusionsproteinen eingeschätzt werden.

Als Weiterentwicklung des Affinitätssystems aus Spiegelmer und Affinitäts-*Tag* soll ein neuer Affinitäts-*Tag* entworfen werden, der sich zum einen optimal als Zielmolekül für eine *in vitro* Selektion eignet und zum anderen für einen Einsatz als *Tag* geeignet ist. Nachdem mittels *in vitro* Selektion Aptamere gegen diesen neuen Affinitäts-*Tag* erhalten worden sind, soll auch hier die Sequenz des bindungsstärksten Aptamers für die Synthese als Spiegelmer ausgewählt werden.

Die im ersten Teil der Arbeit erhaltenen *Strep-Tag-II*-Binder sollen im zweiten Teil der Arbeit kristallisiert werden, um eine röntgenkristallografische Strukturaufklärung der Moleküle zu ermöglichen. Darüber hinaus sollen in weiteren Kristallisationsexperimenten Kristalle einer modifizierten Nukleinsäure gezüchtet werden. Durch die röntgenkristallografische Vermessung soll anschließend erstmals die Struktur einer LNA/LNA-Homoduplex aufgeklärt werden.



### III. METHODEN

#### III.1 ENZYMATISCHE UND MIKROBIOLOGISCHE METHODEN

##### III.1.1 POLYMERASEKETTENREAKTION

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der Vermehrung von DNA-Molekülen. Neben PCR-Reaktionen mit der *Taq*-Polymerase wurden PCR-Reaktionen mit *Phusion*-Polymerase durchgeführt, um sequenzexaktere Amplifikate zu erhalten.

##### III.1.1.1 PCR-Reaktionen mit *Taq*-DNA-Polymerase

PCR-Reaktionen mit *Taq*-Polymerase wurden neben dem Einsatz innerhalb der Selektionsrunden auch für die TA-Klonierung (Abschnitt III.1.4) verwendet. Tabelle III-1 zeigt einen typischen Reaktionsansatz mit dem dazugehörige Temperaturprogramm (Tabelle III-1).

**Tabelle III-1: PCR-Standardreaktionsansatz für die K2-Bibliothek mit *Taq*-DNA-Polymerase.**

Komponente	Ausgangskonzentration	Endkonzentration
Matrizen-DNA	variabel	variabel
<i>Forward</i> Primer K2	100 µM	1 µM
<i>Reverse</i> Primer K2	100 µM	1 µM
dNTPs	10 mM	200 µM
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2,5 mM
10 x <i>Taq</i> -Polymerase PCR-Puffer	10 x	1 x
<i>Taq</i> -Polymerase	5 U/µl	0,05 U/µl
H <sub>2</sub> O		

**Tabelle III-2: PCR-Temperaturprogramm für die K2-Bibliothek mit *Taq*-DNA-Polymerase**

Schritt	Temperatur	Zeit
1	95°C	5 min
2	95°C	30 s
3	55°C	30 s
4	72°C	45 s
5	6 - 25-fache Wiederholung der Schritte 2 - 4	
6	72°C	5 min
7	4°C	∞

# METHODEN

## III.1.1.2 PCR-Reaktionen mit *Phusion*-DNA-Polymerase

Für sequenzexakte PCR-Produkte wurde die *Phusion*-DNA-Polymerase eingesetzt. Hierzu zählte die Herstellung von Aptameren für Bindungstests (Abschnitt III.5.1). Tabelle III-3 zeigt einen Standardreaktionsansatz mit dem dazugehörigen Temperaturprogramm (Tabelle III-4).

**Tabelle III-3: PCR-Standardreaktionsansatz für die K2-Bibliothek mit *Phusion*-DNA-Polymerase.**

Komponente	Ausgangskonzentration	Endkonzentration
<b>Matrizen-DNA</b>	variabel	1 pg/μl - 10 ng/μl
<b>Forward Primer K2</b>	100 μM	1 μM
<b>Reverse Primer K2</b>	100 μM	1 μM
<b>dNTPs</b>	10 mM	200 μM
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	50 mM	2,5 mM*
<b>5x <i>Phusion</i> HF- Puffer</b>	5 x	1 x
<b><i>Phusion</i>-Polymerase</b>	2 U/μl	0,02 U/μl
<b>H<sub>2</sub>O</b>		

\* = Der 5 x-*Phusion*-HF-Puffer enthält bereits 7,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Enkonzentration = 1,5 mM)

**Tabelle III-4: PCR-Temperaturprogramm für die K2-Bibliothek mit *Phusion*-DNA-Polymerase.**

Schritt	Temperatur	Zeit
1	98°C	30 s
2	98°C	15 s
3	55°C	15 s
4	72°C	30 s
5	6 - 25-fache Wiederholung der Schritte 2 - 4	
6	72°C	5 min
7	4°C	∞

## III.1.2 GENERIERUNG EINZELSTRÄNGIGER DNA

### III.1.2.1 λ-Exonuklease-Verdau

Der λ-Exonuklease-Verdau wurde zur Generierung einzelsträngiger DNA aus doppelsträngiger DNA innerhalb der *in vitro* Selektionsrunden eingesetzt. In der vorangegangenen PCR-Reaktion war hierfür ein phosphorylierter *Reverse* Primer verwendet worden. Tabelle III-5 zeigt einen Standardreaktionsansatz für den λ-Exonuklease-Verdau.

Nach der Reaktion wurde eine zehnminütige Inkubation bei 80°C durchgeführt, um das Enzym zu inhibieren. Die einzelsträngige DNA wurde anschließend mittels Silika-Membran-Säulchen (Abschnitt III.2.3.3) gereinigt.

**Tabelle III-5: Reaktionsansatz für einen  $\lambda$ -Exonuklease-Verdau zur Generierung von DNA-Einzelsträngen.**

Komponente	Ausgangskonzentration	Endkonzentration
Doppelsträngige DNA	variabel	40 ng/ $\mu$ l
10 x $\lambda$ -Exonuklease-Puffer	10 x	1 x
$\lambda$ -Exonuklease	10 U/ $\mu$ l	0,2 U/ $\mu$ l
H <sub>2</sub> O		

Die Reaktion erfolgte für 30 min bei 37°C. Es schloss sich eine zehnminütige Inkubation bei 80°C an.

### III.1.2.2 DNA-Doppelstrangtrennung mittels Hexaethylglykollinker

Diese Methode basiert darauf, dass in der vorausgehenden PCR ein modifizierter *Reverse* Primer eingesetzt wird, welcher einen signifikanten Unterschied im Laufverhalten und somit in der Auflösung beider DNA-Stränge im Gel erzeugt (49). Als Modifizierung wurde ein *Reverse* Primer mit Hexaethylglykolresten und zusätzlichen 20 Nukleotiden eingesetzt, wobei dieser Primer den gewöhnlichen *Reverse* Primer in der PCR ersetzte. Anschließend wurde eine präparative Aufreinigung mittels denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese (Abschnitt III.2.2.2.1) durchgeführt. Diese vergleichsweise zeitaufwendige Methode wurde vor allem zur Herstellung von Aptameren mit Plasmiden als Matrizen-DNA verwendet, da hier zusätzlich zur Strangtrennung eine Aufreinigung des Aptamerstranges von dem linear amplifizierten Plasmid erreicht werden sollte.

### III.1.3 RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON DNA

Innerhalb dieser Arbeit wurde mit Radioaktivität als Markierung für DNA-Moleküle gearbeitet. Diese wurden entweder am 5'-Ende mittels  $[\gamma\text{-P}^{32}]\text{-ATP}$  phosphoryliert oder intern mit  $[\alpha\text{-P}^{32}]\text{-dCTP}$  innerhalb der PCR-Reaktionen markiert.

#### III.1.3.1 5'-radioaktive Markierung von DNA

Diese Methode wurde zur Markierung von einzelsträngiger DNA eingesetzt, etwa zur radioaktiven Markierung der DNA für die erste Runde der *in vitro* Selektion und zur 5'-Markierung der Aptamere oder Spiegelmerere für Bindungstests. Die Methode wurde ebenfalls angewendet, wenn mittels der internen Markierung innerhalb der PCR keine ausreichende Markierung der DNA erhalten worden war. Für die radioaktive Markierung von Spiegelmeren wurde die zehnfache Menge  $[\gamma\text{-P}^{32}]\text{-ATP}$  eingesetzt.

Tabelle III-6: Reaktionsansatz zur 5'-Markierung von DNA mit T4-Polynukleotid-Kinase

Komponente	Ausgangskonzentration	Endkonzentration
DNA	variabel	0,02 - 2 $\mu$ M
10 x T4-Polynukleotid-Kinase-Puffer	10 x	1 x
[ $\gamma$ -P <sup>32</sup> ]-ATP	3000 Ci/mmol	variabel*
T4-Polynukleotid-Kinase	10 U/ $\mu$ l	0,4 U/ $\mu$ l
H <sub>2</sub> O		

Die Reaktion erfolgte für 30 min bei 37°C. Es schloss sich eine Inkubation von 20 min bei 65°C an.

\* Die Menge an [ $\gamma$ -P<sup>32</sup>]-ATP variierte abhängig von der benötigten Aktivität der DNA und der Aktivität des [ $\gamma$ -P<sup>32</sup>]-ATP am Tag der Reaktion.

### III.1.3.2 Interne radioaktive Markierung von DNA

Innerhalb dieser Arbeit wurde [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-dCTP zur internen Markierung von DNA eingesetzt, welches zusätzlich zu den in Tabelle III-1 und Tabelle III-3 angegebenen PCR-Reaktionsansätzen eingesetzt wurde. Es wurden Volumina von 0,5 - 20  $\mu$ l [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-dCTP eingesetzt, abhängig vom Referenzdatum und somit der am Reaktionstag bestehenden Aktivität des [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-dCTP und benötigter Aktivität der DNA.

### III.1.4 KLONIERUNG

Eine Klonierung findet im Zuge einer *in vitro* Selektion von Nukleinsäuren nach einer Anreicherung der Bibliothek mit zielmolekülbindenden Spezies statt. Die Klonierung dient dabei der Vereinzelung der in der Bibliothek enthaltenen unterschiedlichen DNA-Moleküle. Für alle Klonierungen innerhalb dieser Arbeit wurde die TA-Klonierungsmethode mit dem pGEM-T-Klonierungskit (Promega) angewendet.

#### III.1.4.1 Ligation

Die einzelsträngige DNA der Eluate der einzelnen *in vitro* Selektionsrunden wurde zunächst in einer Auffüll-PCR-Reaktion in doppelsträngige DNA überführt. Hierbei wurde die Taq-DNA-Polymerase (Abschnitt III.1.1.1) verwendet, welche einzelne Desoxyadenosinmonophosphate an das 3'-Ende des PCR-Produktes angefügt. Die PCR-Reaktion wurde dahingehend verändert, dass nur der Reverse Primer eingesetzt und nur drei Zyklen der PCR durchgeführt wurden. Die doppelsträngige DNA wurde anschließend aufgereinigt (Abschnitt III.2.3) und in die Ligationsreaktion eingesetzt. Tabelle III-7 zeigt einen Ansatz für die Ligationsreaktion.

**Tabelle III-7: Ansatz für eine Ligationsreaktion mit einem molaren Vektor : Insert-Verhältnis von 1 : 1.** Es wurden parallel drei Stoffmengen-Verhältnisse von Vektor : PCR-Produkt eingesetzt: 5:1; 1:1; 1:5. Zudem wurde die vom Hersteller empfohlene Menge an T4-DNA-Ligase verdoppelt.

Komponente	Ausgangskonzentration	Endkonzentration
PCR-Produkt	variabel	5 ng/µl
pGEM-T-Vektor	50 ng/µl	5 ng/µl
2 x T4 Ligations-Puffer	2 x	1 x
T4-DNA-Ligase	3 U/µl	0,6 U/µl
H <sub>2</sub> O		

Die Reaktion erfolgte für 1 h bei 37 °C. Es schloss sich eine 16-stündige Inkubation bei 4°C an.

### III.1.4.2 Transformation

Für die an die Ligation anschließende Transformation von *E.coli*-Zellen mit dem Ligationsprodukt wurden superkompetente Zellen (XL1-Blue *Supercompetent Cells*, Stratagene) eingesetzt, welche laut Herstellerangaben eine Transformationseffizienz von  $\geq 1 \times 10^9$  besitzen. 50 µl Zellen wurden durch Schnipsen aufgetaut und zu 3 µl beziehungsweise 7 µl des Ligationsansatzes gegeben. Es folgte eine 20-minütige Inkubation auf Eis, anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 47 s bei 42 °C im Thermoschüttler, gefolgt von einer zweiminütigen Inkubation im Eis. Nach einer Zugabe von 950 µl LB-Medium wurden die Proben 90 min bei 37 °C leicht geschüttelt (350 rpm).

Um einen zu starken Bewuchs der LB-Agar-Platten zu vermeiden, wurden drei verschiedene Konzentrationen des Transformationsansatzes ausgestrichen. Hierzu wurde 1 ml Transformationsansatz aufgeteilt in 10 µl, 100 µl und 890 µl. Der 890 µl-Ansatz wurde kurz bei 1000 x g zentrifugiert und der zellarme Überstand wurde verworfen. Alle drei Ansätze wurden mit LB-Medium auf 200 µl aufgefüllt und auf LB-Agarplatten (Ampicillin-Konzentration 100 µg/ml) ausplattiert. Nach dem Eintrocknen der Lösung für eine Stunde wurden die Petrischalen circa 12 h bei 37 °C über Kopf im Brutschrank inkubiert.

### III.1.4.3 Selektion positiver Klone mittels Kolonie-PCR

Einzelne gewachsene Bakterienkolonien wurden mittels eines sterilen Zahnstochers oder einer sterilen Pipettenspitze von der LB-Agarplatte gepickt und kurz in eine Lösung eingetaucht, welche alle Komponenten für eine PCR-Reaktion enthielt. Anschließend wurde der Zahnstocher beziehungsweise die Pipettenspitze in 5 ml LB-Medium mit einer Ampicillinkonzentration von 100 µg/ml transferiert. Die Suspension wurde bei 37 °C und 350 rpm für 12 - 16 h inkubiert (Übernachtkultur).

Für die Kolonie-PCR wurde die Zahl der PCR-Zyklen auf 40 erhöht. Die PCR-Ansätze wurden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese auf ein Vorhandensein des PCR-Produktes überprüft. Eine Weiterverarbeitung der Übernachtskulturen erfolgte nur mit denjenigen Suspensionen, bei denen mittels Kolonie-PCR ein positives Ergebnis erhalten worden war.

### III.1.4.4 Isolierung von Plasmid-DNA und Sequenzierung

Nach einer deutlichen Trübung der Übernachtskulturen nach etwa 12 - 16 h wurden 5 ml der Bakteriensuspension 30 s bei 11000 x g zentrifugiert und das Bakterienpellet nach den Herstellerangaben mittels eines Kits zur Aufreinigung von Plasmiden aus Bakterienkulturen (*NucleoSpin Plasmid*, Macherey und Nagel) weiterverarbeitet. Die Elution der gereinigten Plasmide von der Silika-Membran erfolgte in einem Volumen von 50 µl Elutionspuffer NE. Anschließend wurde die Konzentration der isolierten Plasmide bestimmt und für die anschließende Sequenzierung auf einen Bereich von 50 - 100 ng/µl eingestellt. Die Sequenzierung wurde von der Firma GATC Biotech AG, Konstanz, durchgeführt.

## III.2 ANALYSE UND REINIGUNG VON DNA-, PEPTID- UND PROTEINPROBEN

### III.2.1 QUANTIFIZIERUNG VON DNA UND PROTEINEN

#### III.2.1.1 UV-Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA in Lösung erfolgt mittels Spektrofotografie. Ein Absorptionswert der DNA bei 260 nm von 1 ( $A_{260} = 1$ ) entspricht dabei näherungsweise einer Massenkonzentration ( $c_m$ ) von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 33 µg/ml einzelsträngiger DNA. An Hand dieser Beziehung kann die Massenkonzentration einer doppelsträngigen DNA in Lösung laut:

$$c_m (\text{doppelsträngige DNA}) = A_{260} \times 50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \times \text{Verdünnung}$$

berechnet werden. Weiterhin kann über die Beziehung:

$$c_n = \frac{c_m}{M},$$

wobei  $c_n$  der Stoffmengenkonzentration und  $M$  dem Molekulargewicht entspricht, die molare Konzentration der DNA in Lösung berechnet werden. Das durchschnittliche Molekulargewicht eines Basenpaares der DNA beträgt hierbei  $M = 635 \text{ g/mol}$  und für ein Nukleotid  $M = 317,5 \text{ g/mol}$ . Das Gesamtmolekulargewicht der DNA ergibt sich durch Multiplikation mit der Länge des DNA-Moleküls.

Für die fotometrische Konzentrationsbestimmung von DNA wurden Quarzküvetten (Hellma) mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet. Die Proben wurden in einem Volumen von 73 µl

vermessen, zumeist bei einer Verdünnung von 3 µl Stammlösung und 70 µl Wasser. Die Stoffmengenkonzentration wurde an Hand der aufgeführten Beziehungen errechnet, wobei für synthetische Oligonukleotide das vom Hersteller angegebene Molekulargewicht verwendet wurde.

### III.2.1.2 Radioaktive Quantifizierung von DNA in Lösung

Radioaktiv markierte DNA wurde mittels Cerenkov-Messung im Szintillationszähler quantitativ bestimmt. Die von der  $^{32}\text{P}$ -markierten Probe emittierte Strahlung wird hierbei als cpm-Wert (*counts per minute*, Zählrate) detektiert:

$$cpm = ZA \times dpm.$$

Da die Zählzelle (ZA) für alle vermessenen Proben die Gleiche ist, entspricht hierbei die Zählrate cpm der Zerfallsrate *decay per minute* (dpm). Für die Quantifizierung wurde  $^{32}\text{P}$ -markierte DNA jeweils eine min in Plastikszintillationsröhrchen vermessen. Laut Herstellerfirma Beckman beträgt die Effizienz der Messung mit dem verwendeten Szintillationszähler LS 6000 SC für  $^{32}\text{P}$  nahezu 100 %.

### III.2.1.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Quantifizierung von Proteinproben erfolgte mittels der Bradford-Methode. Für größere Mengen Protein wurde das Bradford-Reagenz *Roti-Quant* (Carl Roth) verwendet. Zunächst wurden 800 µl Wasser in Einmalplastikküvetten vorgelegt, anschließend erfolgte die Zugabe der konzentrierten Proteinlösung. Anschließend wurden 200 µl Roti-Quant zugefügt und der Inhalt der Küvette mittels des Vortexgerätes vermischt. Die Proben wurden 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Die Berechnung der Massenkonzentration der Proteinprobe erfolgte durch Einsetzen der Absorptionswerte in eine Geradengleichung einer BSA-Standardreihe.

Für geringe Proteinmengen wurde das Bradford-Reagenz *Roti-Nanoquant* (Carl Roth) verwendet, welches eine höhere Sensitivität besitzt. Die Durchführung der Messung erfolgte analog zu der für das Reagenz *Roti-Quant* beschriebenen, allerdings wurden Absorptionswerte bei den Wellenlängen 590 nm und 450 nm aufgenommen. Anschließend wurde der Quotient  $A_{590}/A_{450}$  für die Berechnung der Massenkonzentration verwendet.

## III.2.2 GELELEKTROPHORESE

### III.2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Für ein 2%-iges Gel, welches für eine Auftrennung von Molekülen bis 200 Nukleotide Größe verwendet wurde, wurde 1 g (w/v) Agarose in 50 ml TAE-Puffer durch mehrmaliges

# METHODEN

Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und mit 1 %-iger Ethidiumbromidlösung (0,04 µl/ml Gellösung) versetzt. Die DNA-Proben wurden mit 6 x DNA-Probenpuffer für Agarosegele versetzt und die Elektrophorese fand bei 90 - 100 V mit TAE-Puffer als Laufpuffer statt.

Für die Agarose-Gelelektrophorese größerer Moleküle, beispielsweise von Plasmiden, wurde die verwendete Agarosemenge und somit die Porengröße des Gels entsprechend variiert. Agarosegele wurden neben der analytischen Anwendung auch präparativ zur Aufreinigung von DNA verwendet (Abschnitt III.2.3.1).

## III.2.2.2 Polyacrylamidgelelektrophorese

### III.2.2.2.1 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

#### *Analytische Polyacrylamidgelelektrophorese*

Analytische Polyacrylamidgele unter denaturierenden Bedingungen wurden für die Analyse der einzelsträngigen Bibliothek in den einzelnen *in vitro* Selektionsrunden und generell für alle elektrophoretischen Analysen einzelsträngiger DNA eingesetzt. Je nach Anwendung wurden dabei verschiedene Endkonzentrationen an Acrylamid in der Gellösung verwendet (Tabelle III-8).

**Tabelle III-8: 100ml-Ansatz für denaturierende Polyacrylamidgele.** Die Gellösungen wurden im 1 l-Maßstab ohne TEMED und APS hergestellt und bei 4°C bis zu mehreren Wochen gelagert. Vor dem Gebrauch wurde die Lösung jeweils auf 80 - 90°C erhitzt, um eventuell ausgefallenen Harnstoff zu lösen und das benötigte Volumen entnommen. Nach dem Abkühlen der Lösung wurden TEMED und APS zugegeben.

Komponente	Ausgangs-konzentration	Endkonzentration / Endvolumen (pro 100 ml Gellösung)			
Harnstoff	60,06 g/mol	8 M (48 g)			
Acrylamid/ Bisacrylamid (19:1)	40 %	8 % (20 ml)	10 % (25 ml)	12 % (30 ml)	20 % (50 ml)
10 x TBE-Puffer	10 x	1 x (10 ml)			
H <sub>2</sub> O					
TEMED		0,1 % (100 µl)			
APS	10 %	1 % (1 ml)			

Zunächst erfolgte zur Equilibrierung mit dem Laufpuffer TBE eine halbstündige Elektrophorese des erstarrten Gels für 30 min bei 500 V und 30 mA. Nach der Equilibrierung wurden die Taschen des Gels vor dem Probenauftrag mit TBE-Puffer gespült, um eventuell ausgefallenen Harnstoff zu entfernen. Die Proben wurden mit denaturierendem Probenpuffer für Polyacrylamidgele versehen und vor dem Auftragen gegebenenfalls fünf min bei 95 °C

erhitzt und eine min auf Eis inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 400 - 600 V und 25 - 35 mA.

Anschließend erfolgte die Analyse der DNA im Gel. Für unmarkierte DNA wurde die Ethidiumbromidfärbung (Abschnitt III.2.2.4.1) und für  $^{32}\text{P}$ -markierte DNA die Phospho-Bildgebung (Abschnitt III.2.2.4.4) eingesetzt.

## *Präparative Polyacrylamidgelelektrophorese*

Präparative Polyacrylamidgele wurden zur Einzelstranggenerierung mit Hexaethylglykollinker (Abschnitt III.1.2.2) und generell zur gelgestützten Reinigung einzelsträngiger DNA eingesetzt. Die Zusammensetzung aller verwendeten Puffer und die Durchführung entsprach der unter *analytische Polyacrylamidgelelektrophorese* beschriebenen. Nach der Elektrophorese wurde die DNA im Gel zunächst nachgewiesen (mittels *UV Shadowing* (Abschnitt III.2.2.4.2) im Falle unmarkierter DNA und mittels Autoradiografie (Abschnitt III.2.2.4.3) im Falle  $^{32}\text{P}$ -markierter DNA) und anschließend aus dem Gel extrahiert (Abschnitt III.2.3.2).

### III.2.2.2.2 Native Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Durchführung, die Pufferzusammensetzungen und die Laufbedingungen für native Polyacrylamidgelelektrophoresen, sowohl analytischer als auch präparativer Art, entsprachen bis auf folgende Abweichungen den unter Abschnitt III.2.2.2.1 *Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese* beschriebenen Bedingungen. Die Gellösung wurde ohne denaturierenden Harnstoff angesetzt und es wurde auf ein Erhitzen der Proben verzichtet. Des Weiteren enthielt der verwendete 2x Probenpuffer für native Polyacrylamidgele keinen Harnstoff und die Elektrophorese wurde bei geringerer Spannung (200 - 300 V) und elektrischer Stromstärke (20 mA) durchgeführt, um einen denaturierenden Einfluss höherer Temperaturen durch einen hohen elektrischen Widerstand zu unterbinden.

### III.2.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit Sammel- und Trenngel wurde zur Analyse von Proteingemischen beziehungsweise zur Überprüfung der Qualität von gereinigten FABP-Fusionsproteinen eingesetzt.

Für die SDS-Gelelektrophorese wurden das Minigel-System von Biorad und 15 %ige Trenn- und 5 %ige Sammelgele verwendet. Tabelle III-9 zeigt einen Ansatz für ein Minigel. Nach dem Gießen des Trenngels zwischen die Glasplatten wurde die flüssige Gellösung mit Isopropanol überschichtet, welches nach dem Erstarren des Trenngels entfernt wurde. Anschließend wurde das Sammelgel gegossen.

# METHODEN

Die Proben wurden mit Probenpuffer für SDS-Gele versehen und 5 min bei 95° C inkubiert. Nach einer einminütigen Inkubation auf Eis wurden die Proben auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte mit SDS-Laufpuffer. Im Bereich des Sammelgels wurde die Elektrophorese bei 90 V durchgeführt, nach dem Passieren der Grenze des Trenngels durch die Bromphenolblaufront wurde die Spannung auf 150 V erhöht. Nach dem Gellauf erfolgte der Nachweis der Proteine im Gel (Abschnitt III.2.2.5).

**Tabelle III-9: Ansatz für ein SDS-Minigel.** Die Gele wurden jeweils mit 30 ml Trenngel und 5 ml Sammelgel hergestellt.

Komponente	30 ml Trenngel Volumen [ml]	5 ml Sammelgel Volumen [ml]
Wasser	6,9	3,4
30 % Acylamid	15,0	0,83
1,5 M Tris, pH 8,8	7,5	0,63
10 % SDS	0,3	0,05
10 % APS	0,3	0,05
TEMED	0,03	0,005

## III.2.2.4 Nachweis von DNA in Gelen

DNA wurde in Agarose- und Polyacrylamidgelen mittels Ethidiumbromidfärbung nachgewiesen. Für große Mengen an DNA wurde für präparative Zwecke *UV-Shadowing* angewandt. Der Nachweis von radioaktiv markierter DNA erfolgte entweder mittels Phospho-Bildgebung oder für präparative Aufreinigungen mittels Autoradiografie.

### III.2.2.4.1 Ethidiumbromidfärbung

Zur Detektion von DNA in Agarose- und Polyacrylamidgelen wurde Ethidiumbromid eingesetzt. Agarosegele wurden bereits bei der Herstellung der Gellösung mit Ethidiumbromid (0,04 µl / ml Gellösung) versehen. Analytische Polyacrylamidgele wurden für 10 min in ethidiumbromidhaltigem TBE-Puffer (1 µg/ml) geschwenkt und kurz mit Wasser gespült. Die Visualisierung erfolgte mittels eines Transilluminators bei einer Anregungswellenlänge von 306 nm. Die Auswertung wurde mit dem Programm *Quantity One* durchgeführt.

### III.2.2.4.2 *UV-Shadowing*

Größere Mengen an Nukleinsäuren wurden in Polyacrylamid- und Agarosegelen mittels *UV-Shadowing* sichtbar gemacht. Da die Sensitivität dieser Detektionsmethode sehr viel geringer ist als die bei ethidiumbromidgefärbten Gelen, wurde *UV-Shadowing* nur für präparative Polyacrylamid- und Agarosegel-Aufreinigungen mit großen Probenmengen

eingesetzt. Die Kieselgelplatte 60 F254 (Merck) wurde im UV-Transilluminator mit Licht der Wellenlänge 254 nm bestrahlt, die als Schatten im Gel sichtbare DNA-Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten und anschließend weiter aufgereinigt (Abschnitte III.2.3.1 und III.2.3.2)

### III.2.2.4.3 Autoradiografie

Mittels Autoradiografie werden radioaktiv markierte DNA-Proben innerhalb eines Polyacrylamidgels indirekt detektiert. Die Autoradiografie wurde für die Aufreinigung von DNA aus Polyacrylamidgelen im präparativen Maßstab verwendet, hier vor allem für die Aufreinigung von DNA-Einzelsträngen nach Einzelstranggenerierungen mit Hexaethylglykollinker (Abschnitt III.1.2.2).

Nach der Elektrophorese wurde das Gel in Folie eingeschlagen und zusammen mit dem lichtempfindlichen Röntgenfilm in einer Filmkammer inkubiert. Je nach Aktivität der DNA-Proben wurden unterschiedlich lange Expositionszeiten von 10 min bis 6 h gewählt, wobei Proben mit sehr geringer Aktivität über Nacht bei -20 °C inkubiert wurden. Zur Entwicklung wurde der Film für zwei min im Entwicklungsbad inkubiert, kurz mit Wasser abgespült, und anschließend für zwei min in der Fixierlösung belassen.

Anschließend wurde mit einer Schere die durch die markierte DNA geschwärzte Bande des Films ausgeschnitten und als Schablone auf das Gel gelegt. Als Orientierung für eine optimale Platzierung des Films dienten hierbei Phosphoreszenzmarker, welche vor der Exposition auf dem Gel angebracht wurden und an diesen Stellen ebenfalls den Film schwärzten. Die DNA-haltige Bande wurde mittels eines sterilen Skalpells ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert (Abschnitt III.2.3.2).

### III.2.2.4.4 Phospho-Bildgebung

Radioaktiv markierte DNA-Proben in Polyacrylamidgelen wurden zu analytischen Zwecken generell mittels der Phospho-Bildgebung detektiert. Die Polyacrylamidgele wurden nach der Elektrophorese in Folie eingeschlagen und mit einem Phospho-Film für mindestens 15 min inkubiert. Der Film wurde mit einem Phospho-Film-Lesegerät eingelesen und mittels der Software *Image Quant* ausgewertet.

### III.2.2.5 Nachweis von Proteinen in SDS-Gelen

Proteine in SDS-Gelen wurden mittels der Coomassie-Färbung nachgewiesen. Hierzu wurde das Gel für eine h in der Coomassie-Färbelösung für SDS-Gele unter Schwenken (75 rpm) inkubiert. Anschließend wurde das Gel mit der Entfärbelösung für SDS-Gele abgespült. Es folgte eine mindestens vierstündige Entfärbung des SDS-Gels in der Entfärbelösung unter

Schwenken bei 75 rpm. Schwächer gefärbte Gele wurden unter Schwenken (75 rpm) über Nacht in der Entfärbelösung inkubiert.

## III.2.3 EXTRAKTION UND REINIGUNG VON DNA UND PROTEINEN

### III.2.3.1 Elution aus Agarosegelen

Zur präparativen Aufreinigung von unmarkierter DNA aus Agarosegelen wurde die DNA-Bande mittels *UV-Shadowing* (Abschnitt III.2.2.4.2) sichtbar gemacht. Die Bande wurde mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und die DNA aus dem Gelstück laut Herstellerangaben mit dem Kit *NucleoSpin Extract II* (Macherey und Nagel) aufgereinigt. Die Elution der gereinigten DNA erfolgte mit 50 µl Elutionspuffer NE von der Silika-Membran-Säule.

### III.2.3.2 Elution aus Polyacrylamidgelen

Nach einer präparativen Aufreinigung mittels Polyacrylamidgelelektrophorese muss die DNA aus dem Gel extrahiert werden. Hierzu wurde die *Crush and Soak*-Methode angewendet. Nach dem Ausschneiden der Bande aus dem Gel wurde das Gelstück zunächst zerkleinert und mit 0,3 M Natriumacetat, pH 5,5 versetzt. Die DNA wurde für 2 h bei 65 °C unter starkem Schütteln bei 1400 rpm inkubiert, anschließend wurde die DNA-haltige Lösung abgenommen. Für eine Erhöhung der Ausbeute wurde die Elution mit Natriumacetatlösung für 16 h bei 4 °C unter starkem Schütteln bei 1400 rpm weitergeführt. Die Eluate wurden anschließend mittels Ethanol-fällung (Abschnitt III.2.3.7) weiter gereinigt.

### III.2.3.3 Aufreinigung von DNA mittels Silika-Membran-Säule

Für sämtliche Aufreinigungen von doppel- und einzelsträngiger DNA nach enzymatischen Reaktionen wurden Säulchen mit Silika-Membranen eingesetzt. Es wurde das *NucleoSpin Extract II*-Kit (Macherey und Nagel) verwendet, welches eine Aufreinigung bis zu einer Minimalgröße der DNA von 65 Basenpaaren erlaubt. Die Durchführung erfolgte laut Herstellerangaben, wobei für einzelsträngige DNA der NTC-Puffer verwendet wurde. Die Elution von der Silika-Membran erfolgte stets in einem Volumen von 50 µl Elutionspuffer NE.

### III.2.3.4 Aufreinigung mittels Silica-Harz-Partikeln

Diese Technik zur Entfernung von Proteinen nach enzymatischen Reaktionen wurde für DNA-Moleküle mit einer Größe kleiner als 65 Basenpaaren eingesetzt, welche für die Aufreinigung mit Silika-Membran-Säulen nicht geeignet sind. Die Partikel (*StrataClean Resin*,

Stratagene) wurden laut Herstellerangaben verwendet, wobei die Extraktion jeweils dreimal durchgeführt wurde.

### III.2.3.5 Ultrafiltration von DNA-Proben

Die Ultrafiltration wurde zur Reinigung von DNA-Molekülen von Pufferbestandteilen und Nukleotiden nach der Aufreinigung mittels Silica-Harz-Partikeln eingesetzt. Die Filtrationseinheiten Microcon YM-30 und YM-3 (Ausschlussgrenzen 30 kDa und 3 kDa, Millipore) wurden laut Herstellerangaben verwendet, wobei vor der Elution dreimal mit 500 µl Wasser oder NE-Puffer gewaschen wurde.

### III.2.3.6 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion ist eine klassische Methode zur Trennung der DNA von Proteinen oder Peptiden. Zunächst wurde ein Äquivalenzvolumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (1:(1:1/24)) zu einer DNA-haltigen Lösung gegeben und 1 min mittels eines Vortexgerätes stark geschüttelt. Es folgte eine einminütige Zentrifugation bei Raumtemperatur und 13000 x g. Nach dem Abnehmen der wässrigen Phase fand eine Wiederholung der Extraktion statt. Anschließend wurde die Lösung mit einem Äquivalenzvolumen Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (24:1) versetzt und nach 1 min starken Schüttelns mittels eines Vortexgerätes für 1 min bei Raumtemperatur und 13000 x g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und die Extraktion wiederholt.

### III.2.3.7 Ethanolfällung

Diese Methode wurde zur Aufreinigung und Aufkonzentrierung von DNA verwendet. Tabelle III-10 zeigt einen Reaktionsansatz für eine Ethanolfällung.

**Tabelle III-10: Reaktionsansatz für eine Ethanolfällung.**

Komponente	Ausgangskonzentration	Endkonzentration
DNA	variabel	variabel
Natriumacetat, pH 5.5	3 M	0,3 M
Ethanol	100 %	70 %
Glycogen	20 mg/ml	15 µg/ml
H <sub>2</sub> O		

Der Ansatz wurde für 30 min bis 1 h bei -80 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C und 13000 x g zentrifugiert. Es folgte ein Waschen des Pellets mit 70 %igem Ethanol und eine erneute Zentrifugation von fünf min bei 4 °C und 13000 x g.

Anstelle der Inkubation bei -80 °C kann stattdessen eine Inkubation bei -20 °C für 16 h eingesetzt werden. Nach dem Waschen und Trocknen des Pellets bei 65 °C für 10 min wurde das Pellet in Wasser aufgenommen und entweder für 20 min bei 65 °C und 700 rpm oder für 16 h bei 4 °C gelöst.

### III.2.3.8 Reinigung und Konzentrierung von Proteinproben

FABP-Fusionsproteine wurden zur Aufreinigung von Pufferbestandteilen oder zur Aufkonzentrierung mittels Ultrafiltration behandelt. Die Filtrationseinheiten Amicon Ultra-4 (Millipore) wurden laut Herstellerangaben verwendet, wobei vor der Elution jeweils viermal mit 1000 µl PBS-M-Puffer gewaschen wurde.

## III.3 ÜBEREXPRESSION UND REINIGUNG VON FABP-FUSIONSPROTEINEN

Die Fusionsproteine *Strep-Tag-II-FABP* und *FABP-Strep-Tag-II* wurden in *E.coli*-Zellen überexprimiert und anschließend aufgereinigt. Jeder der Extraktions- und Reinigungsschritte wurde mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert.

### III.3.1 TRANSFORMATION

Für die Transformation der superkompetenten Zellen (XL1-Blue, Stratagene) wurden jeweils 50 ng Plasmid-DNA (Vektor pHMFA-SII und Vektor pXSII) und 100 µl Zellen verwendet. Die Durchführung der Transformation erfolgte analog zu der im Abschnitt III.1.4.2 beschriebenen. Das Wachstum der Bakterienkolonien auf den LB-Agarplatten (Ampicillinkonzentration = 100 µg/ml) erfolgte für 20 h bei 37°C.

### III.3.2 ZELLANZUCHT IN FLÜSSIGKULTUR

Einzelne gewachsene Bakterienkolonien wurden mittels einer Impföse von der LB-Agarplatte aufgenommen und in 20 ml LB-Medium (Ampicillinkonzentration = 100 µg/ml) gegeben. Die als Vorkultur bezeichnete Lösung wurde etwa 5 h bei 37°C bei 300 rpm geschüttelt, bis eine Trübung der Lösung erkennbar war.

Die Vorkultur wurde in 1 l LB-Medium (Ampicillinkonzentration = 100 µg/ml) überführt und für circa 16 h bei 37°C bei 300 rpm geschüttelt, bis eine Trübung der Lösung erkennbar war. Die Bakteriensuspension wurde bei 2800 x g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Das Zellpräzipitat wurde in 100 ml LB-Medium resuspendiert und zu 900 ml LB-Medium (Ampicillinkonzentration = 100 µg/ml) hinzugefügt.

Die Induktion der Proteinsynthese erfolgte mittels der Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM). Anschließend wurde die Lösung für etwa 4 h bei 37°C bei 300 rpm inkubiert, bis ein

Absorptionswert der Lösung von  $A_{600} = 0,6$  erreicht worden war. Die Bakteriensuspension wurde anschließend für 15 min bei 4°C und 4000 x g zentrifugiert.

### III.3.3 ZELLAUFSCHLUSS

Für den Aufschluss der Bakterienzellen wurde das Zellpräzipitat mit 50 ml Lyse-Puffer NP mittels eines Ultrathorax-Gerätes behandelt, bis eine vollständige Resuspendierung erreicht war. Anschließend wurde Lysozym (Endkonzentration 1 mg/ml) zugefügt, die Inkubation mit dem Enzym erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur und unter Rühren der Lösung.

Anschließend erfolgte eine Ultraschallbehandlung der Lösung: zehn mal 10 s bei jeweils 250 W, unterbrochen von jeweils einminütigen Inkubationen bei 4°C. Anschließend wurde Magnesiumchlorid (Endkonzentration = 0,02 M) zugegeben. Die Viskosität der Suspension wurde durch die Zugabe von Benzoenase Nuklease (3 U/ml Bakterienkultur) verringert. Die Inkubation mit dem Enzym erfolgte für 20 min bei 4°C. Anschließend wurde die Lösung bei 4°C und 10000 x g für 30 min zentrifugiert. Der klare, proteinhaltige Überstand wurde abgenommen.

### III.3.4 PROTEINAUFREINIGUNG

Die Aufreinigung der rekombinanten FABP-Fusionsproteine aus dem klaren Lysat nach dem Zellaufschluss erfolgte mit *Strep-Tactin*-beschichteten magnetischen Partikeln (Qiagen). Für die Aufreinigung aus 5 ml klarem Überstand wurden jeweils 1000 µl der 10 %igen Partikelsuspension verwendet.

Zur Vorbereitung wurden 1000 µl der Partikelsuspension dreimal mit 1000 µl Waschpuffer NPT gewaschen und in 200 µl Waschpuffer NPT aufgenommen. Das klare Lysat wurde mit Tween 20 (Endkonzentration 0,05 %) versehen. Die Partikel wurden zu dem klaren Lysat gegeben und eine h bei Raumtemperatur unter Schütteln (650 rpm) inkubiert. Nach der Bindung der Proteine wurden die Partikel dreimal mit jeweils 1000 µl Waschpuffer NPT gewaschen.

Anschließend wurden die gebundenen Proteine eluiert. Hierzu wurden die gewaschenen Partikel mit 150 µl Elutionspuffer NPTB versehen und fünf min bei Raumtemperatur unter Intervallschütteln (alle drei min 15 s bei 1400 rpm) inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Elutionsschritt dreimal wiederholt. Anschließend wurde eine Ultrafiltration der Proteinproben durchgeführt (Abschnitt III.2.3.8), um die Proteine aufzukonzentrieren und um Tween 20 aus der Lösung zu entfernen.

## III.4 IN VITRO SELEKTIONEN

### 1. Selektionsrunde

Für die jeweils ersten Selektionsrunden der *Strep-Tag*-II- und *Spiegel-Tag*-SELEX wurden 3 nmol der DNA-Bibliothek K2 (IBA, Göttingen) verwendet. 90 pmol der Bibliothek wurden 5'-radioaktiv markiert mit [ $\gamma$ -P<sup>32</sup>]-ATP, mittels Silika-Membran-Säulchen aufgereinigt und anschließend mit der unmarkierten Bibliothek vereinigt. Die DNA (1  $\mu$ M) wurde in 1 x PBS-M-Puffer für fünf min auf 95°C erhitzt und anschließend im Thermoschüttler aktiv in 30 min auf Raumtemperatur abgekühlt. Es folgte die Zugabe von Tween 20 (Endkonzentration 0,05 %). Die in PBS-Puffer gelösten Peptide (660 pmol, Endkonzentration 0,2  $\mu$ M) wurden zu der renaturierten Bibliothek gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

330  $\mu$ l der Streptavidin-beschichteten Partikel (10 mg/ml Partikelsuspension, Dynabeads M-280, Invitrogen) wurden dreimal mit 1000  $\mu$ l PBS-T-Puffer gewaschen. Sie wurden mit PBS-MT-Puffer auf eine Konzentration von 10 mg/ml eingestellt und zu den Aptamer-Peptid-Komplexen zugefügt. Die Bindung des Komplexes an die Partikel erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur und unter Intervallschütteln (alle drei min 1400 rpm für 15 s). Der Überstand wurde anschließend abgenommen und die magnetischen Partikel einmal mit 1000  $\mu$ l PBS-MT-Puffer gewaschen.

Anschließend wurden die gebundenen Aptamere in 150  $\mu$ l *Taq*-PCR-Puffer für 10 min unter starkem Schütteln (1400 rpm) bei 95°C von den Partikeln eluiert. Der Elutionsschritt wurde zweimal mit jeweils 150  $\mu$ l Puffer wiederholt. Es folgte die Messung der Eluate und der auf den Partikeln zurückgebliebenen markierten DNA im Szintillationszähler.

Nach der Messung im Szintillationszähler wurden die Elutionsfraktionen vereinigt und die Komponenten für die anschließende Amplifikation in der Polymerasekettenreaktion mit *Taq*-Polymerase (Abschnitt III.1.1.1) zugefügt. Die erste PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 500  $\mu$ l und mit acht Amplifikationsrunden durchgeführt. Anschließend wurden 10 % der ersten PCR in einer zweiten PCR ( $V = 1000$   $\mu$ l, acht Amplifikationsrunden) vermehrt. Innerhalb dieser PCR wurde eine interne radioaktive Markierung mit [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-dCTP eingeführt (Abschnitt III.1.3.2). 3  $\mu$ l des doppelsträngigen PCR-Produktes wurden mittels Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert. 997  $\mu$ l PCR-Produkt wurden mittels Silika-Membran-Säulchen aufgereinigt und anschließend mittels  $\lambda$ -Exonuklease (Abschnitt III.1.2.1) verdaut. 3  $\mu$ l des einzelsträngigen Produkts wurden mittels denaturierender Gelelektrophorese analysiert. Anschließend erfolgte eine erneute Aufreinigung mittels Silika-Membran-Säulchen und NTC-Puffer. Das einzelsträngige gereinigte Produkt wurde anschließend in die zweite Selektionsrunde eingesetzt.

## Selektionsrunden 2 - 8

50 pmol der einzelsträngigen DNA wurden jeweils in die Selektionsrunde 2 eingesetzt. Das Vorgehen bezüglich der De- und Renaturierung und der eigentliche Selektionsvorgang entsprach demjenigen innerhalb der ersten Selektionsrunde.

Die Elution erfolgte ab Runde 2 in zweimal 20 µl *Taq*-PCR-Puffer. Die erste PCR wurde jeweils in 50 µl-Ansätzen und die darauffolgende PCR 2 in 600 µl-Ansätzen durchgeführt. Die Anzahl der Amplifikationszyklen wurde für beide PCRs im Verlauf der *in vitro* Selektionen von jeweils acht Zyklen auf fünf Zyklen vor der letzten Selektionsrunde verringert.

Tabelle III-11 und Tabelle III-12 fassen die Daten bezüglich der Durchführung der *Strep-Tag*-II- und Spiegel-*Tag*-SELEX zusammen. Im Falle der *Strep-Tag*-II-SELEX wurde ab der dritten Selektionsrunde eine Präselektion eingeführt, im Falle der Spiegel-*Tag*-SELEX ab der zweiten Selektionsrunde. Die Streptavidin-beschichteten Partikel wurden hierfür ebenfalls zunächst dreimal mit 1000 µl PBS-MT-Puffer gewaschen und anschließend mit PBS-MT-Puffer auf eine Konzentration von 10 mg/ml eingestellt. Die Inkubation der renaturierten DNA-Bibliothek mit den Partikeln erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur und Intervallschütteln (alle drei min 1400 rpm für 15 s). Die Lösung wurde abgenommen und anschließend mit dem Peptid versehen.

Maßnahmen zur Erhöhung der Stringenz (Reduktion der Peptidmenge, Erhöhung der Anzahl der Waschschrte) wurden getroffen, sobald ein Ansteigen des Bindungssignals erhalten worden war. Eine schrittweise Reduktion der DNA-Konzentration zur Steigerung der Stringenz wurde ab der zweiten Selektionsrunde in beiden *in vitro* Selektionen begonnen.

**Tabelle III-11: *Strep-Tag*-II-SELEX.** Die Tabelle zeigt die eingesetzten DNA- und D-*Strep-Tag*-II-Peptid-Mengen. Spalte sechs gibt das Verhältnis zwischen der DNA-Bibliothek und D-*Strep-Tag*-II-Peptid an. Spalte sieben und acht geben das Volumen der jeweils eingesetzten Streptavidin-beschichteten Partikel (10 mg/ml) an.

Runde	DNA [pmol]	DNA [µM]	<i>Strep-Tag</i> -II [pmol]	<i>Strep-Tag</i> -II [µM]	DNA: <i>Strep-Tag</i> -II	Prä-selektion [µl]	Haupt-selektion [µl]	Wasch-schritte
1	3000	1	660	0,2	5 : 1	-	330	1 x 1000 µl
2	50	0,75	150	2,3	1 : 3	-	75	2 x 500 µl
3	30	0,3	30	0,3	1 : 1	15	15	3 x 500 µl
4	50	0,2	33,3	0,133	3 : 2	33	33	3 x 500 µl
5	50	0,1	12,5	0,025	4 : 1	20	20	3 x 500 µl
6	50	0,1	12,5	0,025	4 : 1	20	20	3 x 500 µl
7	50	0,1	6,25	0,012	8 : 1	20	20	3 x 500 µl
8	50	0,1	6,25	0,012	8 : 1	20	20	3 x 500 µl

# METHODEN

**Tabelle III-12: Spiegel-Tag-SELEX.** Die Tabelle zeigt die eingesetzten DNA- und D-Spiegel-Tag-Peptid-Mengen. Spalte sechs gibt das Verhältnis zwischen der DNA-Bibliothek und D-Spiegel-Tag-Peptid an. Spalte sieben und acht geben das Volumen der jeweils eingesetzten Streptavidin-beschichteten Partikel (10 mg/ml) an.

Runde	DNA [pmol]	DNA [ $\mu$ M]	Spiegel Tag [pmol]	Spiegel Tag [ $\mu$ M]	DNA: Spiegel Tag	Prä-selektion [ $\mu$ l]	Haupt-selektion [ $\mu$ l]	Wasch-schritte
1	3000	1	660	0,2	5 : 1	-	330	1 x 1000 $\mu$ l
2	50	0,75	100	1,5	1 : 2	50	50	3 x 500 $\mu$ l
3	50	0,5	50	0,5	1 : 1	25	25	2 x 500 $\mu$ l
4	50	0,25	50	0,5	1 : 1	25	25	1 x 500 $\mu$ l
5	50	0,2	25	0,1	2 : 1	25	25	3 x 500 $\mu$ l
6	40	0,15	20	0,075	2 : 1	20	20	3 x 500 $\mu$ l
7	50	0,1	16,6	0,033	3 : 1	20	20	3 x 500 $\mu$ l
8	50	0,1	16,6	0,033	3 : 1	20	20	3 x 500 $\mu$ l

Die angereicherten DNA-Bibliotheken der jeweils achten Runde der *Strep-Tag-II-* und *Spiegel-Tag-SELEX* wurden wie unter Abschnitt III.1.4 beschrieben für eine Analyse der in den Bibliotheken enthaltenen Sequenzen in einen Vektor kloniert.

## III.5 ANALYSE DER APTAMERE UND SPIEGELMERE

### III.5.1 BESTIMMUNG DER BINDUNGS-AFFINITÄTEN VON APTAMER-KLONEN

Nach der Auswertung der der Primärstrukturdaten wurden Bindungstests durchgeführt, um die Bindungsaffinitäten der einzelnen Aptamer-Klone zu bestimmen. Hierzu wurde für jeden Klon zunächst eine PCR mit *Phusion*-Polymerase (Abschnitt III.1.1.2) in einem Volumen von 300  $\mu$ l durchgeführt. Bei dieser PCR wurde als Matrizen-DNA das Plamid aus der Klonierung und [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-dCTP zur internen radioaktiven Markierung verwendet. Als *Reverse* Primer wurde ein modifizierter *Reverse*-Primer mit Hexaethylglykollinker verwendet, um unterschiedlich lange DNA-Stränge zu erzeugen (Abschnitt III.1.2.2). Anschließend wurde eine Polyacrylamidgelelektrophorese (12 % Acrylamidkonzentration) unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt, um den Aptamerstrang abzutrennen (Abschnitt III.2.2.2.1). Hierbei wurde gleichzeitig eine Aufreinigung des Aptamerstranges von linear amplifiziertem Plasmid erreicht. Nach der Elution aus dem Gel wurden die einzelsträngigen Aptamere mittels Ethanol-fällung (Abschnitt III.2.3.7) präzipitiert und in die Bindungstests mit magnetischen Partikeln eingesetzt.

## III.5.2 BINDUNGSTEST MIT MAGNETISCHEN PARTIKELN

Für Bindungstests mit magnetischen Partikeln (Streptavidin-beschichtete Partikel Dynabeads M-280, Invitrogen) wurden Aptamere oder Spiegelmerer zunächst am 5'-Ende radioaktiv markiert (Abschnitt III.1.3.1) und anschließend mittels Silika-Membran-Säulchen gereinigt (Abschnitt III.2.3.3). Verkürzte Aptamere mit einer Länge kleiner 65 Nukleotide wurden stattdessen zunächst mittels Silika-Harz-Kügelchen (Abschnitt III.2.3.4) und anschließender Ultrafiltration (Abschnitt III.2.3.5) gereinigt.

Die Bindungstests erfolgten stets mindestens als Doppelbestimmungen, in einzelnen Fällen auch als Dreifach- oder Vierfachbestimmungen. Zunächst wurde das Aptamer oder Spiegelmerer in PBS-M-Puffer fünf min bei 95°C denaturiert ( $n = 5 \text{ pmol}$ ;  $c = 0,1 \text{ }\mu\text{M}$ ) und anschließend in 30 min in einem Thermoschüttler aktiv auf Raumtemperatur gekühlt. Die Probe wurde nach der Renaturierung mit Tween 20 (Endkonzentration 0,05 %) versehen. Die Bindung an das Peptid erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur.

Anschließend wurden die Streptavidin-beschichteten Partikel zugegeben, wobei die Menge an verwendeten magnetischen Partikeln an die eingesetzte Menge Peptid angepasst wurde. Pro pmol Peptid wurden mindestens 0,5  $\mu\text{l}$  der Partikelsuspension (10 mg/ml) verwendet, wobei Mindestvolumina von 10  $\mu\text{l}$  eingesetzt wurden. Die Streptavidin-beschichteten Partikel wurden zunächst dreimal mit 1000  $\mu\text{l}$  PBS-MT-Puffer gewaschen und anschließend mit PBS-MT-Puffer auf eine Konzentration von 10 mg/ml eingestellt.

Die Bindung des Aptamer/Spiegelmerer-Peptid-Komplexes an die Partikel erfolgte in 30 min bei Raumtemperatur mit Intervallschütteln (alle 3 min 1400 rpm für 15 s). Die Partikel wurden anschließend dreimal mit jeweils 500  $\mu\text{l}$  PBS-MT-Puffer gewaschen. Mit dem letzten Waschschrift wurden die Partikel in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Anschließend erfolgte die Messung der Radioaktivität im Szintillationszähler.

## III.5.3 BINDUNGSTESTS MIT NITROCELLULOSEFILTERN

Für die Bindungstests von Spiegelmerer ST-146 mit FABP-Fusionsproteinen wurden Filterbindungstests mit Nitrocellulosefiltern (HAWP, 0,45  $\mu\text{m}$ , 25 mm Durchmesser, Millipore) verwendet. Hierbei wurden stets mindestens Doppelbestimmungen durchgeführt, in einigen Fällen auch Drei- oder Vierfachbestimmungen.

Zunächst wurde das Spiegelmerer ST-146 ( $n = 5 \text{ pmol}$ ,  $c = 0,1 \text{ }\mu\text{M}$ ) mit PBS-M-Puffer fünf min bei 95°C denaturiert und anschließend in 30 min im Thermoschüttler aktiv auf Raumtemperatur abgekühlt. Für Filterbindungstests wurde kein Tween 20 eingesetzt. Nach der Zugabe des Proteins erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 30 min. Anschließend wurden alle Proben mit PBS-M-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 200  $\mu\text{l}$  eingestellt.

Die Nitrocellulosefilter wurden mit einer Pinzette auf die Vakuum-Absaugvorrichtung für Filter gegeben und mit dem Bindungspuffer PBS-M equilibriert. Hierzu wurden 800 µl Puffer PBS-M auf die Filter gegeben und für 1 min inkubiert, danach folgte das Absaugen des Puffers. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt.

Die Proben wurden anschließend auf die Filter gegeben, wobei auf eine gleichmäßige Verteilung geachtet wurde. Es folgte eine zweiminütige Inkubation der Bindungsansätze auf den Filtern. Nach dem Absaugen des Puffers wurden die Filter dreimal mit jeweils 750 µl Puffer PBS-M gespült, wobei eine einminütige Inkubation der Lösung auf den Filtern während der ersten beiden Waschschriffe durchgeführt wurde. Nach dem letzten Absaugen der Lösung wurden die Filter für 2 min abgesaugt.

Es schloss sich die Messung der markierten, auf dem Filter gebundenen DNA im Szintillationszähler an. Hierfür wurden die Filter mittels einer Pinzette in Eppendorf-Gefäße transferiert.

### III.5.4 BESTIMMUNG VON DISSOZIATIONSKONSTANTEN $K_d$

Die Berechnung der apparenten Dissoziationskonstanten innerhalb dieser Arbeit erfolgte analog zu Jhaveri et al. (195). Apparente Dissoziationskonstanten werden innerhalb der Arbeit als Dissoziationskonstanten  $K_d$  bezeichnet.

Die Bestimmung der Dissoziationskonstante  $K_d$  von Aptameren und Spiegelmeren gegen Peptide erfolgte mittels des Bindungstests mit magnetischen Partikeln (Abschnitt III.5.2). Im Falle der Bestimmung der apparenten Dissoziationskonstante von Spiegelmeren gegen FABP-Fusionsproteine wurden Bindungstests mit Nitrocellulosefiltern (Abschnitt III.5.3) eingesetzt. Aptamere und Spiegelmere wurden bei konstanten Konzentrationen von 50 nM oder 100 nM mit steigenden Konzentrationen (0 - 1,5 µM) Peptid oder Protein (0 - 3 µM) inkubiert und wie in den Abschnitten III.5.2 und III.5.3 beschrieben behandelt. Die Bestimmung des apparenten  $K_d$ -Wertes wird hier ermöglicht, indem der Parameter (Konzentration des Peptides oder des Proteins) variiert wird, der nicht zugleich Messparameter ist.

Für die Berechnung der Bindungskonstante wurde die Gleichung



zugrunde gelegt. Die in dieser Gleichung beschriebene Reaktion der Edukte A und B zu einem Produkt AB läuft solange ab, bis sich ein Gleichgewicht zwischen Hin- und Rückreaktion eingestellt hat. Dies entspricht einem Gleichgewicht zwischen der Assoziation und Dissoziation des Komplexes aus Aptamer (A) und Peptid (B), beziehungsweise Spiegelmer (A) und Peptid (B) oder Fusionsprotein (B). Die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation  $k_a$  beschreibt die Geschwindigkeit der Komplexbildung und die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation  $k_d$  die Geschwindigkeit des Zerfalls des

Komplexes. Aus dem Verhältnis der Konstanten  $k_a$  und  $k_d$  ergeben sich im Gleichgewichtszustand die Werte für die Assoziationskonstante  $K_a$

$$K_a = k_a / k_d = \frac{[AB]}{[A] * [B]}$$

und die Dissoziationskonstante  $K_d$

$$K_d = k_d / k_a = \frac{[A] * [B]}{[AB]}$$

Die Einheit der Assoziationskonstante ist l/mol, die der Dissoziationskonstanten mol/l. Für die für Angaben von Bindungsstärken verwendete Dissoziationskonstante gilt, dass ein kleinerer Wert eine stärkere Bindung verdeutlicht. Für die Berechnung der Dissoziationskonstante wurde das Verhältnis zwischen gebundener DNA/totaler DNA (y-Achse, Einheit [%]) gegen die Konzentration des Peptides oder Proteins (x-Achse) in einem Diagramm aufgetragen und mit dem Programm *SigmaPlot* analysiert. Die Daten wurden mit einer nicht-linearen Regression angepasst. Hierfür wurde ein 1:1-Bindungsprozess nach Langmuir-Hill (ein Aptamer bindet ein Peptid oder ein Spiegelmer bindet an ein FABP-Fusionsprotein) angenommen. Weiterhin wird davon ausgegangen, dass die absolute Menge A ( $A_{total}$ ) entweder frei oder im Komplex gebunden vorliegt. Für einen großen Überschuss von [B] über [A] kann die absolute Menge B ( $B_{total}$ ) als [B] entsprechend angenommen werden.

## III.6 KRISTALLISATION

### III.6.1 KRISTALLISATION DER LNA-DUPLEX

Zur Vorbereitung des Kristallisation-Testverfahrens wurden die beiden LNA-Stränge (LNA 1 und LNA 2, 0,1  $\mu$ M) zunächst in Wasser hybridisiert. Hierfür erfolgte ein Erhitzen der Lösung für fünf min auf 95°C. Die Probe wurde anschließend innerhalb von 4 h auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach der Hybridisierung wurde die Konzentration der Lösung durch Rotationsverdampfung auf 0,5 mM eingestellt.

Für das Testverfahren der Kristallisationsbedingungen wurden zwei Kits (*Nucleic Acid Mini Screen* Kit HR2-118 und *Natrix Formulation* Kit HR2-116, beide Hampton Research) gemäß der Angaben des Herstellers benutzt. Die 48 Kristallisationsbedingungen mit dem *Natrix Formulation* Kit wurden mit sitzenden Tropfen aus 1  $\mu$ l 0,5 mM LNA-Helix und 1  $\mu$ l Kristallisationspuffer gegen 80  $\mu$ l Kristallisationspuffer als Reservoirlösung getestet. Das Kristallwachstum fand in *96-well-CrystalQuick*-Platten (Greiner Bio-One) statt. Die Kristallisationsplatten wurden mit einer Kunststoffolie luftdicht verschlossen.

Die 24 Kristallisationsbedingungen des *Nucleic Acid Mini Screen* Kit wurden mit hängenden Tropfen aus 1  $\mu$ l 0,5 mM LNA-Helix und 1  $\mu$ l Kristallisationspuffer gegen 1 ml MPD (2-Methyl-

2,4-Pentandiol, 35 %) als Reservoirlösung getestet. Das Kristallwachstum fand in 24-well-Linbro-Platten (ICN Biochemicals Inc.) statt. Die Deckgläschen wurden mit Silikonfett auf den Kristallisationsplatten luftdicht abgeschlossen.

Das Kristallwachstum erfolgte für 72 h bei 21°C. Nachdem erste Kristalle erhalten worden waren, wurden verschiedene MPD-Konzentrationen (33 - 41 %) als Reservoirlösung zur Optimierung getestet.

## III.6.2 KRISTALLISATION VON ST-146-A

Zur Vorbereitung der Kristallisation des ST-146-A wurde das Aptamer in PBS-M-Puffer (0,1 mM) zunächst für fünf min auf 95°C erhitzt und anschließend innerhalb von 30 min im Thermoschüttler aktiv auf Raumtemperatur abgekühlt. Es folgte die Zugabe von Tween 20 (Endkonzentration 0,05 %). Anschließend erfolgte eine Aufkonzentrierung der Lösung durch Rotationsverdampfung auf eine Endkonzentration von 0,25 - 0,3 mM.

Die Testverfahren zur Kristallisation wurden wie in Abschnitt III.6.1 beschrieben durchgeführt. Es wurden jeweils 0,5 µl der DNA-Lösung und 0,5 µl des Kristallisationspuffers verwendet. Die Kristalle wuchsen für 10 -20 Tage bei 21°C.

## III.6.3 DATENAKQUISITION UND -PROZESSIERUNG

Für die Datenakquisition wurden die Kristalle mittels einer Impföse aus der Kristallisationslösung entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Vermessung der Kristalle wurde am Synchrotron ELETTRA (Triest, Italien) durchgeführt. Die Aufnahme der Daten erfolgte bei einer Temperatur von 100 K. Es wurde die Rotationsmethode verwendet, bei der der Kristall während der Messung um den Oszillationswinkel  $\Delta\phi$  gedreht wird. Die Kristalle wurden bei einer Wellenlänge von 1,0 Å vermessen. Es wurde ein hochaufgelöster Datensatz (80 - 1,9 Å) und ein niedrigaufgelöster Datensatz (80 - 2,7 Å) erfasst.

Die Daten wurden mittels des Programmes Denzo prozessiert, eine Skalierung der prozessierten Daten mit dem Program Scalepack erfolgte im Anschluss. Beide Programme sind Bestandteile der HKL-2000 Suite (196).

## IV. ERGEBNISSE

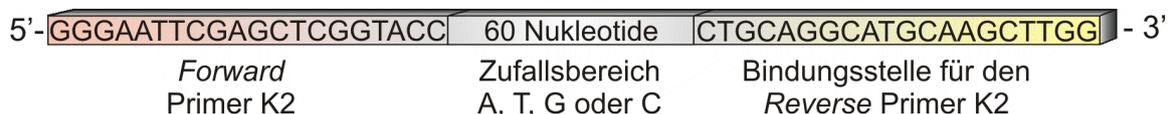
---

### IV.1 SPIEGELMERE GEGEN AFFINITÄTS-TAGS

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden Spiegelmerer gegen Affinitätspeptide selektiert. Zunächst wurde ein affines und spezifisches Spiegelmerer gegen das *Strep-Tag-II*-Affinitätspeptid generiert (Abschnitt IV.1.7) und anschließend die Bindung eines *Strep-Tag-II*-Fusionsproteins durch dieses Spiegelmerer ST-146 gezeigt (Abschnitt IV.1.7.8). Außerdem wurde ein Spiegelmerer gegen ein neues Affinitätspeptid, den Spiegel-*Tag*, entwickelt (Abschnitt IV.1.8). Zur Generierung der Spiegelmerer gegen Affinitäts-*Tags* wurden zunächst *in vitro* Selektionen gegen die gespiegelten Formen der Zielpeptide durchgeführt.

#### IV.1.1 DIE DNA-STARTBIBLIOTHEK

Die *in vitro* Selektionen innerhalb dieser Arbeit wurden mit einer DNA-Bibliothek durchgeführt (Abbildung IV-1), da DNA-Aptamere gegenüber RNA-Aptameren einige Vorteile bieten. Hierzu gehört die erhöhte Stabilität der Aptamere und die vergleichsweise kostengünstigere Herstellung, zudem kann der eigentliche Selektionsprozess schneller und einfacher durchgeführt werden.



**Abbildung IV-1: Die für *in vitro* Selektionen verwendete DNA-Bibliothek K2.** Die Gesamtlänge der Ausgangsbibliothek betrug 100 Nukleotide. Zwei konservierte Sequenzen von jeweils 20 Nukleotiden Länge, der *Forward* Primer K2 und die Bindungsstelle für den *Reverse* Primer K2, flankieren einen 60 Nukleotide großen Bereich mit einer zufallsgenerierten Sequenz aus A, T, G oder C.

Der Zufallsbereich der verwendeten K2 DNA-Bibliothek wurde von der IBA GmbH (Göttingen) mit dem Syntheseprogramm ‚Basenwobble‘ synthetisiert. Hierbei wird eine speziell zusammengesetzte Lösung der vier Nukleotide verwendet (Mischungsverhältnis dA : dG : dC : dT = 3 : 2,5 : 2,5 : 2), die unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Reaktivitäten der einzelnen Phosphoramidite zu einem gleich verteilten Einbau aller vier Nukleotide führt.

Die Anzahl der Nukleotide innerhalb des Zufallsbereiches der Bibliothek K2 betrug 60, womit theoretisch  $4^{60}$  beziehungsweise  $1,33 \times 10^{36}$  verschiedene Moleküle in dieser Bibliothek vorhanden sein sollten. Dies ergibt nach Einbeziehung der Avogadro-Konstante ( $6,022 \times 10^{23}$  Teilchen / mol) eine Stoffmenge von  $2,21 \times 10^{12}$  mol. Bei einer Syntheseausbeute von circa 80 nmol ist die tatsächliche Diversität der DNA-Bibliothek jedoch weit unter diesem Wert, mit  $4,82 \times 10^{16}$  verschiedenen Molekülen, anzugegeben. Für die jeweils ersten Runden der *in*

*in vitro* Selektionen wurden 3 nmol der Bibliothek eingesetzt, die Diversität dieser Bibliothek in der jeweiligen Selektionsrunde betrug dementsprechend  $1,82 \times 10^{15}$  verschiedene Moleküle.

## IV.1.2 ERSTELLUNG DES PEPTIDES SPIEGEL-TAG

Neben dem Spiegelmer gegen den *Strep-Tag-II* sollte ein komplett neues Affinitätssystem aus Affinitätspeptid und Spiegelmer entwickelt werden. Das neue Affinitätspeptid wurde daher *Spiegel-Tag* genannt. Die Sequenz des Spiegel-Tags wurde *in silico* erstellt. Sie sollte hierbei zwei Ansprüchen gerecht werden. Erstens sollte die Sequenz die Generierung eines Aptamers gegen diese Peptidsequenz ermöglichen und zweitens sollte die Sequenz so konzipiert sein, dass sie später als Affinitätspeptid zur Detektion und Affinitätschromatografie eines fusionierten Proteins geeignet ist.

Die Länge des Spiegel-Tags wurde auf 12 Aminosäuren festgelegt. Diese können durch 36 Nukleotide kodiert werden und somit auch über einen Primer innerhalb einer Polymerasekettenreaktion in ein Konstrukt für ein rekombinantes Protein eingeführt werden.

Weiterhin sollte bereits eine Peptidylschnittstelle innerhalb der Sequenz vorhanden sein, um eine Entfernung des Spiegel-Tags von fusionierten Proteinen zu erleichtern. Hier wurde die Endopeptidase Faktor Xa ausgewählt. Faktor Xa schneidet von der Aminosäuresequenz I-E-G-R die Peptidylbindung C-terminal nach dem Argininrest. Die vier C-terminalen Aminosäuren waren somit bereits festgelegt.

Die acht verbleibenden N-terminalen Aminosäuren des Spiegel-Tags wurden hinsichtlich ihrer Hydrophobizität, ihres isoelektrischen Punktes und ihrer Löslichkeit ausgewählt. Sie sollten wenig hydrophob sein und einen isoelektrischen Punkt im basischen pH-Bereich besitzen, um die Generierung eines Aptamers zu erleichtern. Des Weiteren sollten sie eine hohe Löslichkeit besitzen, um die Löslichkeit eines fusionierten Proteins nicht herabzusetzen. Es wurden die acht Aminosäuren Arginin, Lysin, Glutamin, Histidin, Serin, Asparagin, Glycin und Threonin ausgewählt. Diese bilden eine Symbiose der gewünschten Eigenschaften.

Keine der Aminosäuren sollte mehrfach vorkommen und die Verteilung der Aminosäuren sollte zufällig sein. Daher wurde ein Monte-Carlo-Experiment mit den acht Aminosäuren durchgeführt. Die N-terminalen Aminosäuren des Spiegel-Tags wurden so auf die Sequenz GSHKRNQT festgelegt. Die C-terminale Verknüpfung der Sequenz der Faktor Xa-Schnittstelle erbrachte die finale Sequenz GSHKRNQTIEGR des Spiegel-Tags.

## IV.1.3 VALIDIERUNG DER PEPTID-ZIELMOLEKÜLE FÜR DIE *IN VITRO* SELEKTIONEN

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Generierung von Spiegelmeren gegen Affinitäts-Tags, welche für die Detektion und Aufreinigung von rekombinanten Fusionsproteinen eingesetzt

werden. Hierzu wurden zwei verschiedene Affinitätspeptide mit den in Tabelle IV-1 angegebenen Eigenschaften ausgewählt. Neben dem Spiegel-Tag wurde der *Strep-Tag-II* als Peptidzielmolekül für die *in vitro* Selektionen gewählt.

**Tabelle IV-1: Ausgewählte Eigenschaften der zwei Peptid-Zielmoleküle für die *in vitro* Selektionen gegen Affinitäts-Tags.**

	<i>Strep-Tag-II</i>	Spiegel-Tag
<b>Länge [Aminosäuren]</b>	8	12
<b>Sequenz</b>	WSHPQFEK	GSHKRNQTIEGR
<b>Molekulargewicht [g/mol]</b>	1058,16	1382,5
<b>Isoelektrischer Punkt</b>	7,6	11,3

Für die Generierung von Spiegelmeren muss zunächst eine *in vitro* Selektion von Aptameren gegen das gespiegelte Zielmolekül, im Falle von Peptiden gegen die nicht-natürlich auftretende D-Form, durchgeführt werden. Die zwei ausgewählten Peptide wurden daher jeweils in ihrer D-Form synthetisiert (IBA GmbH, Göttingen) und später für die *in vitro* Selektionen eingesetzt. Die Integrität und Reinheit der Zielmoleküle wurde mittels MALDI TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight*) - und HPLC-Messungen bestimmt.

#### IV.1.4 IMMOBILISIERUNG DER PEPTID-ZIELMOLEKÜLE

Die Peptidzielmoleküle für die *in vitro* Selektionen wurden mittels der Streptavidin-Biotin-Interaktion immobilisiert. Die beiden Peptide *Strep-Tag-II* und Spiegel-Tag wurden daher in C-terminal biotinylierter Form bezogen. Als Immobilisierungsmatrix wurden magnetische Partikel verwendet, welche mit einer Schicht aus Streptavidin überzogen sind. Die Beladung der Partikel mit biotinyliertem Peptid wurde für beide Peptide mittels HPLC-Messungen bestimmt. Hierzu wurden verschiedene Mengen Peptid unter Standardbedingungen der *in vitro* Selektionsrunden an die Partikel immobilisiert. Anschließend wurde die Menge an nicht immobilisiertem Peptid im Überstand der Kopplung mittels HPLC vermessen. Tabelle IV-2 gibt die Beladung der Streptavidin-beschichteten Partikel für beide Peptide an.

**Tabelle IV-2: Beladung der Streptavidin-Partikel mit *Strep-Tag-II*-Peptid und Spiegel-Tag-Peptid**

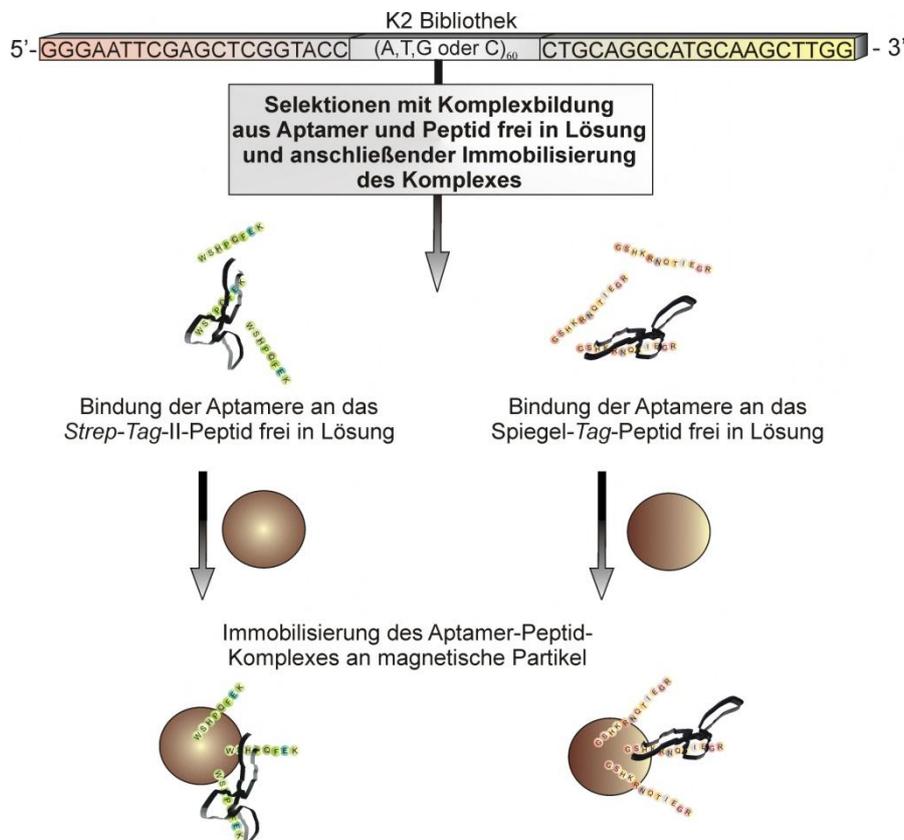
	Beladung [ $\mu\text{g}_{\text{Peptid}}/\text{mg}_{\text{Partikel}}$ ]
<b><i>Strep-Tag-II</i>-Peptid</b>	1,28
<b>Spiegel-Tag-Peptid</b>	0,85

Die durchschnittliche Beladung der Partikel entsprach somit 9,6 pmol/ $\mu$ l (*Strep-Tag-II*-Peptid) und 4,9 pmol/ $\mu$ l (*Spiegel-Tag*-Peptid) bei einer Partikelsuspension mit 10  $\mu$ g<sub>Partikel</sub>/ $\mu$ l.

## IV.1.5 SEPARATIONSSTRATEGIE DER *IN VITRO* SELEKTIONEN

Einer der kritischsten Schritte einer *in vitro* Selektion von Nukleinsäuren ist die Trennung bindender Spezies von ungebundenen Molekülen. In der vorliegenden Arbeit wurden *in vitro* Selektionen mit partikelbasierenden Separationsschritten durchgeführt. Die verwendeten Partikel besitzen einen magnetischen Kern, welcher die Abtrennung bindender Moleküle durch Anlegen eines magnetischen Feldes erleichtert.

In ersten Selektionsversuchen wurden die biotinylierten Peptide zunächst an die magnetischen Partikel immobilisiert und anschließend mit der DNA-Bibliothek inkubiert. Jedoch konnte nach mehreren Selektionen mit dieser Separationstechnik kein signifikanter Anstieg der Bindung von Aptameren an das *Strep-Tag-II*- beziehungsweise das *Spiegel-Tag*-Peptid erreicht werden. Nach einer Umstellung der Separationsmethode (Abbildung IV-2) konnten jedoch affine und spezifische Aptamere angereichert werden.



**Abbildung IV-2: Immobilisierungs- und Separationsmethode für die DNA-*in vitro* Selektionen.** In den Selektionen wurden die Zielpeptide zunächst frei in Lösung mit der DNA-Bibliothek inkubiert. Der Komplex aus Aptameren und Peptiden wurde anschließend mittels magnetischer Partikel aus der Lösung entfernt und weiter bearbeitet.

Innerhalb der Selektionen wurden die biotinylierten Peptide zunächst frei in Lösung mit der DNA-Bibliothek inkubiert. Anschließend wurde der Komplex aus Aptameren und Peptiden an Streptavidin-beschichtete magnetische Partikel immobilisiert. Diese Selektionsmethode bietet sich vor allem für kleine Zielmoleküle, wie etwa Peptide, an.

Die Streptavidin-beschichteten Partikel wurden mindestens im 2,5-fachen Überschuss der in Tabelle IV-2 angegebenen Peptid-Beladung eingesetzt, um eine vollständige Bindung der Peptide durch die Partikel zu gewährleisten. Durch HPLC-Messungen war vorher sichergestellt worden, dass bei diesem Überschuss das eingesetzte Peptid komplett aus dem Überstand entfernt wird.

Die hier beschriebene Immobilisierungs- und Separationsmethode wurde analog auch für die Bindungstests der Aptamere und Spiegelmere mit magnetischen Partikeln angewendet. An Stelle der DNA-Bibliothek wurde jeweils das Aptamer oder Spiegelmer eingesetzt.

#### IV.1.6 VERARBEITUNG BINDENDER MOLEKÜLE WÄHREND DER SELEKTIONSRUNDEN

Nach dem jeweiligen Selektionsschritt wurden bindende Moleküle innerhalb der *in vitro* Selektionsrunden vermehrt und für die nächste Runde der Selektion vorbereitet. Die Verarbeitung der Moleküle zwischen den eigentlichen Selektionsschritten wurde zunächst optimiert und anschließend stets nach diesem Protokoll durchgeführt. Das Vorgehen wurde hierbei so eingestellt, dass die Selektionsrunden sowohl in kurzer Zeit, als auch mit maximaler Überwachung der Reaktionsparameter durchgeführt werden konnten.

Zunächst wurde der Komplex aus Aptameren und Peptiden zur Abtrennung der Nukleinsäure von den magnetischen Partikeln mittels Hitze denaturiert. Die Denaturierung wurde hierbei direkt in jenem Puffer vollzogen, der für die anschließende Polymerasekettenreaktion verwendet wurde.

Die Vermehrung bindender DNA-Moleküle erfolgte über eine Unterteilung der Polymerasekettenreaktion in einen Zweistufenprozess. Zunächst wurde das gesamte Eluat der jeweiligen Selektionsrunde in einem kleinen Ansatz vermehrt, daraufhin folgte eine zweite Vermehrung mit zehn Prozent des ersten PCR-Ansatzes. Durch die Unterteilung der Polymerasekettenreaktion wird hierbei die Akkumulation unspezifischer Sequenzen, welche hinsichtlich ihrer Größe von dem gewünschten Produkt abweichen, verringert. Die voranschreitende Anreicherung von bindenden Molekülen in den Selektionsrunden geht mit einer Ansammlung an hochstrukturierten Molekülen einher, welche sich oft dadurch auszeichnen, dass sie sich schlecht amplifizieren lassen. Eine zweistufige Polymerasekettenreaktion bietet hierbei den Vorteil, dass der Amplifikationsschritt leichter überwacht und modifiziert werden kann, indem beispielsweise die Zyklenzahl angepasst werden kann.

An die Vermehrung der Moleküle schloss sich eine Verarbeitung der doppelsträngigen DNA mittels des  $\lambda$ -Exonuklease-Systems an. In der vorangegangenen Polymerasekettenreaktion wurde ein phosphorylierter *Reverse* Primer benutzt, wodurch der Matrizenstrang des Doppelstranges phosphoryliert vorlag. Beim Umsatz der doppelsträngigen DNA mit dem Enzym  $\lambda$ -Exonuklease wurde spezifisch der phosphorylierte Matrizenstrang abgebaut. Der Aptamerstrang wurde danach gereinigt und in die nächste Selektionsrunde eingesetzt.

## IV.1.7 SPIEGELMERE GEGEN DAS *STREP-TAG-II*-AFFINITÄTSPEPTID

### IV.1.7.1 *Strep-Tag-II*-SELEX

Für die Selektion von Aptameren gegen das gespiegelte *Strep-Tag-II*-Peptid wurde das Puffersystem PBS (*Phosphate Buffered Saline*) verwendet, ein Phosphatpuffer-System mit Natriumchlorid, Kaliumchlorid und einem physiologischen pH-Wert von 7,4. Zusätzlich wurde Magnesiumchlorid eingesetzt, da dieses die Bindung von Aptameren unterstützen kann. Ebenfalls zugesetzt wurde Tween 20, ein Detergenz, welches die Handhabung von magnetischen Partikeln als Selektionsmatrix erleichtert.

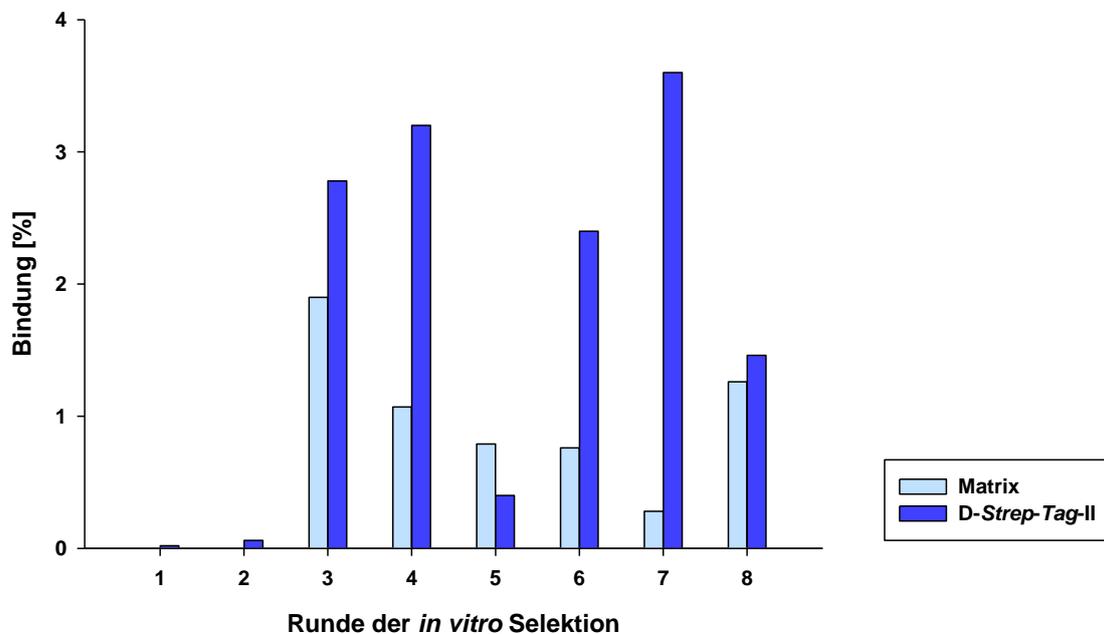
Für die erste Runde der *in vitro*-Selektion wurden 3 nmol der K2-Bibliothek eingesetzt. Zur Quantifizierung der Nukleinsäure wurden drei Prozent der Bibliothek am 5'-Ende radioaktiv markiert. In den folgenden Selektionsrunden erfolgte die radioaktive Quantifizierung der Bindung mittels des Einbaus von markiertem dCTP während der Polymerasekettenreaktion. Die Separierung bindender DNA-Moleküle erfolgte wie in Abschnitt IV.1.5 beschrieben. Zunächst wurde die Bindung der DNA-Bibliothek an das *Strep-Tag-II*-Peptid frei in Lösung durchgeführt, anschließend wurde der Aptamer-Peptid-Komplex mittels magnetischer Streptavidin-Partikel aus der Lösung separiert.

**Tabelle IV-3: Stringenzerhöhung während der *Strep-Tag-II*-SELEX.** Sowohl die Konzentration der DNA-Bibliothek, als auch die des Peptides wurde verringert. Das jeweils eingesetzte Verhältnis zwischen DNA und Zielmolekül wurde ab Runde drei schrittweise vergrößert, ebenfalls um die Stringenz der Selektion zu erhöhen.

Runde der <i>in vitro</i> Selektion	c(DNA) [nM]	c(D- <i>Strep-Tag-II</i> ) [nM]	Verhältnis DNA : <i>Strep-Tag-II</i>
1	1000	200	5 : 1
2	750	2300	1 : 3
3	300	300	1 : 1
4	200	133	3 : 2
5	100	25	4 : 1
6	100	25	4 : 1
7	100	12,5	8 : 1
8	100	12,5	8 : 1

Da bereits ab der dritten Selektionsrunde der *in vitro* Selektion ein starkes Ansteigen der Bindung an das *Strep-Tag-II*-Peptid zu beobachten war, wurden ab der dritten Selektionsrunde verschiedene Methoden zur Erhöhung der Stringenz angewendet (Tabelle IV-3).

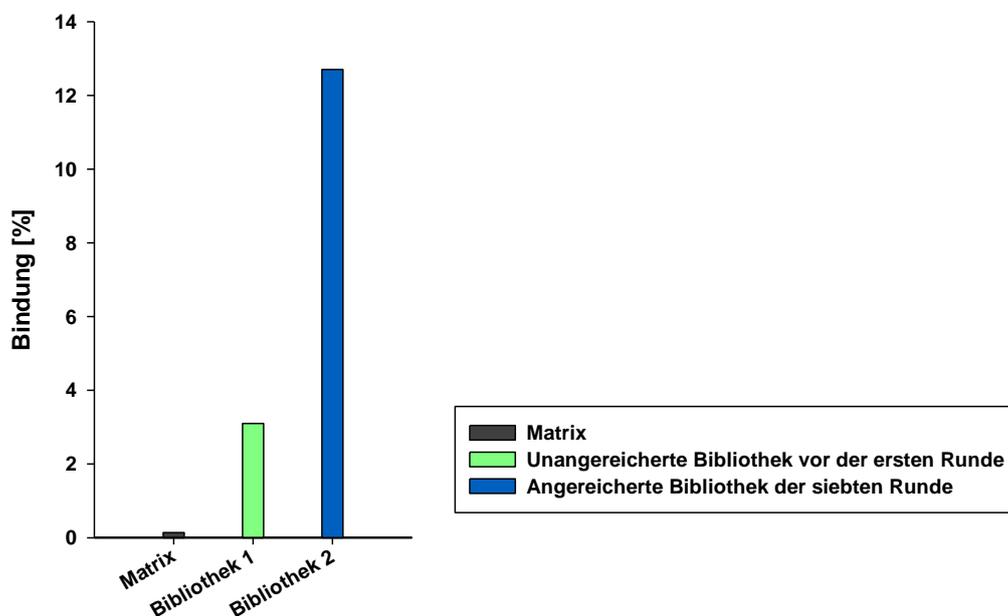
Die DNA-Konzentration wurde bereits ab Runde eins schrittweise verringert, ab Runde fünf wurde für die folgenden Runden eine Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  verwendet. Die Konzentration an Peptid wurde ebenfalls stark verringert, in Runde fünf und sechs wurden 0,025  $\mu\text{M}$  eingesetzt, in den folgenden Runden 0,0125  $\mu\text{M}$ . Das Verhältnis zwischen DNA und Peptid wurde schrittweise vergrößert, nach dem ersten Ansteigen der Bindung in der dritten Runde (Abbildung IV-3) wurde die DNA ab Runde vier im Überschuss zugegeben, um eine Konkurrenz der Moleküle um das Zielmolekül zu verstärken. Ab Runde drei wurde die Anzahl der Waschschrte auf drei erhöht.



**Abbildung IV-3: Anreicherung *Strep-Tag-II*-spezifischer DNA-Aptamere in der *Strep-Tag-II*-SELEX.** Dargestellt ist die Bindung der DNA-Bibliotheken der einzelnen *in vitro* Selektionsrunden an das Zielmolekül *Strep-Tag-II* (dunkelblau) und der ab der dritten Selektionsrunde eingesetzten Präselektion gegen Streptavidin-beschichtete Partikel (Matrix, hellblau).

Eine Präselektion wurde ab der dritten Runde der *in vitro* Selektion eingeführt, um eine Anreicherung von DNA-Molekülen gegen die Streptavidin-beschichteten Partikel zu unterbinden. Hierzu wurde die Bibliothek zunächst mit unbeladenen Streptavidin-beschichteten Partikeln inkubiert und nicht-bindende Moleküle anschließend in die Selektion gegen das *Strep-Tag-II*-Peptid eingesetzt. Die unspezifische Bindung an das Streptavidin auf der Partikeloberfläche verringerte sich zunehmend mit voranschreitender Rundenanzahl.

Die Bindung der Aptamer-Bibliothek an das *Strep-Tag-II* Peptid verringerte sich in Runde fünf durch die zunehmend stringenten Bedingungen auf 0,4 %, um anschließend auf 2,4 % in der sechsten und 3,6 % in der siebten Runde anzusteigen. Ab der achten Runde wurde eine Zunahme an matrixbindenden Molekülen ohne eine weitere Zunahme der peptidbindenden Moleküle detektiert. Daher wurde die angereicherte DNA-Bibliothek der siebten Runde kloniert. Hierzu wurde diese Runde der *in vitro* Selektion wiederholt und die einzelsträngige DNA mittels einer Auffüll-Polymerasekettenreaktion zunächst in doppelsträngige DNA überführt. Diese wurde ohne einen Vermehrungsschritt in einen Vektor kloniert, um die Sequenzen der Bibliothek zu vereinzeln und anschließend zu analysieren. Abbildung IV-4 zeigt einen Bindungstest der angereicherten DNA-Bibliothek der siebten Selektionsrunde mit dem Zielmolekül im Verhältnis 1:1.



**Abbildung IV-4: Bindungstest mit der angereicherten DNA-Bibliothek der siebten Runde der *in vitro* Selektion gegen das *Strep-Tag-II*-Peptid.** Die Bindung der Bibliothek an das *Strep-Tag-II*-Peptid im Verhältnis 1:1 betrug in der siebten Runde 12,7 %. Im Vergleich dazu konnte keine Bindung dieser Bibliothek an die Selektionsmatrix, bestehend aus Streptavidin-beschichteten Partikeln, beobachtet werden. Die Bibliothek, welche in die erste Runde der Selektion eingesetzt worden war, band das *Strep-Tag-II*-Peptid mit 3,1 %. Bindende DNA-Moleküle wurden somit um den Faktor vier angereichert.

#### IV.1.7.2 Primärstrukturanalyse *Strep-Tag-II*-bindender Aptamere

66 Aptamerklone der siebten Selektionsrunde gegen das *Strep-Tag-II*-Peptid wurden hinsichtlich ihrer Primärstruktur analysiert und mit Hilfe des Programmes *Geneious* auf Homologien innerhalb des Zufallsbereiches untersucht (Abbildung IV-5). Hierbei wurden zunächst die konservierten Primerbindungs- und Primer-Bereiche an den 5'- und 3'-Enden

# ERGEBNISSE



**Abbildung IV-5: Einordnung der Aptamersequenzen gegen das *Strep-Tag-II*-Peptid.** Auf Grund der Homologien der Sequenzen innerhalb des Zufallsbereiches konnten die 66 Klone in sechs Gruppen und eine Einzelsequenz eingeteilt werden. In jeder Gruppe bestehen Unterschiede der Sequenzen untereinander nur in einzelnen Nukleotidabweichungen durch Basendeletionen, -insertionen oder -substitutionen. Die Farben entsprechen den vier Desoxynukleotiden: gelb = G, grün = T, rot = A, blau = C.

der Sequenzen entfernt, anschließend wurden die Zufallsbereiche einer Sequenzanalyse zur Gruppierung (*Alignment*) unterzogen.

Die Sequenzen der 66 Klone konnten in sechs verschiedene Gruppen und eine Einzelsequenz eingeteilt werden (Gruppen A - F und ST-154). Innerhalb einer Gruppe unterscheiden sich die Sequenzen nur durch einzelne Nukleotide, also durch Basensubstitutionen, -insertionen oder -deletionen.

Die Sequenzen der Gruppe A, Vertreter des Aptamers ST-146, bestimmen die Bibliothek etwa zu einem Drittel (Tabelle IV-4). Ein Viertel aller Sequenzen entspricht derjenigen des Aptamers ST-134 (Gruppe B). Einen ebenfalls hohen Anteil an der Gesamtheit der Sequenzen haben die Aptamere der Gruppen C und D mit 18 % und 14 %. Die Sequenzen der Gruppen E und F sind im einstelligen Prozentbereich vertreten und die Sequenz des Aptamers ST-154 kommt einmal vor.

**Tabelle IV-4: Charakteristika der Primärsequenz der Klone.**

<b>Gruppe / Vertreter</b>	<b>Anzahl der Klone</b>	<b>Häufigkeit [%]</b>	<b>Länge [nt]</b>	<b>Anteil G [%]</b>
<b>Gruppe A / ST-146</b>	21	31,8	89	39,5
<b>Gruppe B / ST-134</b>	17	25,8	90	43,3
<b>Gruppe C / ST-168</b>	12	18,2	89	45,1
<b>Gruppe D / ST-120</b>	9	13,6	90	42
<b>Gruppe E / ST-126</b>	4	6,1	91	40,7
<b>Gruppe F / ST-169</b>	2	3,0	89	34,7
<b>ST-154</b>	1	1,5	90	40,0

Der Zufallsbereich aller sieben unterschiedlichen Sequenzen weist mit einem durchschnittlichen Gehalt an Desoxyguanosinnukleotiden von 41 % einen sehr hohen Anteil an diesem Nukleotid auf. Bei einer statistischen Verteilung aller vier Nukleotide läge dieser Wert bei etwa 25 %. Des Weiteren sind Desoxythymidinnukleotide mit einem Vorkommen von 31 % ebenfalls stark vertreten. Die Nukleotide T und G bestimmen zusammen mit etwa 72 % die Sequenz des Zufallsbereiches.

Auffällig ist die Reduktion der Gesamtlänge bei allen sieben Sequenzen. Ausgehend von einer Gesamtlänge der Bibliothek von 100 Nukleotiden weisen alle Sequenzen eine Länge im Bereich von 89 - 91 Nukleotiden auf. Der Grund hierfür sind Fehler innerhalb der Polymerasekettenreaktion. Durch das vermehrte Auftreten von dG-reichen Sequenzabschnitten kann es zu einem ‚Überspringen‘ einzelner Nukleotide bei der Replikation durch die Polymerase kommen (197) und somit im Verlauf der gesamten *in vitro* Selektion zu einer Verkürzung der Sequenzen.

Im Folgenden wurden die sieben verschiedenen Sequenzen der Gruppen A - F und ST-154 auf Homologien der Sequenzen untereinander untersucht. Hierfür wurde jeweils ein Vertreter der Gruppe ausgewählt und die Sequenzen erneut gruppiert (Abbildung IV-6). Es konnten vier Bereiche von drei oder vier Nukleotiden Länge gefunden werden, welche in jeder der Sequenzen vorkommen. Diese vier Boxen bestehen bis auf geringe Abweichungen ausschließlich aus den Nukleotiden dG und dT. Für die vier Bereiche der Sequenzen konnte eine Konsensussequenz mit der Abfolge GGT-GGT-GGTT-GGT formuliert werden, wobei die Bindestriche für die Anzahl  $n$  der Nukleotide mit  $n = 0 - 10$  stehen. Die vier Boxen liegen innerhalb der jeweiligen Sequenzen teilweise direkt aufeinander folgend vor, oder werden durch Sequenzabfolgen unterbrochen, welche innerhalb der sieben Sequenzen nicht konserviert sind. Die Konsensussequenz des Aptamers ST-146 besitzt die größte Divergenz. Insgesamt weichen drei Nukleotide von der Konsensussequenz ab (gelb und blau markierte Nukleotide in Abbildung IV-6).

ST-146	TCC-----GGG-----GGG-----GGT-----GGTGTGGGGCAGGAGGTACTTTCCAGGCA	GGG	GGATTCT	GGTC	GGT
ST-134	TTTCCTGGGGGCACGGATTGGCGATTGGTTCAT-----GGTGT-----GGTT-----GGTAGTGC	GGT	GGTGT	GGTT	GGT
ST-168	GA-----GGTGCCCGCTAGGGGTA-----GGTT-----GGTTGTGGGCGGTACCCGGACTCACA	GGT	GGTT	GGTT	GGT
ST-120	GTTTAGAGTTTGCATGAGTGCAGAGAGGGTGAT-----GGTGT-----GGTTCGTATTGGC	GGT	GGTGT	GGTT	GGT
ST-126	CACCCTCGGGCTTGTGTGCTCTGCT-----GGTAGGTTA-----GGTTGTGGGGTT-----GGTGC	GGT	GGTAGGTTA	GGTT	GGT
ST-169	GGATTGGTGT-----GGTGAT-----GGTTT-----GGTTCGTA-----GGTACGTCTTTTGAATTCTA	GGT	GGTGAT	GGTT	GGT
ST-154	CCAGCGAGTGCAGAGGGGCTA-----GGTGTATG-----GGTTA-----GGATTCT-----GGTGCCCAT	GGT	GGTGTATG	GGTTA	GGT
Konsensussequenz		GGT	GGT	GGTT	GGT
		Box 1	Box 2	Box 3	Box 4

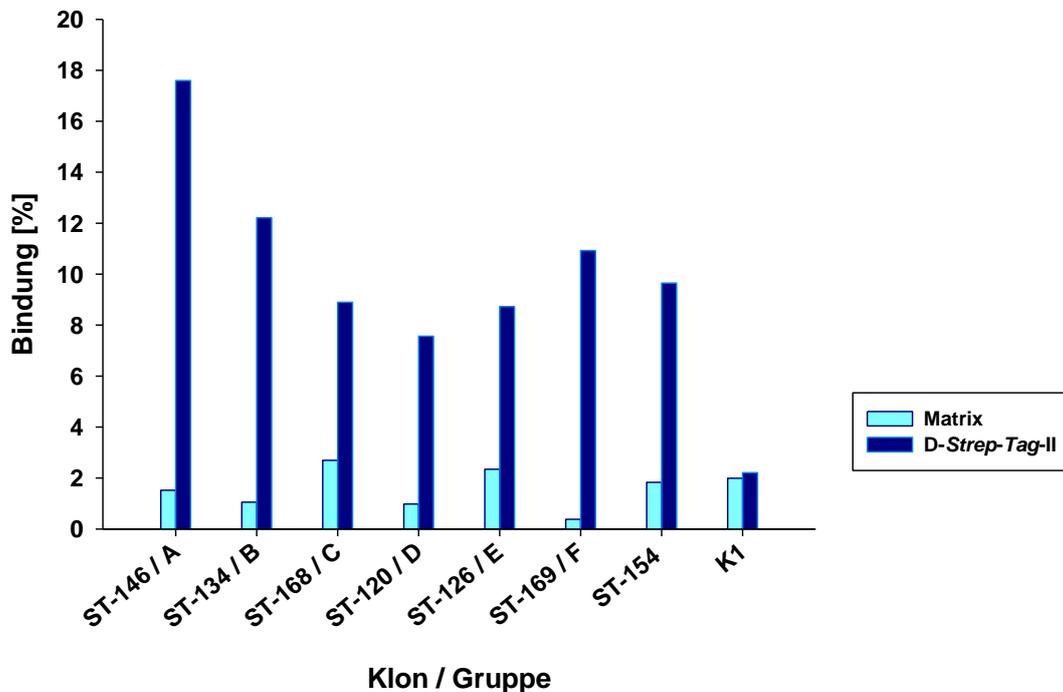
**Abbildung IV-6 Gruppierung der Sequenzen der Gruppen A - F und ST-154 zur Formulierung eines gemeinsamen Sequenzmotives.** Vier Bereiche der Sequenzen liegen als konservierte Boxen von drei (Box 1, 2 und 4) beziehungsweise vier Nukleotiden Länge (Box 3) vor. Dargestellt ist nur der Zufallsbereich der Sequenzen. Die vier konservierten Bereiche sind grün hervorgehoben, wobei Abweichungen von der Konsensussequenz in gelb (A) oder blau (C) dargestellt sind.

### IV.1.7.3 Bindungsaffinitäten der *Strep-Tag-II*-Aptamere

Jeweils ein Vertreter der sechs Gruppen A - F und ST-154 wurde auf die Bindung an das *Strep-Tag-II*-Peptid untersucht (Abbildung IV-7). Hierzu wurden die Bindungstests gemäß der Durchführung der Bindung innerhalb der *in vitro* Selektionsrunden ausgeführt. Zunächst wurde das Aptamer frei in Lösung mit dem Peptid inkubiert und anschließend der Aptamer-Peptid-Komplex mit Streptavidin-beschichteten Partikeln aus der Lösung separiert. Der Gehalt an gebundenem Aptamer wurde vermessen und der Bindung an die Selektionsmatrix gegenübergestellt. Die Konzentration an Aptamer betrug 0,1  $\mu\text{M}$  und die Konzentration an Peptid 0,25  $\mu\text{M}$ .

Alle Aptamere haben eine sehr geringe Affinität für die Selektionsmatrix. Alle sieben Aptamere binden das Zielmolekül *Strep-Tag-II*-Peptid im Vergleich zu der unangereicherten DNA-Bibliothek. Die mit etwa einem Drittel auch am häufigsten in der angereicherten Bibliothek vorkommende Sequenz des Aptamers ST-146 zeigt mit 17,6 % Bindung die

stärkste Affinität für das Peptid. Ebenfalls im zweistelligen Bereich binden die Klone der Gruppen B und F mit 12,2 % und 10,9 %. Das allein auftretende Aptamer ST-154 bindet das *Strep-Tag-II*-Peptid mit einer Affinität von 9,7 %. Die Aptamere der Gruppen C und E binden das Zielmolekül mit etwa 9 %. Die geringste Bindung wurde für die Sequenz ST-120 mit 7,6 % Bindung ermittelt.

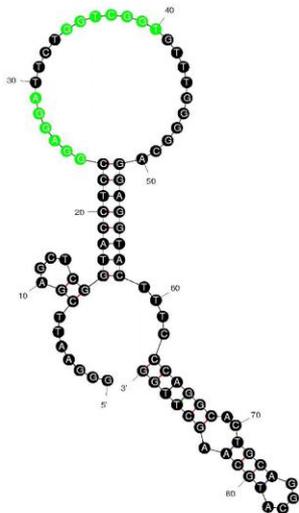


**Abbildung IV-7: Bindung der Aptamere an das *Strep-Tag-II*-Peptid.** Neben der Bindung der Aptamere an das *Strep-Tag-II*-Peptid wurde die Bindung an die Matrix Streptavidin-Partikel untersucht. Als Kontrolle K1 diente die unangereicherte Bibliothek, welche in die erste Runde der *in vitro* Selektion eingesetzt worden war.

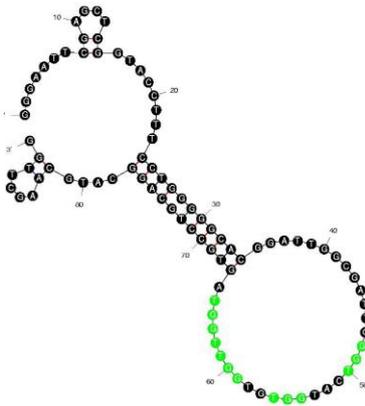
#### IV.1.7.4 Sekundärstruktur *Strep-Tag-II*-bindender Aptamere

Die Sekundärstrukturen der sieben verschiedenen Aptamere (Abbildung IV-8) wurden mit dem Program *Mfold* bestimmt. Dieses berechnet Faltungen für RNA- und DNA-Moleküle gemäß des Zuker-Algorithmus (198). Die Aptamersequenzen wurden inklusive der Primer- und Primerbindungsgebiete zur Analyse herangezogen, da diese zur Strukturbildung des Moleküls ebenso beitragen wie der Zufallsbereich der Aptamere.

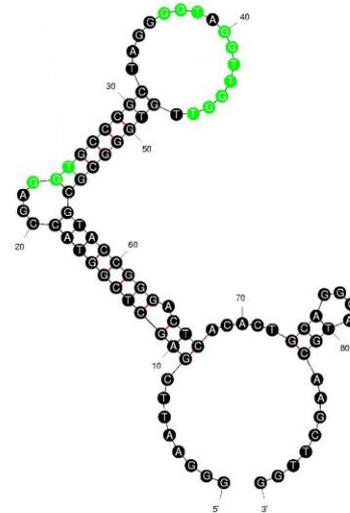
Als Bedingungen für die Hybridisierungsberechnungen wurden die Einstellungen 137 mM Natriumionen und 1 mM Magnesiumionen gemäß der Pufferbedingungen und eine Temperatur von 23 °C gewählt. Neben der Sekundärstrukturvorhersage der Moleküle werden von diesem Program auch die zugehörigen Freien Energien  $\Delta G$  der jeweiligen Faltung des Oligonukleotides berechnet (199). Je niedriger der Wert der Freien Energie ist, desto stabiler ist die jeweilige Faltungsvariante einzustufen.



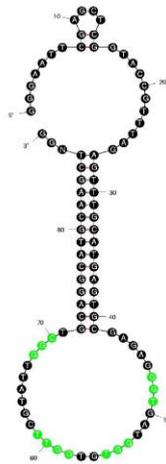
Gruppe A / ST-146



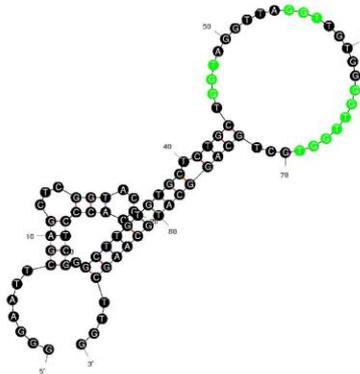
Gruppe B / ST-134



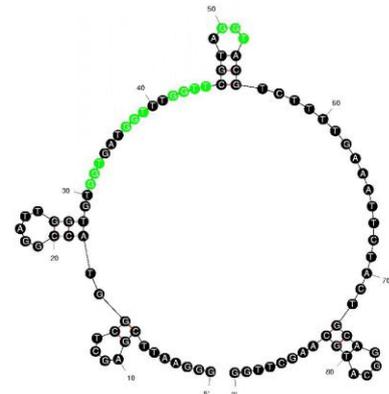
Gruppe C / ST-168



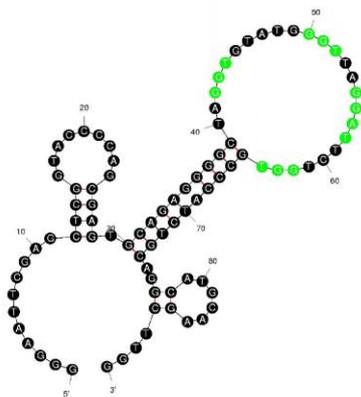
Gruppe D / ST-120



Gruppe E / ST-126



Gruppe F / ST-169



ST-154

Gruppe A	$\Delta G = -15,26$ kcal/mol
Gruppe B	$\Delta G = -10,97$ kcal/mol
Gruppe C	$\Delta G = -15,46$ kcal/mol
Gruppe D	$\Delta G = -10,04$ kcal/mol
Gruppe E	$\Delta G = -13,90$ kcal/mol
Gruppe F	$\Delta G = -9,87$ kcal/mol
ST-154	$\Delta G = -14,51$ kcal/mol

**Abbildung IV-8. Sekundärstrukturen der sieben *Strep-Tag-II*-bindenden Aptamere.** Dargestellt sind die Sekundärstrukturen und die dazugehörigen Freien Energien  $\Delta G$  der Faltungen. Es sind jeweils nur die energieärmsten Faltungen der Aptamere dargestellt. Die konservierten Sequenzbereiche gemäß Abbildung IV-6 sind grün eingefärbt.

Alle Aptamere bis auf ST-169 weisen eine ausgeprägte Sekundärstruktur auf. Diese besteht bei den Aptameren ST-146, ST-134, ST-120, ST-126 und ST-154 aus einer Haarnadel. Haarnadeln bestehen aus einem doppelsträngigen Bereich, der in einen einzelsträngigen Bereich (Schleife) übergeht. Bei diesen Aptameren liegen die als Konsensussequenz definierten Bereiche innerhalb der Schleife.

Neben dem größeren Haarnadelbereich besitzen diese Aptamere im Bereich der Primer- und Primerbindungsgebiete am 5'- und am 3'-Ende kleinere Haarnadelstrukturen aus acht bis 20 Nukleotiden Länge. ST-146 besitzt hierzu noch eine größere Haarnadel mit vorheriger Ausbuchtung im 3'-Bereich der Sequenz. Die Freien Energien der Faltungen dieser Aptamere liegen im zweistelligen Bereich zwischen etwa -10 kcal/mol und -15 kcal/mol. Der Wert divergiert zwischen den einzelnen Hybridisierungen abhängig von der Anzahl an Nukleotiden, welche in doppelsträngigen Bereichen organisiert vorliegen und somit zu einer Verringerung der Freien Energie beitragen.

Das Aptamer ST-168 weicht von den anderen Aptameren ab, da sich hier die konservierten Nukleotide nicht ausschließlich in der Schleife der großen Haarnadel befinden. Die Struktur dieses Aptamers weist zwei lange doppelsträngige Bereiche auf. Der erste Doppelstrangbereich geht in eine Ausbuchtung aus vier Nukleotiden über, danach folgt der zweite Doppelstrangbereich mit einer Schleife aus 16 Nukleotiden. Die Nukleotide der ersten Box befinden sich innerhalb der Ausbuchtung und im zweiten Stamm des Doppelstrangbereiches. Die Nukleotide der Boxen eins bis drei dagegen sind in der Schleife der Haarnadel zu finden. Mit einem Wert von - 15,5 kcal/mol weisen die Aptamere vom Typ ST-168 auch die niedrigste Freie Energie der Faltung auf, da hier besonders viele Nukleotide eine Bindung in einem Doppelstrang ausbilden.

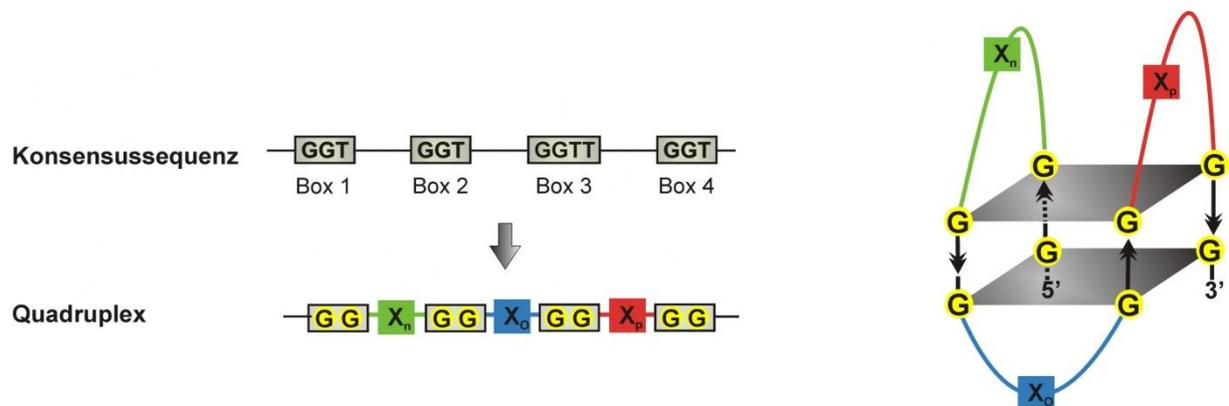
Eine von den restlichen Strukturen abweichende Sekundärstruktur hat auch das Aptamer ST-169. Die gesamte Struktur hat eine eher ungefaltete Form, es gibt in dem gesamten 89 Nukleotide langen Molekül nur 22 Nukleotide, die in einem Doppelstrang vorliegen und in vier kleinen Haarnadeln organisiert sind. Die konservierten Bereiche befinden sich größtenteils zwischen der ersten und der zweiten kleinen Haarnadel, wobei Nukleotide der vierten Box in der Schleife der zweiten Haarnadel zu finden sind. Die Freie Enthalpie  $\Delta G$  dieser Faltung ist auf Grund des Fehlens längerer Doppelstrangbereiche mit einem Wert über -10 kcal/mol angegeben und damit die thermodynamisch instabilste der Faltungen.

Die Sekundärstrukturvorhersagen mittels des Programmes *Mfold* beschränken sich jedoch auf die Vorhersage von Hybridisierungsbereichen innerhalb der Moleküle. Über ein weiteres, bei Aptameren sehr häufig anzutreffendes Motiv der Faltung, dem G-Quadruplex-Motiv, kann mittels konventioneller Sekundärstrukturanalyseprogramme keine Aussage getroffen werden (199).

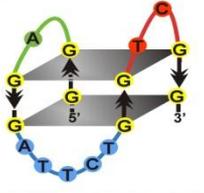
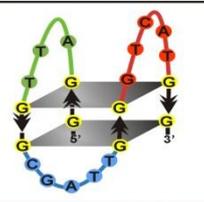
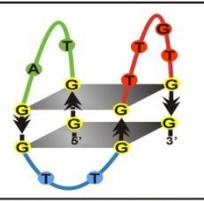
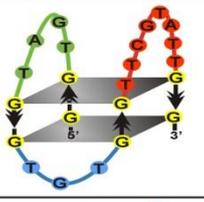
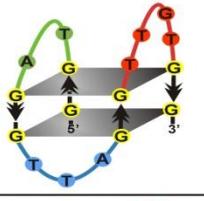
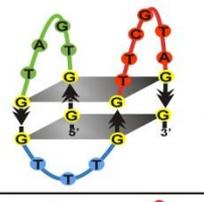
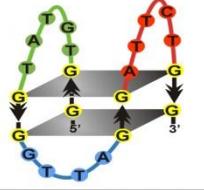
## IV.1.7.4.1 G-Quadruplex-Motive *Strep-Tag-II*-bindender Aptamere

Für ein Auftreten von G-Quadruplexmotiven bei den *Strep-Tag-II*-bindenden Aptameren sprechen verschiedene Faktoren. Zum einen gibt es vor allem im Bereich der konservierten Nukleotide der Konsensussequenz eine auffällige Häufung an paarweise auftretenden G-Nukleotiden. Dieses Arrangement ist typisch für G-Quadruplexe. Zum Anderen zeigte die Analyse der Sekundärstruktur der Moleküle, dass nahezu alle konservierten Bereiche in einzelsträngigen Bereichen der Moleküle, in den Schleifen der großen Haarnadeln, vorliegen. Die Unstrukturiertheit dieser wahrscheinlich für die Bindung verantwortlichen Bereiche der Aptamere spricht so ebenfalls für das Vorhandensein eines weiteren strukturellen Elements wie dem G-Quadruplex. Vor allem das Aptamer ST-169 hat eine auffällig unstrukturierte Form, dennoch ist es in Bindungstests in der Lage, das Zielmolekül affin zu binden. Weiterhin spricht die ermittelte Kaliumionen-Abhängigkeit der Bindung des ST-146 an das *Strep-Tag-II*-Peptid (Abschnitt IV.1.7.6.3) für ein tatsächliches Vorhandensein der G-Quadruplexstruktur.

Die Konsensussequenz der konservierten Nukleotide der *Strep-Tag-II*-bindenden Aptamere entspricht der Formel  $G_2X_nG_2X_oG_2X_p$  für einen G-Quadruplex (Abbildung IV-9).



**Abbildung IV-9: Ableitung der Konsensussequenz als G-Quadruplexmotiv.** Die Konsensussequenz aus den Sequenzen der sieben *Strep-Tag-II*-bindenden Aptamere entspricht der Formel  $G_2X_nG_2X_oG_2X_pG_2$  für einen unimolekularen Quadruplex bestehend aus jeweils zwei Ebenen aus vier Gs. Die Thymidine der Konsensussequenz werden hierbei den Schleifen 1, 2 und 3 bestehend aus den Nukleotiden  $X_n$ ,  $X_o$  und  $X_p$  zugeordnet. Die Schleifen können zusätzliche Nukleotide, welche nicht konserviert sind, enthalten. Auf der rechten Seite der Abbildung ist schematisch ein aus der Konsensussequenz abgeleiteter möglicher Quadruplex dargestellt. Die Farben wurden in der G-Quadruplex-Sequenz und in der schematischen Darstellung wie folgend gewählt: Ausgehend vom 5'-Ende der Sequenz entspricht grün den Nukleotiden der ersten Schleife, blau den Nukleotiden der zweiten Schleife und rot den Nukleotiden der dritten Schleife. Die Darstellung entspricht dem nach Burge et al. (180) vorgeschlagenen Schema, als Beispiel wurde eine antiparallele Anordnung der Stränge gewählt.

ST-146	<pre> 5'-GGAGGATTCTGGTCGGTGTGTTGGGGCA-3' GGAGGATTCTGGTCGG GGAGGATTCTGGTCGGTGTGTTGGGG GGATTCTGGTCGGTGTGTTGGGG                     </pre>	
ST-134	<pre> 5'-GGATTGGCGATTGGGTCATGGTGTGGTTGGTA-3' GGATTGGCGATTGGGTCATGG GGCGATTGGGTCATGGTGTGGTTGG GGGTCATGGTGTGGTTGG                     </pre>	
ST-168	<pre> 5'-CGAGGTGCCCGCTAGGGGTAGGTTGGTTGTGGGCCGC-3' GGGGTAGGTTGGTTGTGGG                     </pre>	
ST-120	<pre> 5'-GAGAGGGTGATGGTGTGGTTCGTATTGGCT-3' GGGTGATGGTGTGGTTCGTATTGG                     </pre>	
ST-126	<pre> 5'-TGGTAGGTTAGGTTGTGGGGTTGGTGCT-3' GGTAGGTTAGGTTGTGGGG GGTAGGTTAGGTTGTGGGGTTGG GGTTAGGTTGTGGGGTTGG                     </pre>	
ST-169	<pre> 5'-GTGGTGATGGTTTGGTTCGTAGGTACG-3' GGTGATGGTTTGGTTCGTAGG                     </pre>	
ST-154	<pre> 5'-TAGGTGTATGGGTTAGGATTCTGGT-3' GGTGTATGGGTTAGGATTCTGG                     </pre>	

**Abbildung IV-10: Potentielle G-Quadruplex-Motive der *Strep-Tag-II*-bindenden Aptamere.** Alle sieben verschiedenen *Strep-Tag-II*-bindenden Aptamere enthalten mindestens ein Quadruplexmotiv in demjenigen Bereich, welcher die konservierten Nukleotide der Konsensussequenz trägt. Die Sequenzen in den Tabellen geben die G-Quadruplex-Einheit an und den Bereich des Aptamers, in der der G-Quadruplex auftritt. Bei mehreren Möglichkeiten zur Ausbildung eines G-Quadruplexes ist die Sequenz der jeweiligen Einheit in der Tabelle aufgeführt. Im Falle mehrerer G-Quadruplex-Einheiten für ein Aptamer wurde jeweils die als Erste in der Tabelle aufgeführte Sequenz schematisch dargestellt. Die G-Paare der G-Quadruplexe sind in den Sequenzen und den schematischen Abbildungen gelb markiert, die Nukleotide der ersten Schleife jeweils grün, die der zweiten Schleife blau und diejenigen der dritten Schleife rot. Alle möglichen Quadruplex-Formationen der *Strep-Tag-II*-bindenden Aptamere bestehen aus G-Quadruplexen mit G<sub>2</sub>-Einheiten. Im Falle einer Abfolge von drei oder vier Gs wurde dennoch die gelbe Kennzeichnung für die gesamte G-Abfolge gewählt, diese jeweils zusätzlichen Quadruplexe werden jedoch nicht in den Tabellen aufgeführt.

Eine Analyse hinsichtlich vorhandener Quadruplex-Motive, unterstützt durch das Programm *Quadfinder*, identifizierte bei allen sieben *Strep-Tag-II*-bindenden Aptameren mindestens einen G-Quadruplex (Abbildung IV-10). Für diese Analyse wurden jeweils die Schleifen der Haarnadelstrukturen als Träger der konservierten Nukleotide der Konsensussequenz gewählt. Im Falle des Aptamers ST-168 wurde die Ausbuchtung und die Haarnadel verwendet, welche die konservierten Nukleotide beinhaltet. Für eine Analyse des Aptamers ST-169 wurde der Bereich um die konservierten Nukleotide gewählt. Die mögliche Anzahl der Nukleotide in den Schleifen wurde auf eins bis acht beschränkt.

Alle Aptamere enthalten mindestens einen unimolekularen G-Quadruplex entsprechend der Formel  $G_2X_{1-8}G_2X_{1-8}G_2X_{1-8}G_2$ . Das bedeutet, dass sämtliche ermittelte G-Quadruplexe aus Zweierpaaren Gs innerhalb der Quadruplex-Formation bestehen. Im Falle von Abfolgen von mehr als zwei Gs wurden diese den Schleifen X zugeordnet und nicht als zusätzliche G-Quadruplexe aufgeführt.

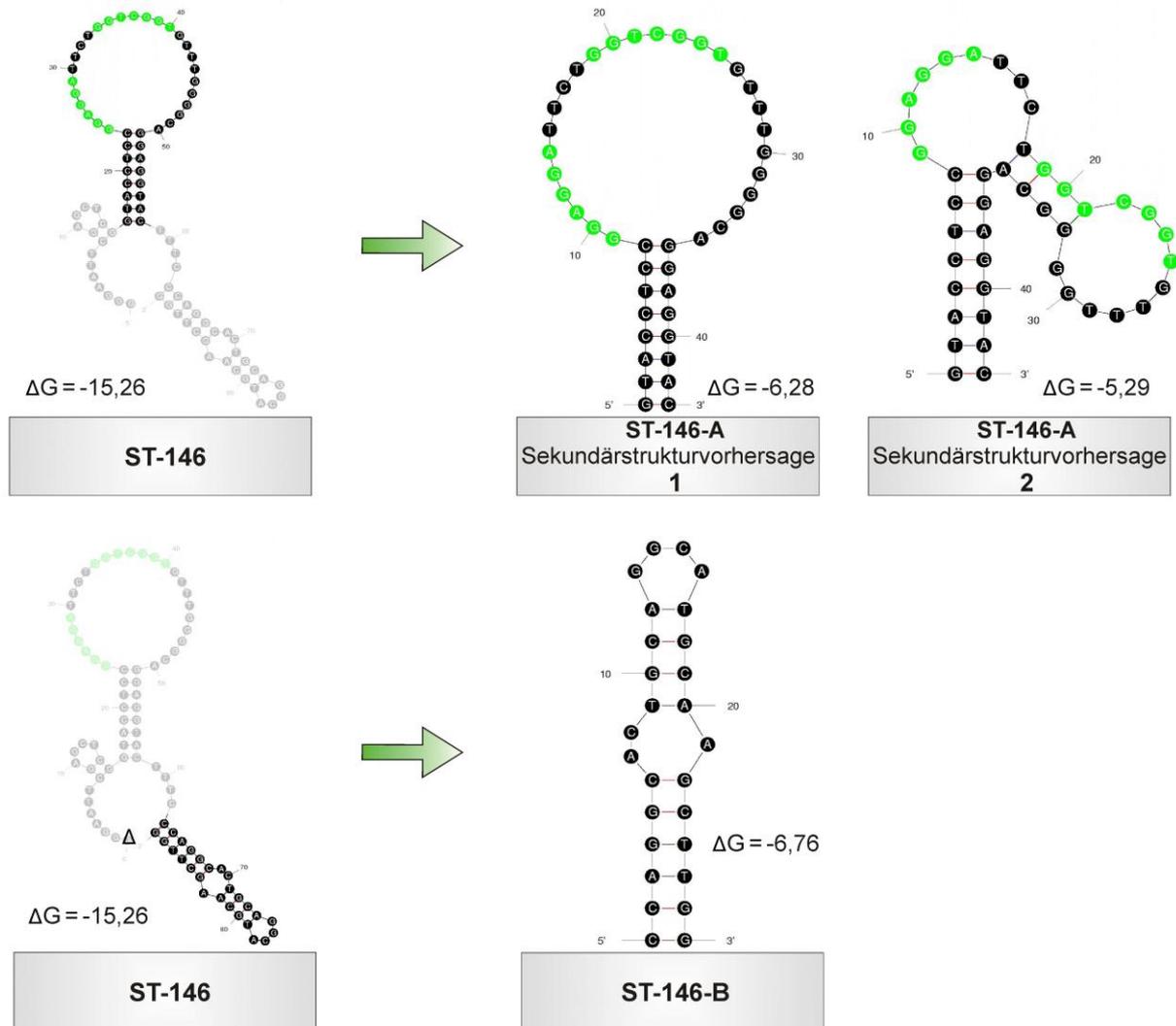
Im Falle der Aptamere ST-146, ST-134 und ST-126 konnten jeweils sogar drei verschiedene potentielle Quadruplexformationen innerhalb der Haarnadelschleifen identifiziert werden. Generell verringert sich die Stabilität des G-Quadruplexes mit zunehmender Länge der Schleifen. Wenn allerdings nur eine der Schleifen von einer Verlängerung über sechs Nukleotide betroffen ist, verringert sich dieser destabilisierende Effekt sehr stark, vor allem bei koordinierten Kaliumionen (200). Daher kann hier keine Wahrscheinlichkeit für das Vorkommen eines bestimmten G-Quadruplexes in diesen Bereichen der Moleküle mit mehreren potentiellen G-Quadruplexen angegeben werden. Möglich ist auch eine Mischung der vorhandenen G-Quadruplexe, jedoch können diese Begebenheiten nur mit einer Strukturaufklärung der Moleküle vollständig aufgeklärt werden.

#### IV.1.7.5 Verkürzungsexperimente

Die Suche nach Verkürzungen von erhaltenen Aptameren dient der Suche nach einem Minimalmotiv. Kann bei verkürzten Versionen des selektierten Aptamers eine Bindung an das Zielmolekül nachgewiesen werden, kann das Bindungsmotiv somit auf diesen Bereich der Gesamtsequenz eingegrenzt werden. Zudem wird durch eine Verkürzung des Moleküls eine Senkung der Kosten für die Synthese der Moleküle erreicht, was vor allem bei einer Synthese des Moleküls als Spiegelmer von Bedeutung ist.

Zunächst wurde der beste Binder ST-146 für Verkürzungsstudien herangezogen (Abbildung IV-11). Für die Verkürzung ST-146-A wurden 15 Nukleotide vom 5'- und 31 Nukleotide vom 3'-Ende entfernt. Die Verkürzung ST-146-A ist somit auf die größte der Haarnadeln des Moleküls ST-146 reduziert. Die Schleife dieser Haarnadel enthält alle konservierten Nukleotide der *Strep-Tag-II*-bindenden Aptamere, daher war hier eine Bindung an das Zielmolekül durch die verkürzte Version zu erwarten. Als Kontrolle wurde die zweite

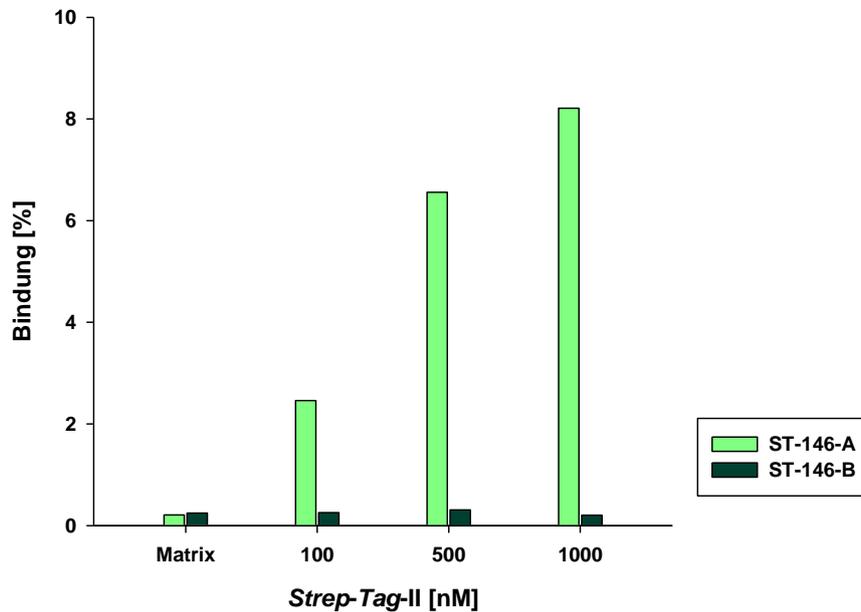
Haarnadel des ST-146-Aptamers als Verkürzung auf eine Bindung an das *Strep-Tag-II*-Peptid untersucht. Bei dieser Verkürzung ST-146-B, die keinen der konservierten Bereiche enthält, wurde im Gegensatz zu der Verkürzung ST-146-A keine Bindung erwartet.



Verkürzung	Länge	Sequenz
ST-146-A	43 nt	5' -GTACCTCC <span style="background-color: #90EE90;">GGAGGA</span> TTCT <span style="background-color: #90EE90;">GGTCGGT</span> GTTTGGGGCAGGAGGTAC -3'
ST-146-B	27 nt	5' -CCAGGCACTGCAGGCATGCAAGCTTGG -3'

**Abbildung IV-11: Verkürzungsexperimente mit dem Aptamer ST-146.** Die Verkürzung ST-146-A wurde aus der größeren der Haarnadelstrukturen des Moleküls ST-146 generiert (oberer Bildabschnitt). Dargestellt sind die beiden Sekundärstrukturvorschlage des verkürzten Moleküls nach der Bestimmung mit dem Programm *Mfold* (198). Die beiden energetisch günstigsten Faltungen des Moleküls sind mit den Werten der Freien Energie  $\Delta G$  angegeben. Der untere Bildabschnitt zeigt die Generierung der zweiten von ST-146 abstammenden Verkürzung, ST-146-B. Hierfür wurde die zweite strukturierte Einheit des Aptamers im 3'-Bereich des Moleküls ausgewählt. Jeweils grün eingefärbt befinden sich in der Sequenz und in der Sekundärstruktur die konservierten Nucleotide der Konsensussequenz der *Strep-Tag-II*-bindenden Aptamere laut Abbildung IV-6.

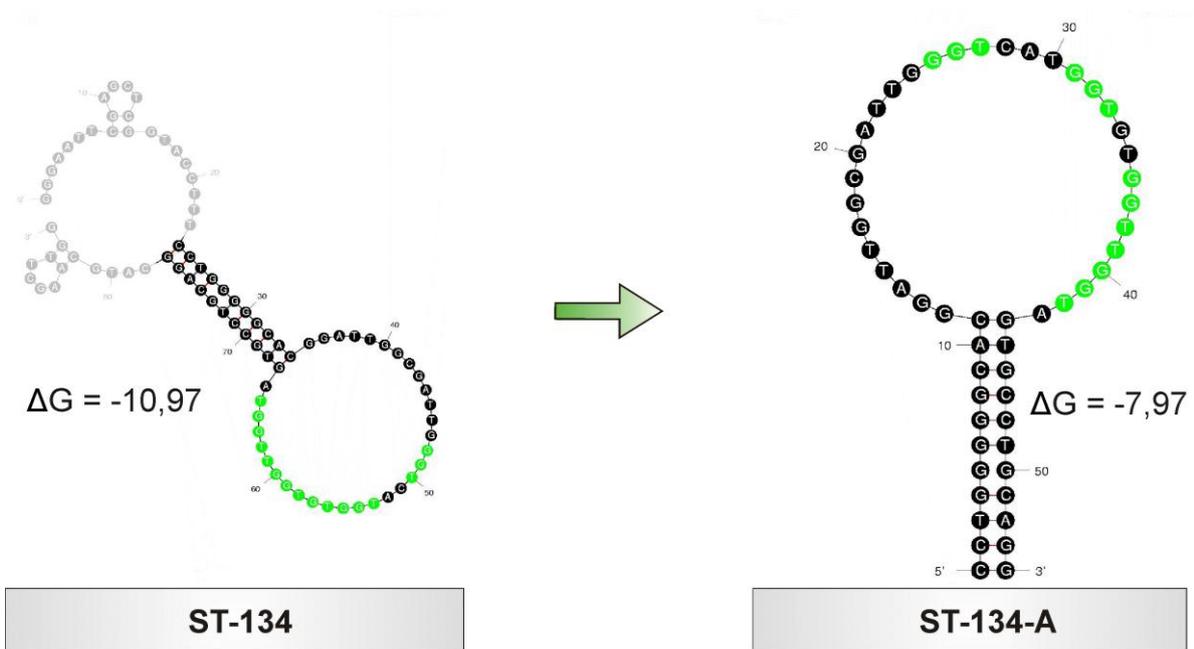
Beide verkürzten Versionen des ST-146 wurden zunächst radioaktiv markiert und innerhalb des Bindungstests mit magnetischen Partikeln mit verschiedenen Konzentrationen an *Strep-Tag-II*-Peptid inkubiert.



**Abbildung IV-12 Bindung der Verkürzungen ST-146-A und ST-146-B an das Zielmolekül *Strep-Tag-II*.** Die Sequenz und die Sekundärstruktur der Moleküle ST-146-A und ST-146-B sind in Abbildung IV-12 dargestellt. Mit steigenden Konzentrationen an *Strep-Tag-II*-Peptid ist ein Ansteigen der Bindung für ST-146-A erkennbar. Bei keiner der gewählten Konzentrationen konnte dagegen eine Bindung der Verkürzung ST-146-B beobachtet werden.

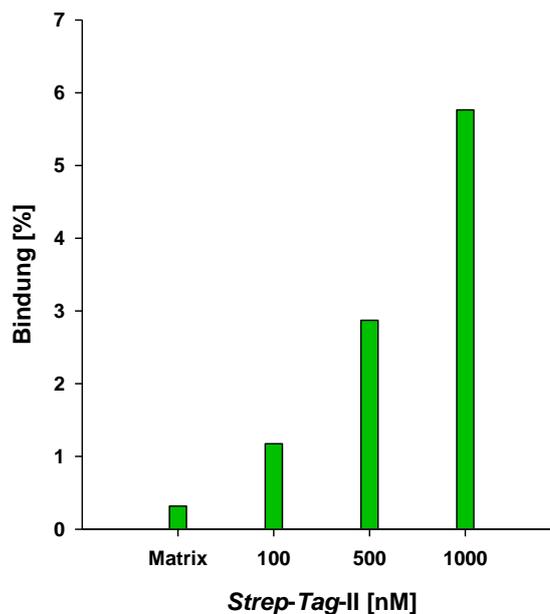
Im Gegensatz zu der Verkürzung ST-146-B bindet die Verkürzung ST-146-A das Zielmolekül *Strep-Tag-II*-Peptid (Abbildung IV-14). Mit steigender Konzentration des Zielmoleküls ist für ST-146-A auch ein deutliches Ansteigen der Bindung an das Peptid erkennbar, währenddessen ST-146-B auch bei sehr hohen Mengen an Zielmolekül keinerlei Bindung erkennen lässt. Dieses Ergebnis bestätigt die Vermutung, dass die konservierten Bereiche der Konsensussequenz, welche in jedem der sieben Aptamere zu finden waren, für eine Bindung an das *Strep-Tag-II*-Peptid essentiell sind.

Ein weiteres Verkürzungsexperiment wurde mit dem Binder ST-134 durchgeführt (Abbildung IV-13). Die Aptamere dieses Typs waren am zweithäufigsten in der angereicherten Bibliothek der siebten Runde vertreten, zudem gehörten sie neben ST-146 zu den besten Bindern im Bindungstest der Klone. Für die Verkürzung ST-134-A wurden am 5'-Ende der Sequenz des Originalmoleküls ST-134 23 Nukleotide und am 3'-Ende 13 Nukleotide entfernt. Die so entstandene Haarnadel enthält ebenfalls die konservierten Nukleotide der Konsensussequenz und sollte das *Strep-Tag-II*-Peptid binden.



Ver- kürzung	Länge	Sequenz
ST-134-A	54 nt	5' -CCTGGGGGCACGGATTGGCGATTGGGT CAT GGTGT GGTGGT AGTGCCTGCAGG-3'

**Abbildung IV-13: Verkürzungsexperiment mit dem Aptamer ST-134.** Der große Haarnadelbereich des Aptamers ST-134 wurde als Verkürzung ST-134-A gewählt. Der energetisch günstigste Zustand der Faltung der Verkürzung ist im rechten Bildabschnitt dargestellt. Grün eingefärbt sind sowohl in der Sequenz als auch in den Sekundärstrukturen die konservierten Nukleotide der *Strep-Tag-II*-bindenden Aptamere gemäß Abbildung IV-6.



**Abbildung IV-14: Bindung der Verkürzung ST-134-A an das Zielmolekül *Strep-Tag-II*.** Die Menge an gebundenen ST-134-A-Molekülen steigt mit zunehmender Menge des Zielmoleküls *Strep-Tag-II*-Peptid.

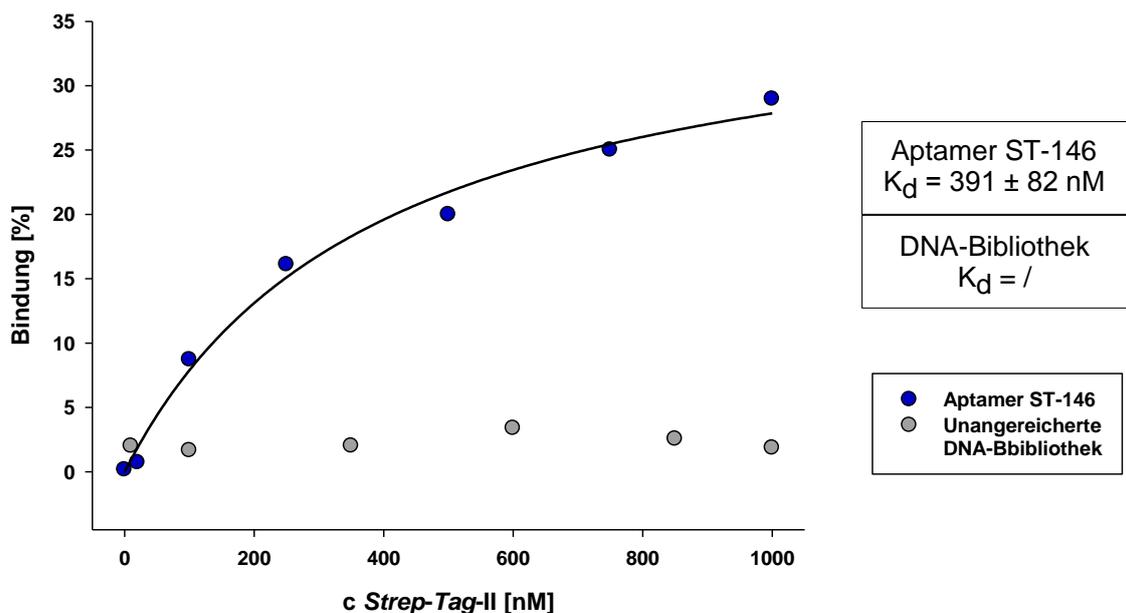
Die Verkürzung ST-134-A bindet wie auch die Verkürzung ST-146-A das *Strep-Tag-II*-Peptid. Bei steigender Menge des Zielmoleküls ist ein deutliches Ansteigen der Bindung sichtbar (Abbildung IV-14). Die Eingrenzung des für die Bindung verantwortlichen Bereiches auf die Schleife der Haarnadeln in den Sekundärstrukturen der Aptamere wurde ein weiteres Mal bestätigt.

## IV.1.7.6 Bindungscharakteristika des Aptamers ST-146

Alle sieben verschiedenen erhaltenen Aptamere sind in der Lage das *Strep-Tag-II*-Peptid affin zu binden. Die besten Resultate wurden jedoch für Aptamere des Typs ST-146 erzielt, in allen vorangegangenen Bindungsstudien erwies sich diese Sequenz als die am stärksten an das *Strep-Tag-II*-Peptid bindende. Zudem war diese Sequenz unter den Aptameren der angereicherten Bibliothek am häufigsten zu finden. Auch für die Verkürzung dieses Moleküls auf 43 Nukleotide konnte eine affine Bindung festgestellt werden. Daher wurde für alle weiteren Experimente das *Strep-Tag-II*-bindende Aptamer ST-146 ausgewählt.

### IV.1.7.6.1 Bestimmung der Dissoziationskonstante des Aptamers ST-146

Zunächst wurde die Dissoziationskonstante  $K_d$  für ST-146 bestimmt. Der Wert der Dissoziationskonstanten, welche aus dem Massenwirkungsgesetz abgeleitet wird, gibt Aufschluss über die Stärke der Bindung an das Zielmolekül. Je niedriger der  $K_d$ -Wert einer Bindung ist, desto stärker ist diese Bindung einzuschätzen.

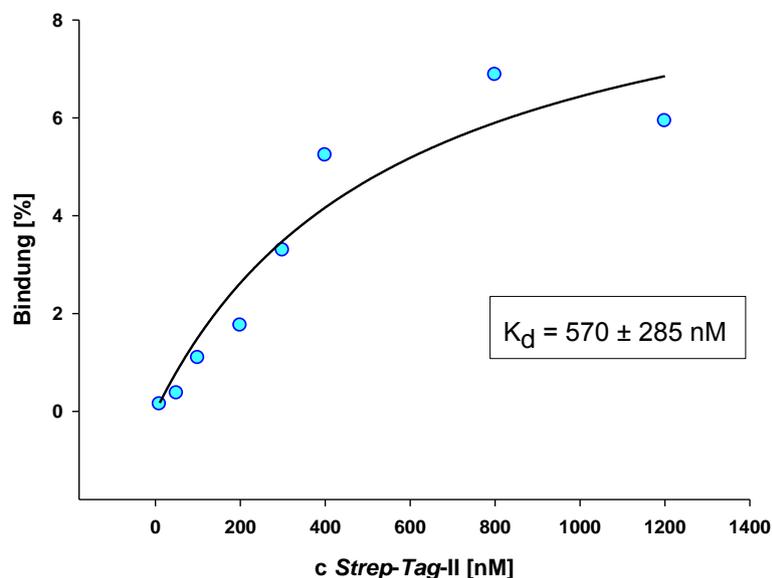


**Abbildung IV-15: Bestimmung der Dissoziationskonstante  $K_d$  des Aptamers ST-146.** Aptamere des Typs ST-146 binden den *Strep-Tag-II* affin mit einem  $K_d$ -Wert von 391 nM. Neben dem Aptamer wurde die unangereicherte DNA-Bibliothek als Kontrolle eingesetzt.

Die Bestimmung der Konstanten erfolgte mittels des Bindungstests mit magnetischen Partikeln. Die markierte DNA wurde konstant bei einer Konzentration von 50 nM eingesetzt und mit steigenden Mengen an *Strep-Tag-II*-Peptid frei in Lösung inkubiert. Der Aptamer-Peptid-Komplex wurde anschließend aus der Lösung separiert und die Menge an gebundener DNA in Abhängigkeit von der Konzentration des Zielmoleküls *Strep-Tag-II* mit dem Program *SigmaPlot* grafisch dargestellt (Abbildung IV-15). Die Anpassung der Kurve erfolgte unter der Annahme eines 1:1-Bindungsprozesses.

Mit steigender Menge an eingesetztem *Strep-Tag-II*-Peptid steigt auch die Menge an gebundenem Aptamer ST-146. Im ersten Bereich der hyperbolischen Bindungskurve steigt die Bindung zunächst steil an, um dann in einen Bereich der Sättigung überzugehen. Der Verlauf der Kurve entspricht damit dem einer klassischen Dosis-Wirkungs-Kurve. Der  $K_d$ -Wert entspricht dem Punkt der Kurve, an dem die halbmaximale Sättigung erreicht wird.

Für das Aptamer ST-146 konnte eine Dissoziationskonstante im nanomolaren Bereich ( $391 \pm 82$  nM) ermittelt werden. Im Vergleich dazu konnte unter den eingesetzten Bedingungen für die unangereicherte Bibliothek bei allen eingesetzten Konzentrationen des *Strep-Tag-II* keine Bindung detektiert werden. Eine Bindungskonstante kann daher für die DNA-Bibliothek nicht angegeben werden. Auch die Dissoziationskonstante der verkürzten Version, ST-146-A, wurde bestimmt (Abbildung IV-16).



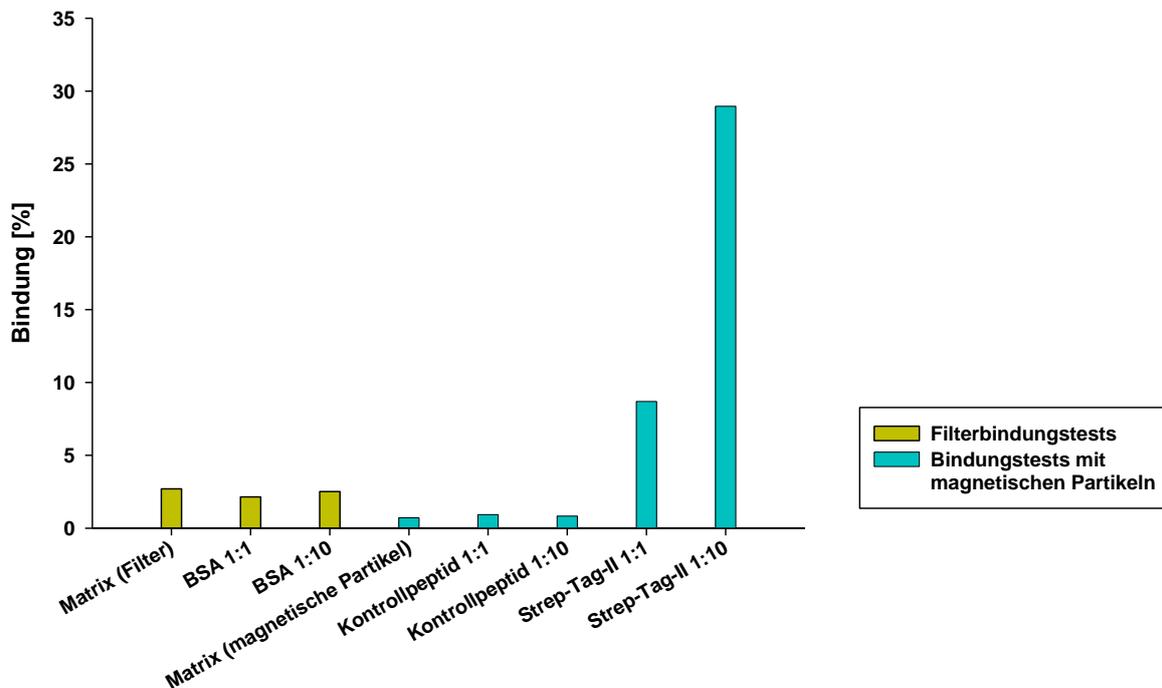
**Abbildung IV-16: Bestimmung der Dissoziationskonstante für die verkürzte Version ST-146-A.**

Die verkürzte Version bindet das *Strep-Tag-II*-Peptid mit einer Bindungskonstante von  $K_d = 570 \pm 285$  nM. Unter Einbeziehung der Fehlerintervalle kann somit die Aussage getroffen werden, dass die verkürzte Version ST-146-A und das Vollängenapptamer ST-146 mit

Bindungskonstanten in derselben Größenordnung im nanomolaren Bereich das *Strep-Tag-II*-Peptid binden.

## IV.1.7.6.2 Bindungsspezifität des Aptamers ST-146

Nach der Feststellung der Affinität des Aptamers ST-146 für das Zielmolekül *Strep-Tag-II*-Peptid wurde die Spezifität des Aptamers überprüft. Hierzu wurden Bindungstests mit magnetischen Partikeln durchgeführt, um die Bindung des Aptamers ST-146 an ein Kontrollpeptid und, im Vergleich dazu, an das *Strep-Tag-II*-Peptid zu untersuchen. Des Weiteren wurde die Bindung von ST-146 an BSA (*Bovine Serum Albumin*), ein Protein aus dem Serum von Rindern, untersucht. Hierzu wurden Filterbindungstests durchgeführt, um den Komplex aus Protein und gebundenem Aptamer zurückzuhalten und quantifizieren zu können.



**Abbildung IV-17: Spezifität der *Strep-Tag-II*-Bindung von ST-146.** Das Aptamer ST-146 bindet hochspezifisch an das Zielmolekül *Strep-Tag-II*. Die Ergebnisse der ersten drei Balken wurden mittels eines Filterbindungstests ermittelt (gelb). Neben der Bindung an den Filter (Matrix, Balken eins) wurde die Bindung des ST-146 an BSA im molaren Verhältnis 1:1 (Balken zwei) und 1:10 (Balken drei) ermittelt. Die Balken vier bis acht stellen Resultate aus Bindungstests mit magnetischen Partikeln dar (blau). Hierbei wurde neben der Bindung an die Streptavidin-beschichteten Partikel (Matrix, Balken vier) die Bindung des ST-146 an ein Kontrollpeptid im molaren Verhältnis 1:1 (Balken 5) und 1:10 (Balken sechs) ermittelt. Zu einem Vergleich wurde die Bindung von ST-146 an das *Strep-Tag-II*-Peptid in denselben Verhältnissen (Balken sieben und acht) gegenübergestellt. Als Kontrollpeptid diente das Spiegel-*Tag*-Peptid (Abschnitt IV.1.3).

Die Bindung des ST-146 an das D-*Strep-Tag-II*-Peptid ist nicht nur als sehr affin, sondern auch als hochspezifisch einzustufen (Abbildung IV-17). Es konnte keinerlei Bindung des

Aptamers an das Kontrollpeptid Spiegel-Tag ermittelt werden. Auch bei einem 10-fachen molaren Überschuss dieses Peptides ist keine von der Bindung an die Matrix abweichende Bindung erkennbar. Neben der Bindung an ein anderes Peptid wurde die Bindung an das Protein BSA untersucht. Auch hier konnte keinerlei Bindung abweichend von der Bindung des ST-146 an die Matrix detektiert werden, selbst bei einem zehnfachen Überschuss des BSA.

### IV.1.7.6.3 Einfluss von Pufferbedingungen auf die Bindung durch ST-146

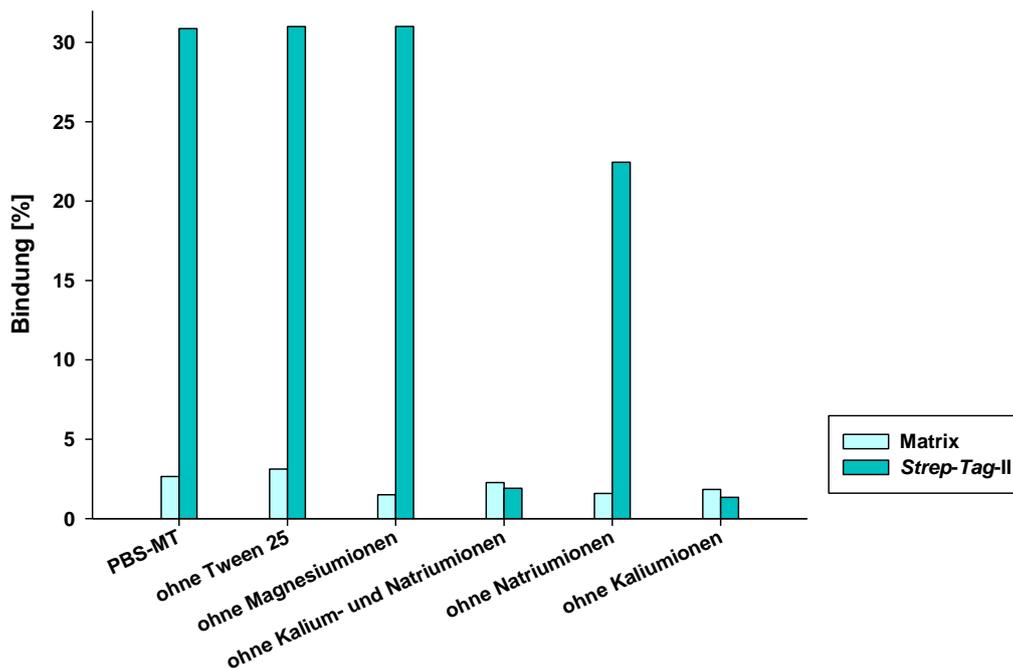
Der für die Selektion und die Bindungstests eingesetzte Bindungspuffer PBS-MT besteht aus einem Phosphatpuffersystem aus Natriumphosphat und Kaliumphosphat. Zudem enthält er 137 mM Natriumchlorid und 2,7 mM Kaliumchlorid. Divalente Kationen wurden mit 1 mM Magnesiumchlorid zugefügt und für eine bessere Handhabung der magnetischen Partikel zusätzlich 0,05 % des Detergenz Tween 20.

Die Bindung des Aptamers ST-146 an das Zielmolekül *Strep-Tag-II*-Peptid wurde auf eine Abhängigkeit von verschiedenen Inhaltsstoffen des Puffersystems, wie Kationen und des Detergenz Tween 20 untersucht. Hierzu wurden jeweils 0,1  $\mu\text{M}$  ST-146 im molaren Verhältnis 1:2 mit dem *Strep-Tag-II*-Peptid inkubiert und die Bindung bei verschiedenen Pufferbedingungen mittels des Bindungstests mit magnetischen Partikeln analysiert. Durch eine Kombination der Komponenten des Puffers konnte jeweils einer der Inhaltsstoffe eliminiert werden und die prozentuale Bindung ohne diesen der Bindung im normalen Puffersystem PBS-MT gegenübergestellt werden (Abbildung IV-18).

Die Bindung des Aptamers ST-146 an das *Strep-Tag-II*-Peptid ist stark von monovalenten Kationen, hierbei vor allem von Kaliumionen, abhängig. Werden die Kaliumionen dem Puffersystem entzogen, kann keinerlei Bindung festgestellt werden. Die Subtraktion von Natriumionen dagegen führt nur zu einer Reduktion der Bindung um etwa 25 %.

Divalente Magnesiumionen haben keinerlei Einfluss auf die Bindung des Aptamers an den *Strep-Tag-II*. Werden dem Puffer Magnesiumionen entzogen kann kein Unterschied zu dem Ansatz mit Magnesiumionen festgestellt werden. Auch Tween 20 ist nicht in die Bindung des Aptamers an sein Zielmolekül involviert. Bei demjenigen Ansatz ohne Detergenz konnte keinerlei Reduktion der Bindung detektiert werden.

Die starke Kaliumionenabhängigkeit der Bindung des Aptamers ST-146 an sein Zielmolekül ist ein starkes Indiz für das tatsächliche Vorhandensein von G-Quadruplex-Motiven innerhalb des Aptamers, da gezeigt wurde, dass diese Formationen insbesondere von Kaliumionen stabilisiert werden. Natriumionen dagegen haben ebenfalls einen G-Quadruplex-stabilisierenden Einfluss, allerdings ist dieser sehr viel geringer, was konsistent ist mit den Ergebnissen zur Abhängigkeit der Bindung des Aptamers von den Pufferbedingungen.

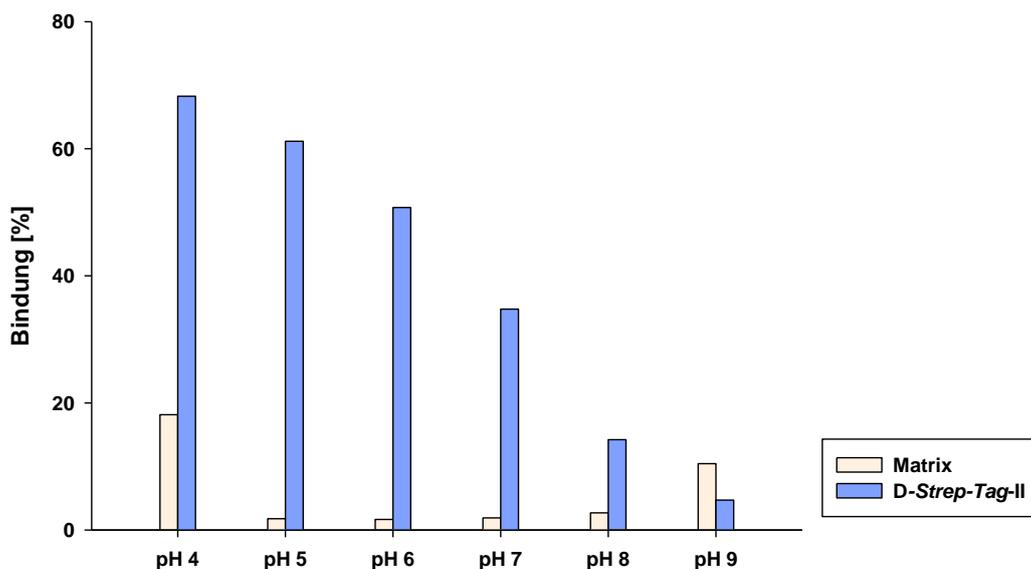


**Abbildung IV-18: Einfluss von mono- und divalenten Kationen und Tween 20 auf die Bindung des Aptamers ST-146 an das *Strep-Tag-II*-Peptid.** Balken eins entspricht den während der Selektion verwendeten Pufferbedingungen im Puffer PBS-MT, hier waren alle Pufferkomponenten enthalten. Die Bindung des Aptamers an das Zielmolekül ist vor allem kaliumionenabhängig. Ohne Kaliumionen in dem Puffersystem (Balken vier und sechs) konnte keine Bindung festgestellt werden. Die Eliminierung von Natriumionen dagegen führte nur zu einer leichten Reduktion der Bindung (Balken fünf). Magnesiumionen und Tween 20 haben keinen Einfluss auf die Bindung des Aptamers (Balken zwei und drei), hier konnte keine Reduktion der Bindung im Vergleich zum Puffer PBS-MT festgestellt werden. Als Matrix wurden Streptavidin-beschichtete magnetische Partikel verwendet. Da der verwendete PBS-Puffer aus Kalium- und Natriumphosphaten hergestellt wurde, wurde für die Ansätze ohne Kalium- und Natriumionen auf ein Tris-Puffersystem zurückgegriffen, welches bezüglich aller anderen Komponenten und des pH-Wertes dem PBS-Puffer entsprach.

Die Abhängigkeit der ST-146-Bindung von Kaliumionen kann auch für eine gezielte Elution des Moleküls von dem *Strep-Tag-II* eingesetzt werden. Bei einem Entzug der Kaliumionen aus dem Puffer sinkt die Bindungsfähigkeit von ST-146, womit eine Elution des ST-146 ermöglicht wird.

#### IV.1.7.6.4 Abhängigkeit der Bindung des ST-146 vom pH-Wert

Die Abhängigkeit der Bindung des Aptamers ST-146 vom pH-Wert des Puffersystems wurde mittels Bindungstests mit magnetischen Partikeln bestimmt. Hierzu wurden 0,1  $\mu\text{M}$  Aptamer und 0,2  $\mu\text{M}$  Peptid im Verhältnis 1:2 eingesetzt. Das Puffersystem entsprach dem für die Selektion verwendeten PBS-MT-Puffer, bei dem der jeweilige pH-Wert eingestellt wurde.



**Abbildung IV-19: pH-Wert-Abhängigkeit der Bindung des ST-146 an das *Strep-Tag-II*-Peptid.** Die Bindung des Aptamers ST-146 an das Zielmolekül *Strep-Tag-II* ist stark vom pH-Wert abhängig, wobei die Bindung bei Verschiebungen in den sauren Bereich ansteigt. Als Matrix wurden Streptavidin-beschichtete magnetische Partikel verwendet.

Die Bindung des Aptamers ST-146 an das *Strep-Tag-II*-Peptid ist stark pH-Wert-abhängig (Abbildung IV-19). Bei sinkendem pH-Wert kann ein deutlicher Anstieg des Bindungssignals festgestellt werden. Die Bindung bei pH 7,4, was dem bei der Selektion verwendeten pH-Wert entspricht, liegt bei etwa 25 %. Bei einer Senkung des pH-Wertes auf sechs liegt die Bindung bereits bei etwa 50 %. Wird der pH-Wert um einen weiteren Punkt auf fünf gesenkt ist nochmals ein Ansteigen der Bindung um 10 % auf etwa 60 % zu vermerken. Die höchste Bindung innerhalb des Testbereiches wird bei pH 4 erreicht, wobei dies auch mit einem deutlichen Ansteigen der Bindung an die Matrix einhergeht.

Bei einer Verschiebung des pH-Wertes in den alkalischen Bereich auf Werte größer pH 7,4 wird eine Abnahme der Bindung festgestellt. Bei pH 9 ist die Bindung an die Matrix höher als die Bindung des Aptamers an den *Strep-Tag-II*.

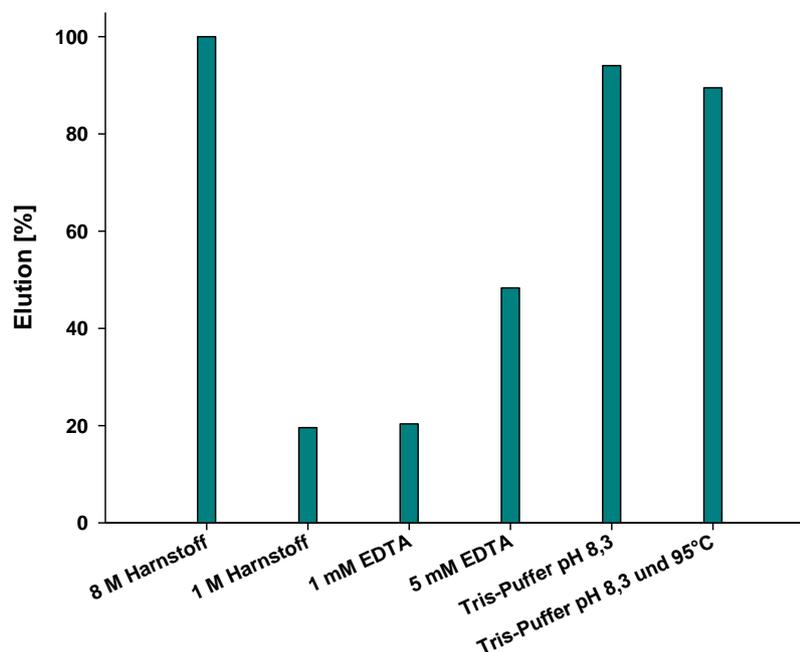
Die starke pH-Wert-Abhängigkeit der ST-146-Bindung ist im Besonderen für eine praktische Anwendung des Systems interessant. Die Bindung kann durch niedrige pH-Werte erhöht werden, während eine Dissoziation des ST-146 durch eine pH-Wert-Verschiebung in den leicht alkalischen Bereich erreicht werden kann.

#### IV.1.7.6.5 Elutionsbedingungen

Um Aussagen über eine gerichtete Dissoziation des ST-146 von dem *Strep-Tag-II*-Affinitätspeptid treffen zu können wurden verschiedene Elutionsbedingungen getestet. Hierzu wurden Streptavidin-beschichtete magnetische Partikel mit Peptid und daran gebundendem Aptamer gemäß des Bindungstests mit magnetischen Partikeln beladen. Die

beladenen Partikel wurden anschließend mit verschiedenen Reagenzien versetzt und die Dissoziation des ST-146 analysiert, indem das freigesetzte Aptamer im Überstand der Partikel vermessen wurde.

Verschiedene Reagenzien wurden auf eine Eignung zur Elution des ST-146 von dem *Strep-Tag-II*-Peptid untersucht (Abbildung IV-20). 8 M konzentrierter Harnstoff wird als Standard zur Elution von Nukleinsäuren eingesetzt, da er die Sekundärstrukturen der Moleküle auflöst. Mittels einer 8 M Harnstofflösung konnte die gesamte Menge an gebundenem Aptamer ST-146 von dem Peptid abgelöst werden, daher wurden die anderen Werte diesem gegenübergestellt.



**Abbildung IV-20: Elution von ST-146 von dem *Strep-Tag-II*-Peptid mittels verschiedener Reagenzien.** Neben Harnstoff wurde das chelatisierende Reagenz EDTA verwendet. Des Weiteren wurde ein leicht alkalischer Tris-Puffer, auch mit zusätzlicher Hitzedenaturierung bei 95°C, eingesetzt. Die Elution des ST-146 mit 8 M Harnstoff wurde als 100 %-Wert der Elution festgelegt.

Wird an Stelle einer 8 M Harnstofflösung nur eine 1 M Lösung verwendet, werden nur 20 % des Aptamers eluiert. Diese Konzentration eignet sich demnach nicht für eine vollständige Dissoziation.

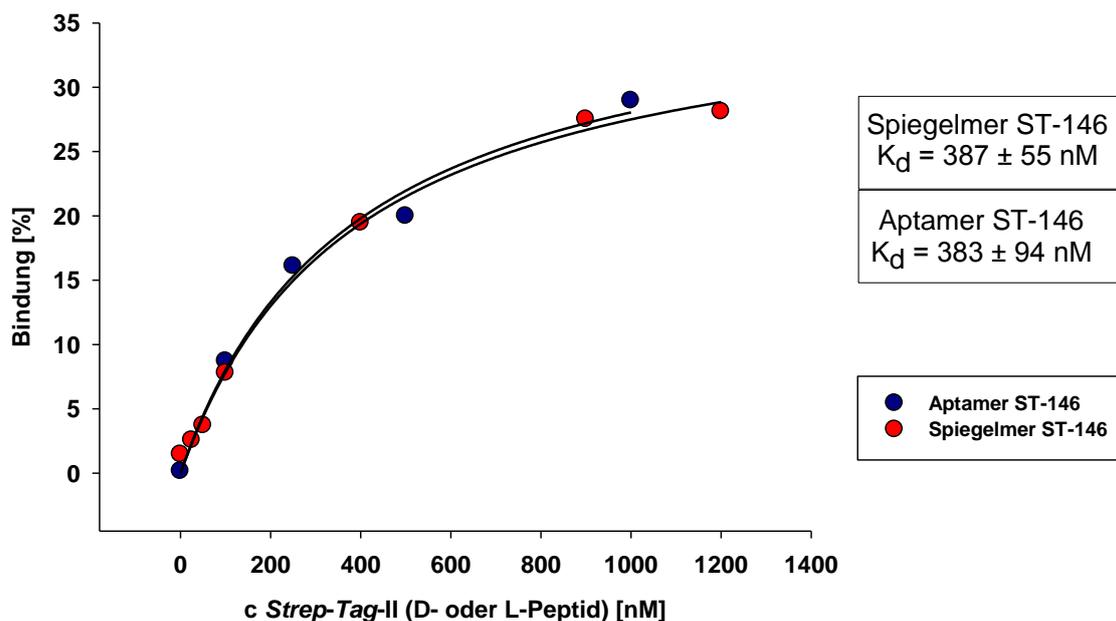
Eine 1 mM-Lösung und eine 5 mM EDTA-Lösung erzielen nur eine Elution von 20 % beziehungsweise 50 %. Da EDTA aber vor allem divalente Kationen chelatisiert, und bereits gezeigt wurde, dass die Bindung des ST-146 nicht magnesiumionenabhängig ist (Abschnitt IV.1.7.6.3) ist dieses Ergebnis im Einklang mit den vorhergehenden Untersuchungen.

Neben dem Einsatz einer 8 M Harnstofflösung ist ein leicht alkalischer Tris-Puffer mit pH = 8,3 ein geeignetes Elutionsmittel. 95 % des Aptamers ST-146 konnte unter diesen Bedingungen von dem *Strep-Tag-II*-Peptid gelöst werden. Hierbei ist kein Unterschied

zwischen dem Einsatz dieses Puffers bei 23°C oder einer zusätzlichen Denaturierung der DNA durch eine Erhöhung der Temperatur auf 95°C ersichtlich. Zusammenfassend ist festzustellen, dass mit einem Tris-Puffer, pH 8,3 und Raumtemperatur eine Elution unter milden Bedingungen möglich ist.

#### IV.1.7.7 Bestimmung der Bindungskonstante des Spiegelmers ST-146

Nachdem sowohl die Affinität, die Spezifität und verschiedene Charakteristika der Bindung des Aptamers ST-146 an das gespiegelte *Strep-Tag-II*-Peptid in der D-Konformation gezeigt worden waren, wurde die Bindung des korrespondierenden Spiegelmers ST-146 an das ungespiegelte *Strep-Tag-II*-Peptid in der L-Konformation ermittelt. Sowohl das Spiegelmer als auch das Peptid entsprachen bezüglich Sequenz und Aufbau ihren gespiegelten Gegenstücken, nur die Monomere beider Moleküle lagen in der jeweils gespiegelten Form vor - das Spiegelmer bestehend aus den für DNA unnatürlichen D-Nukleotiden und das L-*Strep-Tag-II*-Peptid aus den natürlich vorkommenden L-Aminosäuren.



**Abbildung IV-21: Bestimmung der Dissoziationskonstante  $K_d$  des Spiegelmers ST-146.** Dargestellt ist sowohl die Bindungskurve für das Spiegelmer, als auch für das Aptamer ST-146 unter Angabe des jeweils ermittelten  $K_d$ -Wertes. Beide Enantiomere zeigen das gleiche Bindungsverhalten bezüglich ihres jeweiligen Zielpeptides. Für beide Enantiomere konnte ein nahezu identischer  $K_d$ -Wert ermittelt werden.

Für die Bestimmung der Dissoziationskonstante wurde das Spiegelmer ST-146 am 5'-Ende radioaktiv markiert, allerdings lagen hier die absoluten Ausbeuten an markiertem Molekül zwei- bis fünffach unter denen für das entsprechende Aptamer ST-146, da die Kinase das Spiegelmer weniger effizient phosphoryliert.

Für die Bestimmung der Dissoziationskonstanten des Spiegelmers ST-146 mit dem L-*Strep-Tag-II*-Peptid entsprach die Vorgehensweise derjenigen zur Bestimmung der Konstanten für das Aptamer. Mittels des Bindungstests mit magnetischen Partikeln wurden bei konstanter Menge an markiertem Spiegelmer steigende Konzentrationen an L-*Strep-Tag-II*-Peptid eingesetzt. Die Menge an gebundenem Spiegelmer wurde in Abhängigkeit von der Peptidkonzentration aufgetragen (Abbildung IV-21).

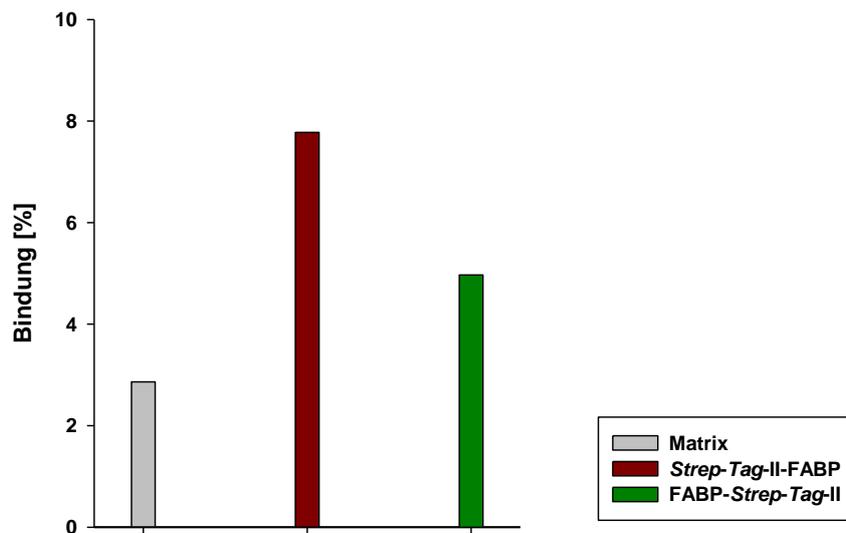
Die Dissoziationskonstante  $K_d$  für das Spiegelmer ST-146 beträgt  $387 \pm 55$  nM, die affine Bindung des *Strep-Tag-II* konnte somit auch für die gespiegelte Nukleinsäure gezeigt werden. Zur Verdeutlichung der Übereinstimmung der Bindung zwischen Spiegelmer und L-Peptid, sowie Aptamer und D-Peptid wurden die Bindungskurven beider Enantiomere in dem Diagramm gegenübergestellt. Sowohl der Anstieg als auch der Sättigungsbereich beider Hyperbeln sind identisch. Es konnte kein Unterschied zwischen beiden Dissoziationskonstanten festgestellt werden, beide Enantiomere binden ihr Zielmolekül in gleicher Weise.

#### IV.1.7.8 Bindung von *Strep-Tag-II*-Fusionsproteinen durch Spiegelmer ST-146

Der Beweis für die Aktivität des Spiegelmers ST-146 als Binder von *Strep-Tag-II*-Fusionsproteinen ist die Erkennung eines solchen Fusionsproteins durch das Spiegelmer. Als Fusionsprotein wurde das Fettsäure-bindende Protein (*Fatty Acid Binding Protein*, FABP) gewählt. Das 15 kDa große cytosolische Protein ist *in vivo* an der Resorption von langkettigen Fettsäuren beteiligt und wird *in vitro* standardisiert als Proteinmodellsystem verwendet (155).

Zunächst sollte die Bindung des an FABP fusionierten *Strep-Tag-II* gezeigt werden. Um zusätzlich eine Aussage darüber treffen zu können, ob sich Spiegelmer ST-146 sowohl zur N-terminalen, als auch zur C-terminalen Erkennung des *Strep-Tag-II*-Fusionsproteins eignet, wurden beide Fusionsproteine zunächst rekombinant exprimiert. Hierzu wurden zwei Plasmide, einmal kodierend für FABP mit N-terminal fusioniertem *Strep-Tag-II* (*Strep-Tag-II*-FABP) und einmal kodierend für FABP mit C-terminal fusioniertem *Strep-Tag-II* (FABP-*Strep-Tag-II*) in *E.coli* transformiert. Die Fusionsproteine wurden in den Zellen überexprimiert, anschließend fand ein Zellaufbruch gefolgt von einer Aufreinigung mittels *Strep-Tactin*-beschichteter Partikel statt. Durch diese Affinitätsaufreinigung, die auf der Interaktion zwischen dem *Strep-Tag-II* und der *Strep-Tactin*-Matrix beruht, konnte gleichzeitig indirekt das Vorhandensein des *Strep-Tag-II* nachgewiesen werden.

Die gereinigten Fusionsproteine *Strep-Tag-II*-FABP und FABP-*Strep-Tag-II* wurden mittels Filterbindungstests auf eine Bindung durch das Spiegelmer ST-146 untersucht. Hierbei wurde der Puffer PBS-M, pH 7,4 eingesetzt.



**Abbildung IV-22: N- und C-terminale Bindung des *Strep-Tag-II* durch das Spiegelmer ST-146.** Spiegelmer ST-146 bindet sowohl das N-terminal-, als auch das C-terminal fusionierte *Strep-Tag-II*-Affinitätspeptid. Als Fusionsprotein wurde jeweils FABP verwendet. Das markierte Spiegelmer wurde in einem molaren Verhältnis von 1:10 mit den Fusionsproteinen inkubiert und anschließend der an das Protein gebundene Anteil des Spiegelmers bestimmt. Durch eine Bindung des an den Filter gebundenen Proteins werden auch Nukleinsäuren, welche ohne Protein kaum an den Filter (Matrix) binden, auf dem Filter zurückgehalten und können somit quantitativ bestimmt werden.

Der *Strep-Tag-II* wird sowohl N- als auch C-terminal fusioniert durch das Spiegelmer ST-146 gebunden (Abbildung IV-22). Die Bindung des Affinitätspeptides fusioniert an den N-Terminus des FABP liegt hierbei mit circa 8 % etwa 2,5-fach höher als die unspezifische Bindung an den Filter. Die Bindung von an den C-Terminus des Proteins fusioniertem *Strep-Tag-II*-Peptid liegt mit etwa 5 % zweifach über der Hintergrundbindung.

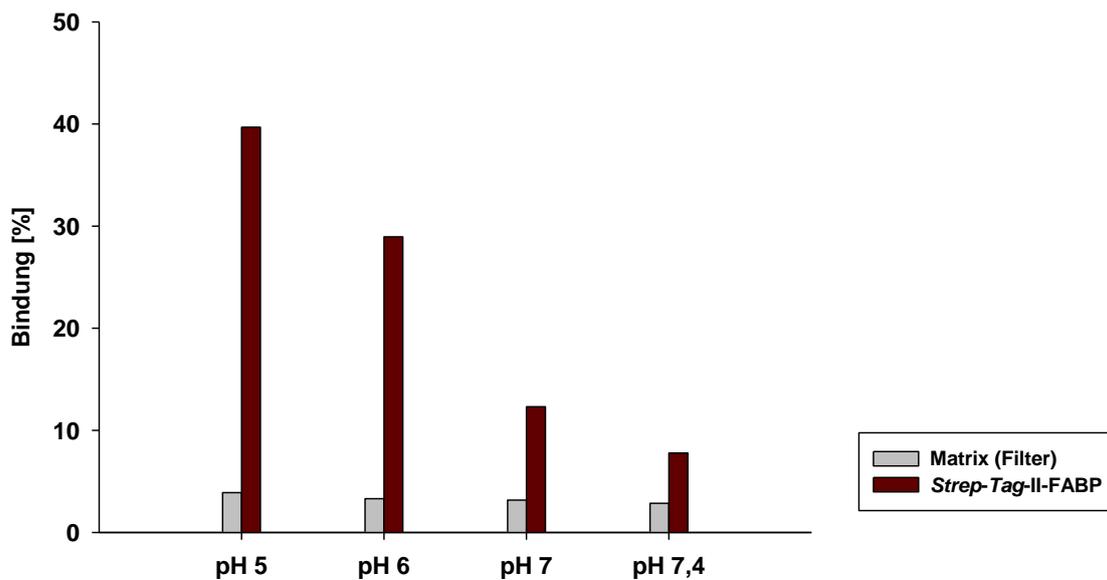
Für beide Fusionsproteine konnte eine Bindung des Spiegelmers an den fusionierten *Strep-Tag-II* festgestellt werden. Es kann somit die Aussage getroffen werden, dass ST-146 den *Strep-Tag-II* bindet, auch wenn kein freier N- oder C-Terminus des Peptides vorhanden ist.

Der Grund für die Differenz zwischen dem Anteil an gebundendem Spiegelmer bei N- oder C-terminal fusioniertem *Strep-Tag-II* kann hierbei nicht zweifelsfrei angegeben werden. Es kann keine allgemeingültige Aussage darüber getroffen werden, ob das Spiegelmer den C-terminal-fusionierten *Strep-Tag-II* *per se* schlechter bindet, oder ob in diesem Falle eine niedrigere Bindung ermittelt wurde, da der C-Terminus des FABP schlechter zugänglich war. In diesem Falle wäre die Verminderung der Bindung durch eine sterische Hinderung des Spiegelmers ausgelöst worden. Die Bindung des *Strep-Tag-II* durch das Spiegelmer ST-146, sowohl N- als auch C-terminal fusioniert, kann jedoch zweifelsfrei belegt werden.

## IV.1.7.8.1 pH-Wert-Abhängigkeit der *Strep-Tag-II*-Fusionsprotein-Bindung

Für die Bindung des Aptamers ST-146 an das D-*Strep-Tag-II*-Affinitätspeptid war eine starke pH-Wert-Abhängigkeit ermittelt worden (Abschnitt IV.1.7.6.4). Um diese Abhängigkeit auch für die Bindung von Fusionsproteinen mit *Strep-Tag-II* durch das Spiegelmer ST-146 zu zeigen, wurden Filterbindungstests bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt.

Die pH-Wert-Abhängigkeit der ST-146-Bindung des ungespiegelten *Strep-Tag-II* fusioniert an FABP besteht gleichermaßen für das Aptamer wie für das korrespondierende Spiegelmer (Abbildung IV-23). Mit sinkendem pH-Wert steigt die Bindung an den *Strep-Tag-II*. Werden bei pH 7,4 nur 8 % gebunden, steigt die Bindung bei einer Senkung des pH-Wertes um 0,4 Punkte auf pH 7 bereits auf 12 %. Bei einem pH-Wert von 6 werden 28 % des Spiegelmers gebunden, was einer 3,5-fachen Bindung im Vergleich zu derjenigen bei pH 7,4 entspricht. Eine weitere Senkung des pH-Wertes auf 5 ergibt eine Bindung von 40 % des eingesetzten Spiegelmers.



**Abbildung IV-23: pH-Wert-Abhängigkeit der *Strep-Tag-II*-FABP-Bindung des Spiegelmers ST-146.** Die Bindung des N-terminal fusionierten *Strep-Tag-II* durch das Spiegelmer ST-146 ist stark pH-Wert-Abhängig. Der Anteil an gebundenem Fusionsprotein steigt mit sinkendem pH-Wert. Die Werte wurden mittels Filterbindungstests ermittelt. Neben der Bindung des Spiegelmers an das *Strep-Tag-II*-Protein wurde die Bindung an die Matrix, den Filter, untersucht. Die Konzentration des Spiegelmers ST-146 betrug 0,1  $\mu$ M, die des *Strep-Tag-II*-FABP-Fusionsproteins 1  $\mu$ M.

## IV.1.7.8.2 Bestimmung der Bindungskonstante des Spiegelmers ST-146 gegen das *Strep-Tag-II*-Fusionsprotein

Sowohl für die Bindung des Aptamers ST-146 an das D-*Strep-Tag-II*-Peptid (Abschnitt IV.1.7.6.4), als auch für die Bindung des Spiegelmers ST-146 an das Fusionsprotein *Strep-Tag-II*-FABP (Abschnitt IV.1.7.8.1) wurde eine starke Abhängigkeit vom pH-Wert ermittelt. Daher wurde die apparente Dissoziationskonstante  $K_d$  der Bindung des Spiegelmers an das Fusionsprotein *Strep-Tag-II*-FABP nicht nur für pH 7 (Abbildung IV-24 C) ermittelt, sondern auch für die pH-Werte 5 (Abbildung IV-24 A) und 6 (Abbildung IV-24 B).

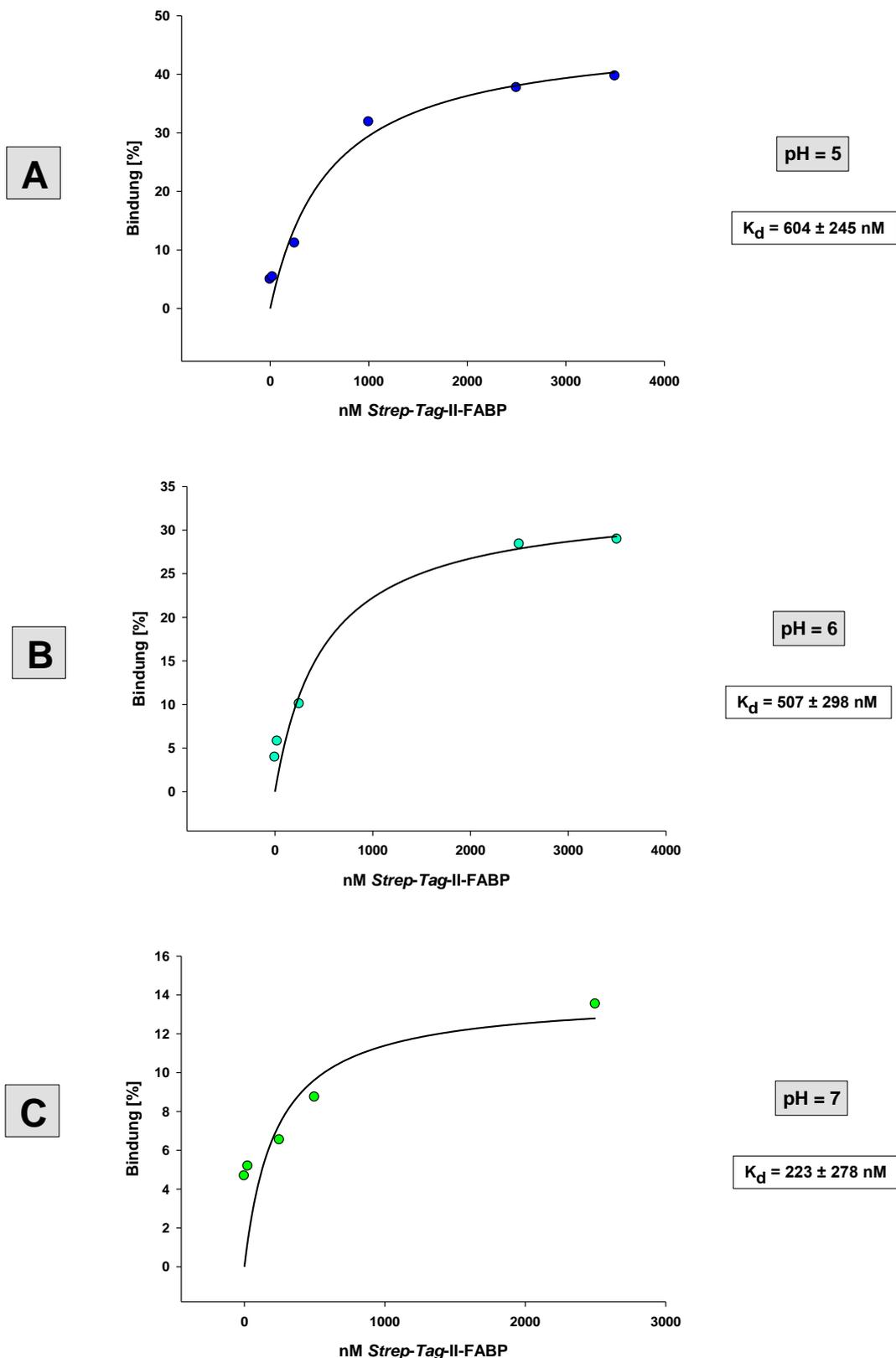
Hierbei wurde das PBS-M-Puffersystem mit dem jeweils angegebenen pH-Wert verwendet. Die Nukleinsäure hatte eine konstante Konzentration von 100 nM und wurde mit steigenden Mengen an *Strep-Tag-II*-FABP versetzt. Die ermittelten Werte der apparenten Dissoziationskonstante der *Strep-Tag-II*-Fusionsprotein-Bindung und des maximalen Anteils an gebundenem Spiegelmer sind in Tabelle IV-5 zusammengefasst.

**Tabelle IV-5: Bestimmung der Bindungskonstante von Spiegelmer ST-146 gegen N-terminales *Strep-Tag-II*-Fusionsprotein.** Angegeben ist neben dem jeweils verwendeten pH-Wert die Bindungskonstante  $K_d$  und der jeweilige Anteil an maximal gebundenem Spiegelmer ST-146. Die Werte fassen die Resultate der Abbildung IV-24 zusammen.

	pH	$K_d$ [nM]	Maximalbindung [%]
<b>A</b>	5	604 ± 245	47,3
<b>B</b>	6	507 ± 298	33,5
<b>C</b>	7	223 ± 278	13,9

Eine affine Bindung des *Strep-Tag-II* fusioniert an FABP fand bei jedem der eingesetzten pH-Werte statt. Die Bindungskonstanten der Bindung liegen bei allen drei pH-Werten im nanomolaren Bereich von 223 - 604 nM (Tabelle IV-5). Darüber hinaus ähneln alle drei Bindungskonstanten denjenigen, welche für die Bindung des Spiegelmers an das L-Peptid *Strep-Tag-II* (Abschnitt IV.1.7.7) und für das Aptamer an das D-Peptid (Abschnitt IV.1.7.6.1) ermittelt wurden. Die Bindungsfähigkeit und -stärke der *Step-Tag-II*-Bindung durch das Spiegelmer ST-146 wird dem zufolge nicht eingeschränkt durch die Fusion des *Strep-Tag-II* an ein Protein.

Die Menge an maximal gebundenem Spiegelmer ist bei den drei pH-Werten unterschiedlich. Während bei einem physiologischen pH-Wert von 7,0 nur 14 % des *Strep-Tag-II* maximal gebunden werden, liegt dieser Wert bei pH 6 mit 33,5 % sehr viel höher. Bei einem pH-Wert von 5 beträgt die Maximalbindung nahezu 50 %.



**Abbildung IV-24: Bestimmung der apparenten Dissoziationskonstante für die Bindung des Spiegelmers ST-146 an den N-terminal an FABP fusionierten *Strep-Tag-II* bei verschiedenen pH-Werten.** Die Bestimmung der Konstanten erfolgte mittels Filterbindungstests bei den angegebenen pH-Werten. Die Werte für die Dissoziationskonstante  $K_d$  und die Maximalbindung sind in Tabelle IV-5 zusammengefasst. Die Konzentration an Spiegelmer ST-146 betrug konstant 100 nM und wurde mit steigenden Mengen an *Strep-Tag-II*-FABP versetzt.

## IV.1.7.8.1 Spezifität der Bindung von *Strep-Tag-II*-Fusionsproteinen

Nachdem gezeigt wurde, dass die Spiegelmer-Bindung an das *Strep-Tag-II*-Fusionsprotein sehr affin ist und keine Reduktion der Bindung des Zielmoleküls durch die Fusion an ein Protein festzustellen ist, wurde die Spezifität der Bindung ermittelt. Für das Aptamer ST-146 konnte die hohe Spezifität der *Strep-Tag-II*-Erkennung bereits festgestellt werden (Abschnitt IV.1.7.6.2), nun sollte gezeigt werden, dass auch die Bindung des Spiegelmers an das *Strep-Tag-II*-Fusionsprotein spezifisch ist. Hierzu wurden Proteine mit verschiedenen isoelektrischen Punkten (Tabelle IV-6) eingesetzt.

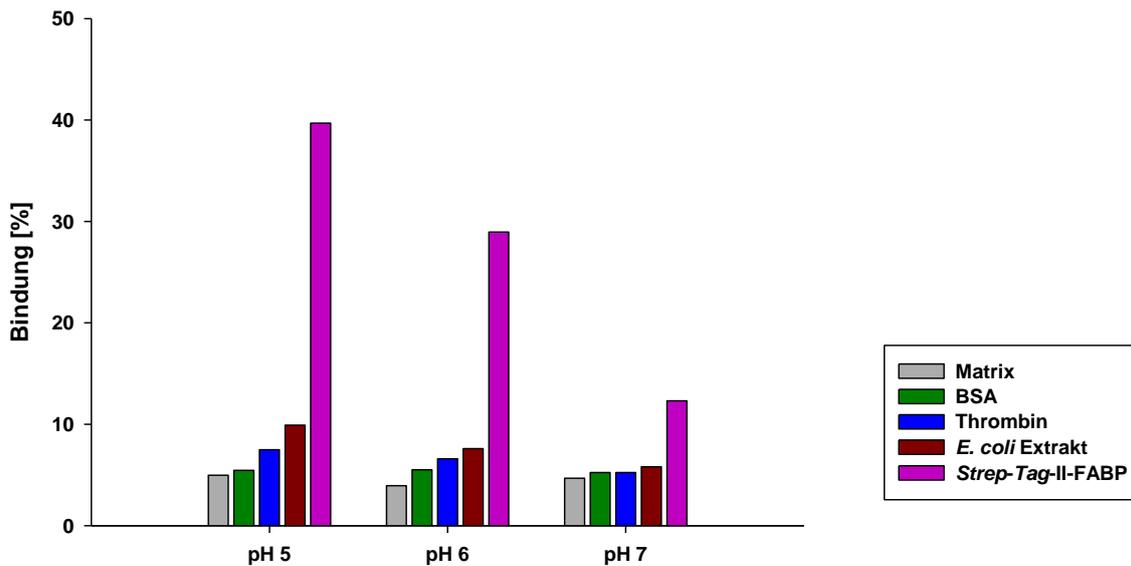
**Tabelle IV-6: Ausgewählte Eigenschaften der für den Spezifitätstest des Spiegelmers ST-146 eingesetzten Proteine.**

Gruppe / Vertreter	Molekulargewicht (kDa)	Isoelektrischer Punkt
<b><i>Strep-Tag-II</i>-FABP</b>	16,8	6,4
<b>BSA</b>	66,4	5,6
<b>Thrombin</b>	37	7,1
<b><i>E.coli</i> Extrakt</b>	Gemisch	Gemisch

Die unspezifische Bindung dieser Proteine durch ST-146 wurde bei verschiedenen pH-Werten evaluiert. Neben BSA wurde Thrombin verwendet, dessen isoelektrischer Punkt im neutralen Bereich liegt. Zudem wurden Proteine aus einem *E.coli* Extrakt eingesetzt, die eine Mischung verschiedener isoelektrischer Punkte darstellen und sich somit für die Untersuchung von unspezifischer Bindung bei verschiedenen pH-Werten eignen. Die Bindung dieser Proteine wurde der Bindung des *Strep-Tag-II*-Fusionsproteins bei pH 7,6 und 5 gegenübergestellt (Abbildung IV-25).

Die Experimente zur Evaluation der Spezifität des Spiegelmers wurden mittels Filterbindungstests durchgeführt. Die Konzentration des Spiegelmers ST-146 betrug 0,1  $\mu\text{M}$  und die Konzentration aller eingesetzten Proteine, auch des Proteingemisches aus dem *E.coli* Extrakt, 0,11  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

Die Bindung des SP-146 an den *Strep-Tag-II* bei pH 7 ist hochspezifisch, hier ist keine Bindung anderer Proteine zu erkennen. Im Falle der Bindung an BSA trifft diese Aussage auch auf die pH-Werte 5 und 6 zu, hier ist ebenfalls keinerlei von der Bindung an die Matrix abweichende Bindung zu verzeichnen. Wird ein Protein mit einem isoelektrischen Punkt im physiologischen pH-Bereich, wie Thrombin, eingesetzt ist ein leichter Anstieg der unspezifischen Bindung bei den pH-Werten 5 und 6 festzustellen.



**Abbildung IV-25: Spezifität der Erkennung von *Strep-Tag-II*-Fusionsprotein durch das Spiegelmer ST-146.** Die Bindung des Spiegelmers ST-146 ist hochspezifisch. In Filterbindungstests wurde die Bindung des Spiegelmers bei pH 5-7 an verschiedene Proteine (Tabelle IV-6) ermittelt und der Bindung an das *Strep-Tag-II*-Fusionsprotein gegenübergestellt. Durch die Auswahl der Proteine konnte ausgeschlossen werden, dass die Spezifität der *Strep-Tag-II*-Fusionsprotein-Erkennung nur auf Grund von Ladungsverteilungen besteht, welche sich mit Verschiebungen des pH-Wertes ändern. Die Menge aller eingesetzten Proteine entsprach jeweils 0,11 µg/µl, das Spiegelmer ST-146 wurde mit einer Konzentration von 0,1 µM verwendet. Als Matrix wurden Filter eingesetzt.

Der größte Anstieg an unspezifischer Bindung bei sinkendem pH-Wert tritt im Falle der Proteine des *E.coli*-Gemisches auf. Bei jeder Senkung des pH-Wertes um einen Punkt werden 2 % zusätzlicher unspezifischer Bindung detektiert. Allerdings liegen diese Werte weit unter dem Zuwachs der Bindung des Spiegelmers ST-146 an das *Strep-Tag-II*-Fusionsprotein.

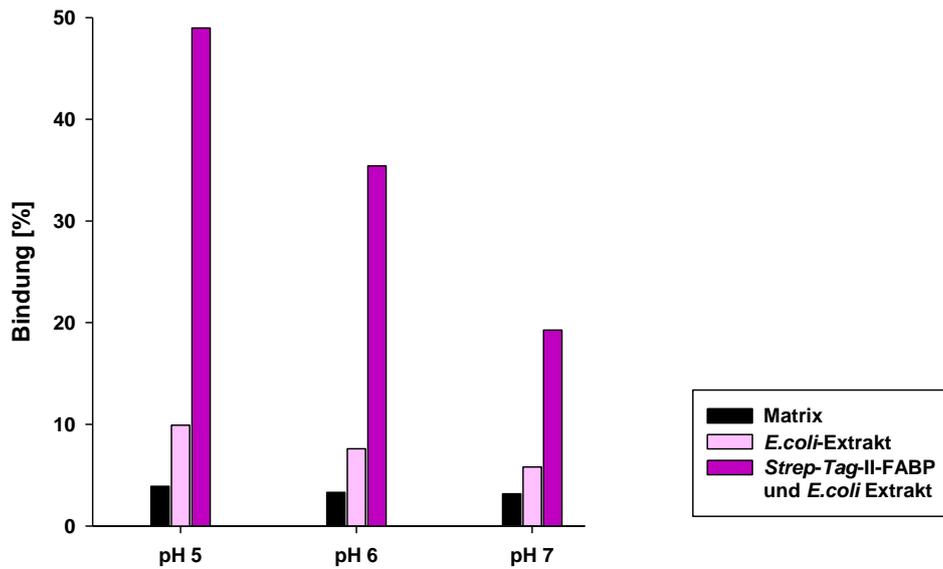
Im Gesamten ist die Spezifität der *Strep-Tag-II*-Fusionsprotein-Bindung durch Spiegelmer ST-146 bei pH 7 am höchsten. Bei diesem pH-Wert kann keine Bindung anderer Proteine festgestellt werden. Bei Senkung des pH-Wertes um einen Punkt auf pH 6 steigt die Bindung des *Strep-Tag-II*-Fusionsproteins, aber auch sehr leicht die unspezifische Bindung von Proteinen mit isoelektrischen Punkten im neutralen oder positiven Bereich. Bei pH 5 ist die Bindung des *Strep-Tag-II*-Fusionsproteins am höchsten, allerdings ist auch die unspezifische Bindung von Proteinen mit isoelektrischen Punkten im neutralen oder positiven Bereich höher als bei pH 6 und 7.

#### IV.1.7.8.2 Bindung von *Strep-Tag-II*-Fusionsprotein aus einem *E.coli* Extrakt

Die Bindung des Spiegelmers ST-146 wurde zusätzlich bei gleichzeitiger Anwesenheit der verschiedenen Proteine aus einem *E.coli*-Extrakt analysiert. Dieses Experiment simuliert somit die Bedingungen bei einer späteren Anwendung des Spiegelmers ST-146 zur

Detektion oder Affinitätsaufreinigung: die Erkennung eines *Strep-Tag-II*-Fusionsproteins aus einem Gemisch anderer Proteine.

Es wurde das Proteingemisch eines *E.coli*-Extrakts eingesetzt und die *Strep-Tag-II*-Bindung mittels Bindungstests mit Filtern analysiert. Die Konzentration des Spiegelmers ST-146 betrug 0,1  $\mu\text{M}$  und die der Proteine 0,11  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Die Bindung wurde bei den pH-Werten 5, 6 und 7 ermittelt.



**Abbildung IV-26: Bindung des *Strep-Tag-II*-Fusionsproteins aus einem Gemisch unterschiedlicher Proteine.** Trotz der Anwesenheit der Proteine aus einem *E.coli*-Extrakt bindet das Spiegelmer ST-146 das *Strep-Tag-II*-Fusionsprotein. Die Bindung wurde mittels Filterbindungstests ermittelt. Die Konzentration des Spiegelmers betrug 0,1  $\mu\text{M}$ , Proteine wurden mit einer Konzentration von 0,11  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  eingesetzt. Bei dem verwendeten Fusionsprotein handelte es sich um FABP mit N-terminal fusioniertem *Strep-Tag-II*. Als Matrix wurden Nitrocellulose-Filter verwendet.

Das Spiegelmer ST-146 ist auch bei der Anwesenheit anderer Proteine in der Lage das *Strep-Tag-II*-Fusionsprotein zu binden (Abbildung IV-26). Die Anwesenheit des *E.coli* Proteingemisches beeinträchtigt nicht die affine Erkennung durch das Spiegelmer. Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, dass ein Einsatz des Spiegelmers zur Detektion von *Strep-Tag-II*-Fusionsproteinen aus Proteingemischen möglich ist.

## IV.1.8 SPIEGELMERE GEGEN DEN SPIEGEL-TAG

### IV.1.8.1 Spiegel-Tag-SELEX

Für die Selektion von Aptameren gegen das gespiegelte Spiegel-Tag-Peptid wurden identische Konditionen wie für die *Strep-Tag-II*-SELEX (Abschnitt IV.1.7.1) gewählt. Als Puffer wurde ebenfalls PBS mit 1 mM Magnesiumchlorid und 0,05 % Tween 20 eingesetzt. Es wurde die K2-DNA-Bibliothek verwendet und die Separierung und Verarbeitung bindender Moleküle während der Selektionsrunden verlief analog zur Selektion *Strep-Tag-II*-bindender Aptamere.

Um den Selektionsdruck während der SELEX zu erhöhen, wurden verschiedene Maßnahmen zur Steigerung der Stringenz eingeführt (Tabelle IV-7). So wurde die Konzentration der DNA-Bibliothek und die des Peptides verringert. Das Verhältnis zwischen eingesetzter DNA- und Peptidmenge wurde vergrößert, wodurch vor allem in den letzten Selektionsrunden weniger Peptidmoleküle um die vorhandenen DNA-Moleküle konkurrierten.

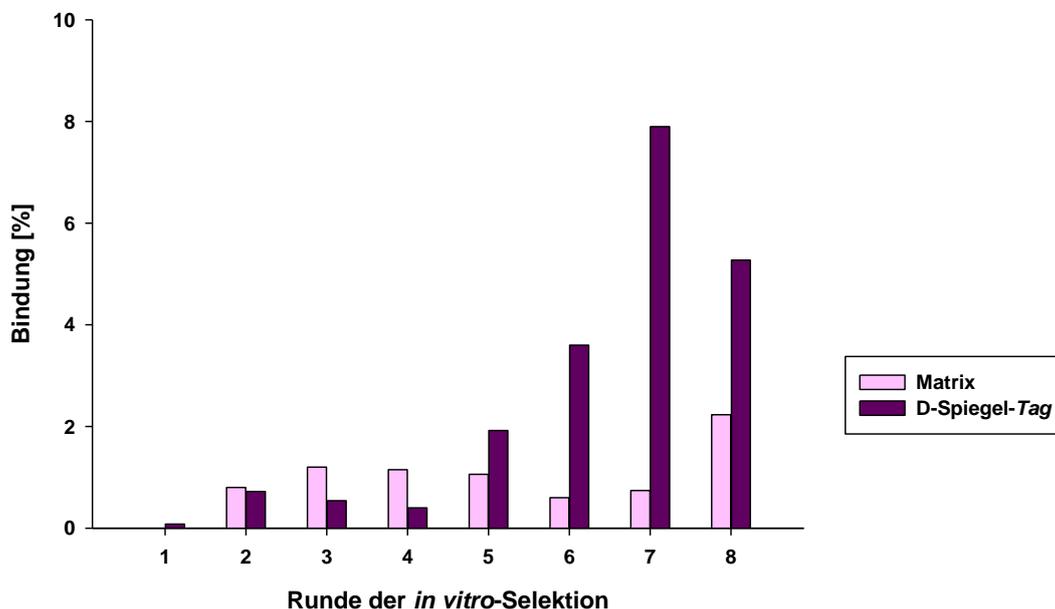
**Tabelle IV-7: Stringenzerhöhung während der Spiegel-Tag-SELEX.** Die Konzentration der DNA-Bibliothek wurde ebenso wie die des Peptides im Verlauf der Selektion reduziert.

Runde der <i>in vitro</i> Selektion	c(DNA) [nM]	c(D-Spiegel-Tag) [nM]	Verhältnis DNA : Spiegel-Tag
1	1000	200	5 : 1
2	750	1500	1 : 2
3	500	500	1 : 1
4	500	500	1 : 1
5	250	100	2 : 1
6	200	75	2 : 1
7	166	33	3 : 1
8	166	33	3 : 1

Während des Verlaufs der ersten vier Selektionsrunden konnte kein Ansteigen der Bindung an das Peptid verzeichnet werden (Abbildung IV-27). Ab Runde zwei wurde eine Präselektion gegen Streptavidin beschichtete magnetische Partikel durchgeführt. Die Bindung an diese Partikel lag während der ersten vier Runden über der Bindung an das Peptid. In Runde fünf stieg die Bindung an das Spiegel-Tag-Peptid auf 1,9 % an. In Runde sechs betrug die Bindung bereits 3,6 % und erreichte mit 7,9 % das Maximum in Runde sieben. Die Werte der Bindung innerhalb der Präselektion dagegen fielen ab Runde vier kontinuierlich ab, bis der niedrigste Stand in Runde sieben mit 0,7 % erreicht wurde.

Nach Runde sieben konnte kein weiterer Anstieg der Bindung an das Spiegel-Tag-Peptid verzeichnet werden, während die Werte für die Präselektion wieder anstiegen. Daher wurde

die angereicherte DNA-Bibliothek der siebten Runde analog zum Vorgehen im Falle der *Strep-Tag-II*-SELEX kloniert.



**Abbildung IV-27: Anreicherung von Aptameren gegen das Spiegel-Tag-Peptid.** Innerhalb von acht Runden der *in vitro* Selektion wurden DNA-Aptamere gegen das Peptid angereichert. Ab der zweiten Runde wurde eine Präselektion gegen Streptavidin-beschichtete magnetische Partikel durchgeführt.

#### IV.1.8.2 Primärstrukturanalyse Spiegel-Tag-bindender Aptamere

48 Sequenzen der vereinzelt Aptamere der angereicherten Bibliothek der siebten Runde der Spiegel-Tag-SELEX wurden mittels des Programmes *Geneious* auf Homologien untersucht. Nur der Zufallsbereich der Sequenzen, ohne die Primer- und Primerbindungsgebiete der Aptamere, wurde für die Analyse eingesetzt.

Die Sequenzen der 48 Klone gehen auf 13 verschiedene Sequenzen zurück. Zwei der Sequenzen kommen jeweils nur einmal vor, daher wurden alle Sequenzen in elf verschiedene Gruppen (A1 - G) und zwei Einzelsequenzen eingeteilt (Abbildung IV-28).

Fünf der 13 unterschiedlichen Sequenzen sind einander sehr ähnlich, weisen jedoch Sequenzabweichungen an mehr als einzelnen Nukleotidpositionen auf. Daher wurden sie in eine Gesamtgruppe A mit den Untergruppen A1 bis A5 eingeordnet. Die Sequenzen der Untergruppen eins bis fünf der Gruppe A sind innerhalb der einzelnen Untergruppe jeweils Klone derselben Sequenz und unterscheiden sich nur an einzelnen Positionen. Für die gesamte Gruppe A konnte eine Konsensussequenz der fünf unterschiedlichen Sequenzen gefunden werden, wobei Abweichungen von dieser in Grau dargestellt sind. Vor allem im 5'-Bereich der Sequenzen gibt es eine große Ähnlichkeit der Sequenzen untereinander.



## ERGEBNISSE

allen Sequenzen. Des Weiteren weicht die Gesamtlänge der Sequenzen stark voneinander ab. Einen Überblick über verschiedene Parameter wie Moleküllänge oder G-Anteil der in Abbildung IV-28 dargestellten Sequenzgruppen ist in Tabelle IV-8 dargestellt.

**Tabelle IV-8: Charakteristika der Primärsequenz.** Die Tabelle fasst verschiedene Eigenschaften der in Abbildung IV-28 dargestellten Sequenzen zusammen, welche aus der *in vitro* Selektion gegen den Spiegel-Tag gewonnen wurden.

Gruppe / Vertreter		Anzahl der Klone	Häufigkeit [%]	Länge [nt]	Anteil G [%]
Gruppe A	1 SP-14	9	18,8	125	39,2
	2 SP-31	4	8,3	121	36,4
	3 SP-56	3	6,3	91	30,8
	4 SP-36	2	4,2	120	39,2
	5 SP-50	2	4,2	90	32,0
Gruppe B	SP-9	10	20,8	150	40,9
Gruppe C	SP-13	6	12,5	95	40,0
Gruppe D	SP-17	3	6,3	126	31,0
Gruppe E	SP-3	3	6,3	63	38,9
Gruppe F	SP-2	2	4,2	90	35,6
Gruppe G	SP-1	2	4,2	90	35,6
	SP-73	1	2,1	121	36,4
	SP-34	1	2,1	90	32,2

Klon SP-9 aus Gruppe B ist mit 20 % die am häufigsten auftretende Sequenz in der angereicherten Bibliothek der siebten Runde. Auch SP-14 aus Gruppe A1 ist mit rund 20 % häufig vertreten. Bezüglich der Häufigkeit folgen Aptamere des Typs SP-13 aus Gruppe C mit einem 12 %igen Anteil an allen Sequenzen. Alle weiteren Klone kamen mit einer Häufigkeit von unter 10 % in der angereicherten Bibliothek der siebten Runde vor, die Sequenzen der Gruppen F und G nur zweimal und die Aptamere SP-73 und SP-34 traten einmal auf.

Bei einer statistischen Verteilung aller vier Nukleotide müsste der Wert für den Anteil eines Nukleotides bei etwa 25 % liegen, jedoch zeigen Aptamere häufig einen besonders hohen Anteil an Guanosinen innerhalb ihrer Sequenzen. Auch bei dieser Selektion wurden besonders G-reiche Aptamere selektiert. Hierbei hebt sich vor allem Gruppe B von der Gesamtheit der Sequenzen ab, die elf Sequenzen haben einen G-Anteil von über 40 %. Mit einem G-Anteil von 31 % besitzt das Aptamer SP-56 den niedrigsten Desoxyguanosingehalt, dieser Wert liegt jedoch immer noch 6 % über dem statistischen Mittelwert.

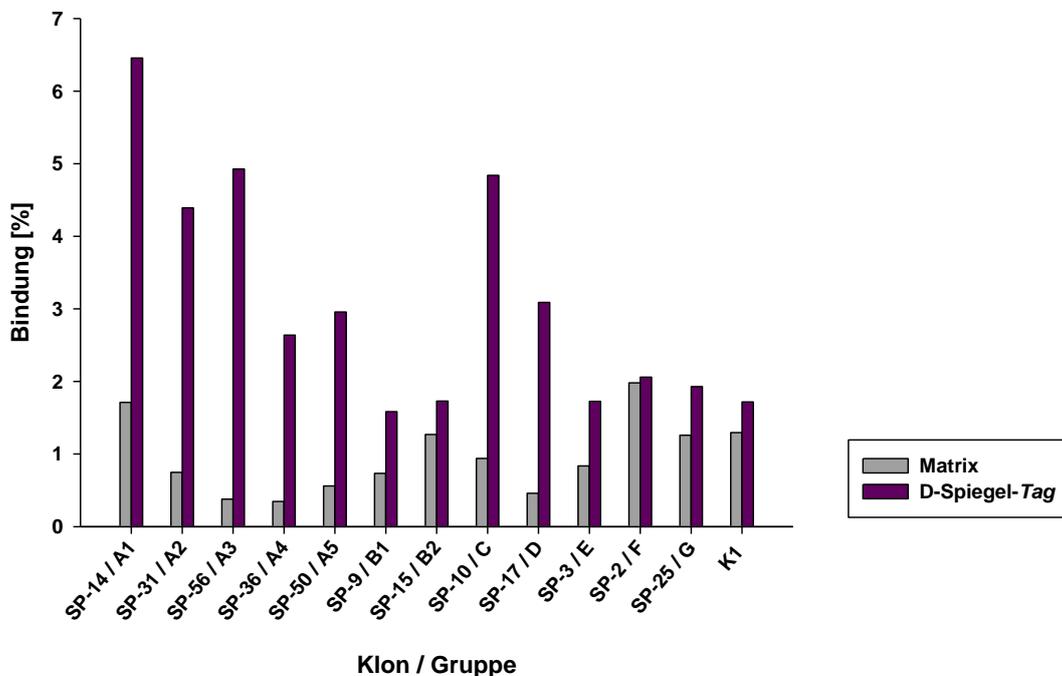
Weiterhin war die unterschiedliche Länge der Sequenzen auffällig. Ausgehend von der K2-DNA-Bibliothek mit einer Moleküllänge von 100 Nukleotiden wurden Aptamere in einem

Längenbereich von 63 Nukleotiden (Aptamere des Typs SP-3 aus der Gruppe E) bis 150 Nukleotiden (Aptamere des Typs SP-9 aus der Gruppe B) selektiert. Der Grund für diese Varianz bezüglich der Moleküllänge ist vermutlich in der Polymerasekettenreaktion zu suchen. Durch bestimmte Sekundärstrukturen innerhalb der variablen Bereiche der Aptamere kann es entweder zu einem ‚Überspringen‘ von Resten kommen, hierbei besonders bei GC-reichen Sequenzen (197). Dies resultiert in einer verminderten Länge des Amplifikates. Längere Konstrukte entstehen bei der Hybridisierung von Templaten mit Templaten während des Annealing-Schrittes. Diese werden anstelle der Primer anschließend verlängert, wodurch es im Gesamten zu einer Verlängerung der Moleküle kommt (201).

Durch ein erneutes Gruppieren der 13 verschiedenen Sequenzen zur Identifikation eines gemeinsamen Bindungsmotives konnte kein Motiv entdeckt werden, welches von allen Aptameren geteilt wird. Daher wurden alle 13 Aptamere in Bindungstests auf eine Bindung an das Spiegel-Tag-Peptid untersucht.

#### IV.1.8.3 Bindungsaffinitäten der Spiegel-Tag-Aptamere

Alle 13 verschiedenen Sequenzen wurden auf ihre Bindungsaffinitäten mittels des Bindungstests mit magnetischen Partikeln untersucht. Das molare Verhältnis von Aptamer zu Spiegel-Tag betrug jeweils 1:1 bei einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$ .



**Abbildung IV-29: Bindungsaffinitäten der Spiegel-Tag-bindenden Aptamere.** Mittels Bindungstests mit magnetischen Partikeln wurde die Bindung aller erhaltenen verschiedenen Sequenzen untersucht. Als Kontrolle K1 diente die unangereicherte Bibliothek. Neben der Bindung an das Peptid wurde die Bindung an Streptavidin-beschichtete Partikel (Matrix) untersucht.

Alle Aptamere der Gruppe A binden das Spiegel-Tag-Peptid (Abbildung IV-29) im Vergleich zur Matrix und der Kontroll-Bibliothek. Mit 6,5 % binden Aptamere des Typs SP-14 am besten. Diese waren auch häufig in der angereicherten Bibliothek vertreten. Da alle Aptamere der Gruppe A an das Zielmolekül binden, ist das Bindungsmotiv wahrscheinlich in dem Sequenzbereich vertreten, den alle Aptamere der Gruppe A teilen. Die Aptamere der Gruppen C und D binden ebenfalls mit 5 % und etwa 3 % das Peptid Spiegel-Tag. Keine oder kaum eine Bindung des Peptides konnte bei den Aptameren der Gruppen B, E, F und G festgestellt werden. Hierbei lag die Bindung des Peptides entweder genauso hoch oder nur wenig über der Bindung des Aptamers an die Streptavidin-Matrix oder entsprach jener der unangereicherten Bibliothek.

#### IV.1.8.4 Aptamer SP-56

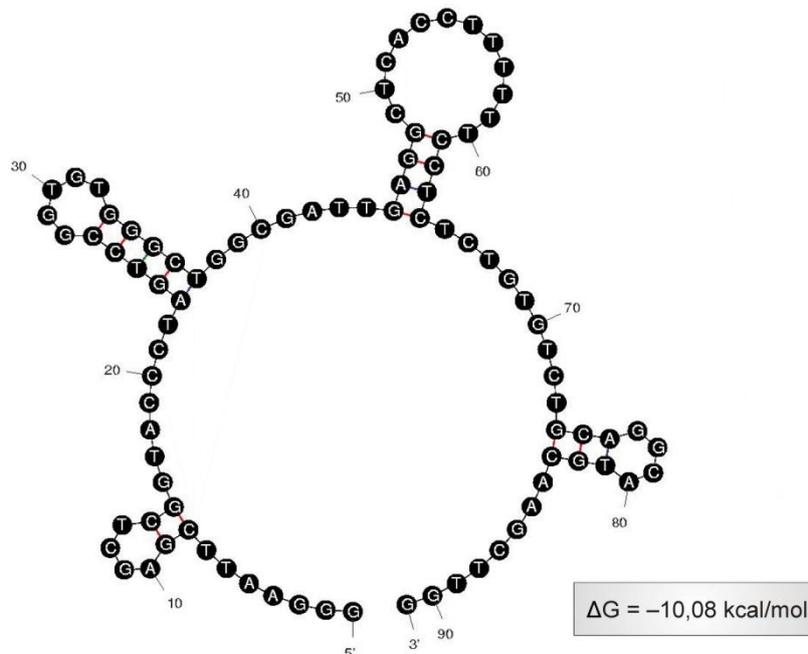
Aptamer SP-56 wurde für alle weiteren Schritte ausgewählt. Dieses Aptamer der Gruppe A3 erreichte im Bindungstest das zweitbeste Ergebnis. Die Bindung des Aptamers SP-14 lag zwar über der Bindung von SP-56, allerdings ist SP-14 mit 125 Nukleotiden deutlich länger als SP-56. Für eine spätere Synthese der Aptamersequenz als Spiegelmer müssen jedoch auch die Kosten der Synthese im Blick behalten werden. Daher wurde Aptamer SP-56 ausgewählt, da es eine hohe Bindung und gleichzeitig eine vergleichsweise moderate Moleküllänge aufweist.

##### IV.1.8.4.1 Sekundärstrukturanalyse des Aptamers SP-56

Die Hybridisierungsbereiche des Aptamers SP-56 wurde mittels des Programmes *Mfold* unter Benutzung des Zuker-Algorithmus vorhergesagt (198). Die Faltung des Moleküls wurde bei den Konditionen 137 mM Natriumchlorid und 1 mM Magnesiumchlorid bei einer Temperatur von 23°C bestimmt. Für die Analyse der Sekundärstruktur des Aptamers SP-56 wurden auch die Primer- und Primerbindungsgebiete des Moleküls mit einbezogen.

Aptamer SP-56 besitzt vier kleine Haarnadelstrukturen (Abbildung IV-30). Ein kurzer doppelsträngiger Bereich geht hierbei jeweils in eine Schleife über. Die beiden kleinsten Haarnadeln des Moleküls befinden sich im 5'- und im 3'-Bereich der Sequenz und die Schleifen dieser Haarnadeln umfassen jeweils vier Nukleotide. Die zwei größeren Haarnadeln befinden sich im Zufallsbereich der Sequenz. Die erste große Haarnadel vom 5'-Ende gesehen umfasst fünf komplementäre Basenpaare des Stammes der Haarnadel, die Schleife geht in vier Nukleotide über. Die näher am 3'-Ende befindliche große Haarnadel ist die größte des gesamten Moleküls mit acht Nukleotiden des Stammes und 12 Nukleotiden in der Schleife.

Die Anzahl aller auftretenden Basenpaare in doppelsträngigen Bereichen beträgt für das gesamte Molekül lediglich 14, daher liegt der Wert der Freien Energie bei -10,08 kcal/mol. Aptamer SP-56 besitzt im Gesamten eine eher ungefaltete Form, welche durch das Fehlen langer doppelsträngiger Bereiche charakterisiert werden kann.

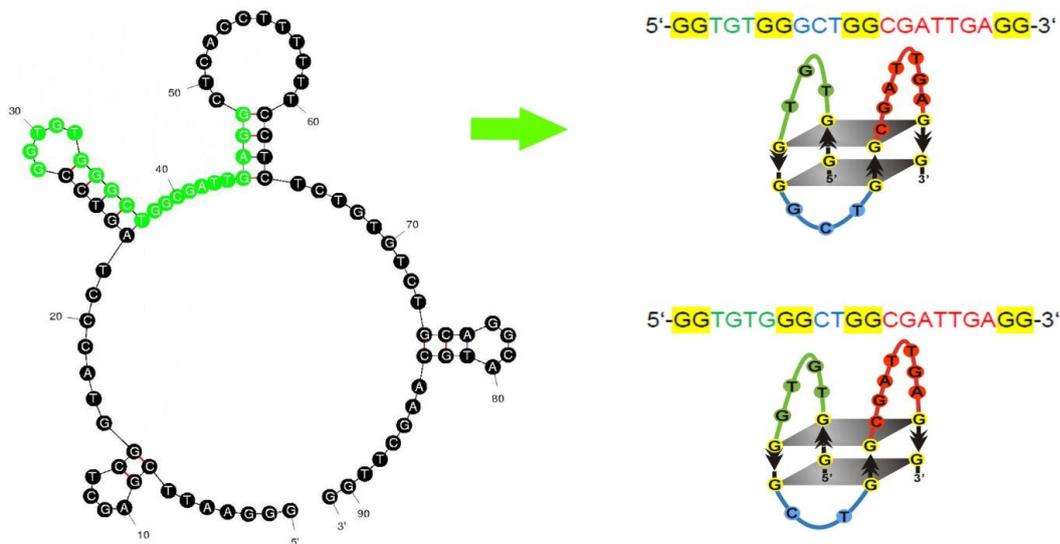


**Abbildung IV-30: Sekundärstruktur des Spiegel-Tag-bindenden Aptamers ST-56.** Die Vorhersage der Hybridisierungsbereiche und die Ermittlung der Freien Energie für diese Faltung erfolgte mittels des Programmes *Mfold*. Dargestellt ist nur die thermodynamisch stabilste Faltung des Moleküls.

### G-Quadruplexmotive des SP-56

Die Sequenz des Aptamers SP-56 ist guanosinreich. Außerdem ist SP-56 trotz des Fehlens von ausgeprägten Sekundärstrukturbereichen in der Lage das Zielmolekül Spiegel-Tag affin zu binden. Programme zur Sekundärstrukturvorhersage wie *Mfold* treffen keine Aussage über das Vorhandensein des bei Aptameren häufig auftretenden Strukturmotivs des G-Quadruplexes. Daher wurde eine Analyse mit Hilfe des Programmes *Quadfinder* durchgeführt, um mögliche G-Quadruplexmotive innerhalb des Moleküls zu ermitteln.

Das Aptamer SP-56 besitzt zwei potentielle G-Quadruplexmotive (Abbildung IV-31) entsprechend der Formel  $G_2X_nG_2X_0G_2X_p$ . Beide Formationen gehen auf dieselbe Sequenz zurück, da jedoch ein G-Paar ein benachbartes G enthält, kann dieses entweder der ersten oder der zweiten Schleife zugeordnet werden. Die G-Quadruplexe befinden sich außerhalb der Primer- und Primerbindungsgebiete in der variablen Region des Aptamers. Involviert sind die Nukleotide der zwei größeren Haarnadelstrukturen.

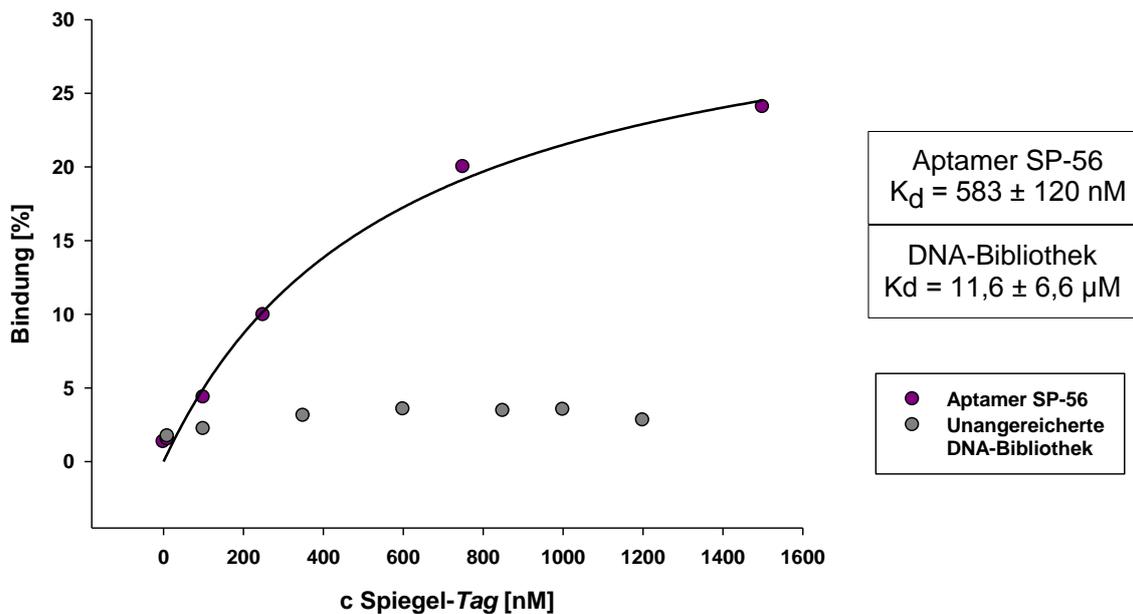


**Abbildung IV-31: G-Quadruplexmotive des Aptamers SP-56.** Die Gesamtsequenz des Aptamers SP-56 wurde auf das Vorhandensein von charakteristischen Anhäufungen von G-Paaren oder -tripletts untersucht. Zwei potentielle G-Quadruplexmotive wurden identifiziert, welche aus vier G-Paaren bestehen. Beide Motive liegen innerhalb des variablen Bereiches der Sequenz. Der Bereich des G-Quadruplexes ist in der Sekundärstruktur (links) grün eingefärbt. Die zwei möglichen G-Quadruplexe sind schematisch im rechten Bildabschnitt dargestellt und unterscheiden sich nur durch ein G, welches entweder der Schleife 2 (oberes Modell) oder der Schleife 1 (unteres Modell) zugeordnet wurde. Die schematische Abbildung der G-Quadruplexformation ist abgeleitet von Burge et al. (180), es wurde eine antiparallele Struktur als Beispiel ausgewählt. Die Farbverteilung entspricht in den Sequenzen und in der schematischen Abbildung: gelb = G-Paare des G-Quadruplexes, grün = Schleife 1, blau = Schleife 2, rot = Schleife 3.

#### IV.1.8.4.2 Bestimmung der Dissoziationskonstante des Aptamers SP-56

Die Bestimmung der Dissoziationskonstante  $K_d$  des Aptamers SP-56 an das Spiegel-Tag-Peptid erfolgte mittels des Bindungstests mit Streptavidin-beschichteten magnetischen Partikeln. Konstante Mengen des Aptamers wurden bei einer Konzentration von 100 nM mit steigenden Mengen an Peptid versetzt und anschließend der Anteil an gebundenem Aptamer bestimmt. Die konzentrationsabhängige Bindungskurve wurde unter der Annahme eines 1:1-Bindungsprozesses mit Hilfe des Programmes *SigmaPlot* erstellt. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung des  $K_d$ -Wertes für die unangereicherte DNA-Bibliothek K2, welche in die erste Runde der *in vitro* Selektion eingesetzt worden war.

Die Bindungskurve folgt dem Verlauf einer Hyperbel. Bei steigender Konzentration an Spiegel-Tag-Peptid steigt auch die Menge an gebundenem Aptamer, bis ein Bereich der Sättigung erreicht wird (Abbildung IV-32). Für die Bindung des Aptamers SP-56 an das Spiegel-Tag-Peptid konnte eine Bindungskonstante von  $583 \pm 120$  nM ermittelt werden.



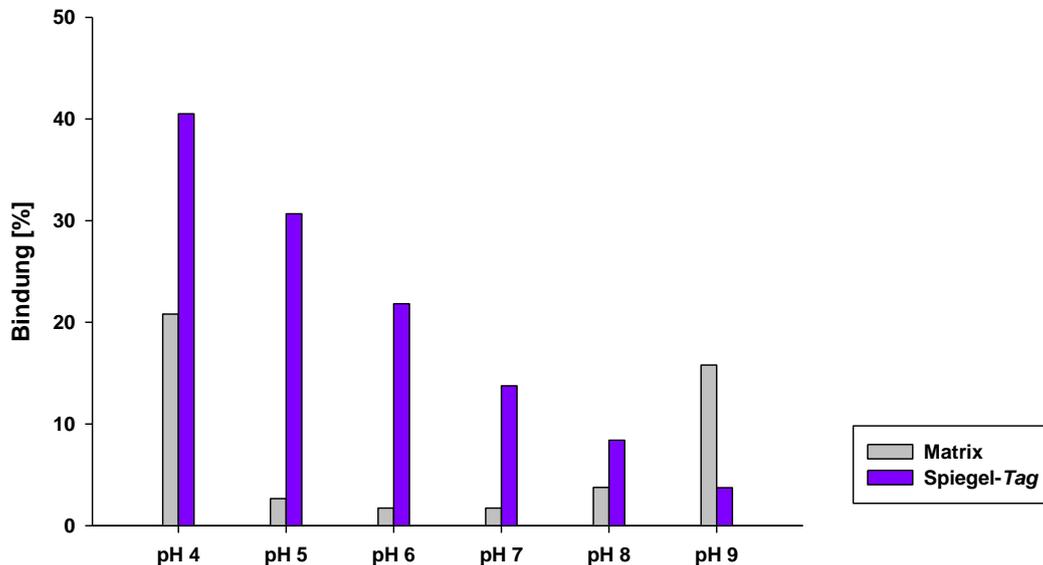
**Abbildung IV-32: Bestimmung der Bindungskonstante von Aptamer SP-56 an das Spiegel-Tag-Peptid.** Aptamer SP-56 bindet mit einem  $K_d$ -Wert von  $583 \pm 120$  nM das Zielmolekül Spiegel-Tag. Im Vergleich dazu wurde die Bindungskonstante der unangereicherten Bibliothek vor der ersten Selektionsrunde bestimmt. Diese betrug  $11,6$   $\mu$ M.

Die hohe Bindungsaffinität des Aptamers wird verdeutlicht durch einen Vergleich mit der Bindung der unangereicherten DNA-Bibliothek K2 an das Peptid. Die Bindung der Bibliothek steigt jedoch ebenfalls bei niedrigen Konzentrationen zunächst leicht an. Dies verdeutlicht die relativ hohe unspezifische Bindung der DNA-Bibliothek an das Spiegel-Tag-Peptid, welche schon während der *in vitro* Selektion festgestellt wurde. Grund hierfür ist der isoelektrische Punkt des Peptides Spiegel-Tag im alkalischen Bereich. Im Gesamten liegt die Bindung der Bibliothek jedoch um Größenordnungen unter der des Aptamers. Die Bindung der Bibliothek ist mit einem Wert von  $11,6$   $\mu$ M 20-fach schwächer.

#### IV.1.8.4.3 Abhängigkeit der Bindung des SP-56 vom pH-Wert

Die Bindung des SP-56 an das Zielmolekül Spiegel-Tag wurde auf eine Abhängigkeit vom pH-Wert des Puffers untersucht. Hierzu wurden Bindungstests mit magnetischen Partikeln durchgeführt. Als Puffer wurde der PBS-MT-Puffer mit verschiedenen pH-Werten verwendet. Das Aptamer SP-56 wurde mit einer Konzentration von  $0,1$   $\mu$ M im Verhältnis 1:2 mit dem Spiegel-Tag-Peptid inkubiert und anschließend die Menge der gebundenen DNA ermittelt. Die Bindung des SP-56 ist stark vom pH-Wert des Puffers abhängig (Abbildung IV-33). Sinkt der pH-Wert der Lösung, steigt der Anteil an gebundenem Aptamer. Bei pH 8 werden  $8,4$  % SP-56 gebunden, bei einer Senkung des pH-Wertes um einen Punkt auf pH 7 bereits  $13,7$  %. Wird der pH-Wert auf pH 6 gesenkt, steigt die Bindung auf  $22$  %, bei pH 5 binden  $30$  % SP-56. Der höchste Wert der SP-56-Bindung wird bei pH 4 mit  $40$  % Bindung erreicht.

Allerdings ist bei den beiden Extrema der hier verwendeten pH-Werte, bei pH 4 und pH 9, auch die Bindung an die Streptavidin-Matrix mit 20 % und 16 % sehr hoch. Diese unspezifische Bindung an die Matrix ist zwischen pH 5 und pH 7 am niedrigsten.



**Abbildung IV-33: PH-Abhängigkeit der Bindung von SP-56 an den Spiegel-Tag.** Mittels Bindungstests mit magnetischen Partikeln wurde die pH-Wert-Abhängigkeit der Bindung von SP-56 an den Spiegel-Tag evaluiert. Die Bindung ist stark vom pH-Wert abhängig, mit sinkendem pH-Wert steigt auch die Menge an gebundener DNA. Als Matrix wurden Streptavidin-beschichtete Partikel verwendet.

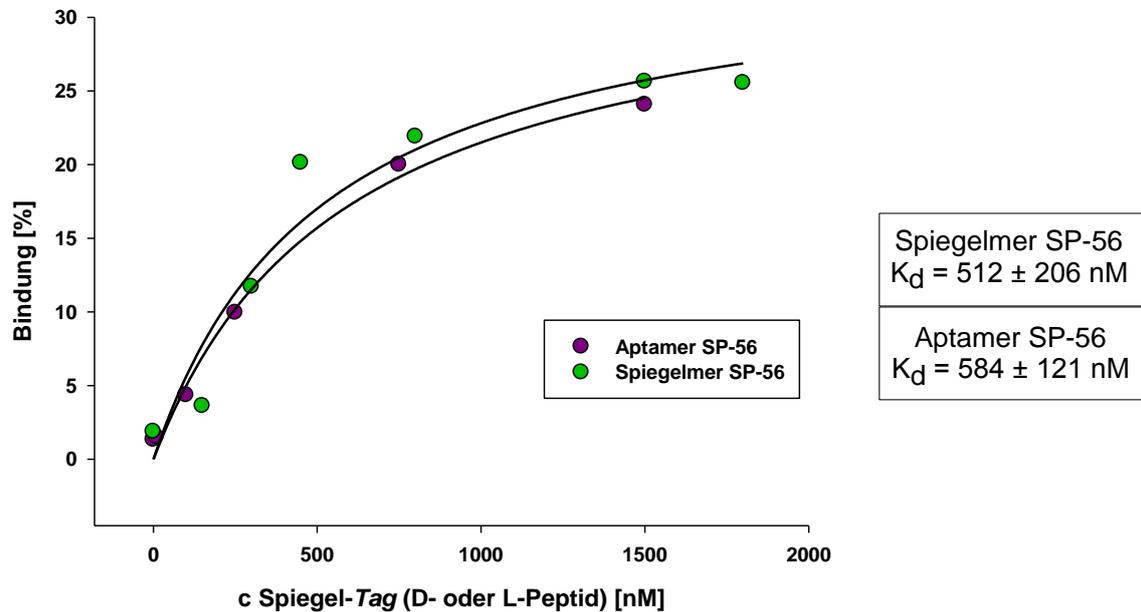
Wie bereits bei ST-146 gegen das *Strep-Tag-II*-Affinitätspeptid besteht eine große Abhängigkeit der Bindung vom pH-Wert. Vor allem der Anteil an maximal gebundener DNA steigt bei sinkendem pH-Wert stark an. Wie auch bei ST-146 könnte diese Eigenschaft bei der Elution des Spiegelmers von dem Zielmolekül ausgenutzt werden, da eine Steigerung des pH-Wertes mit einer starken Abnahme der Bindungsfähigkeit des SP-56 einhergeht.

#### IV.1.8.5 Spiegelmer SP-56

Nachdem die Bindung des Aptamers SP-56 und verschiedene Charakteristika des Moleküls untersucht worden waren, wurde die Dissoziationskonstante  $K_d$  auch für das korrespondierende Spiegelmer SP-56 ermittelt. Das Vorgehen zur Ermittlung der Konstante erfolgte analog zu dem für das Aptamer SP-56. Um die Bindungskurven und  $K_d$ -Werte des Spiegelmers SP-56 und des korrespondierenden Aptamers SP-56 vergleichen zu können wurden beide Bindungskurven in einem Diagramm aufgetragen (Abbildung IV-34).

Die Bindungskonstante  $K_d$  der Bindung des Spiegelmers SP-56 an das ungespiegelte Peptid Spiegel-Tag in der L-Konformation beträgt  $512 \pm 121$  nM. Die Bindung des Spiegelmers gleicht somit der des korrespondierenden Aptamers SP-56 an das D-Spiegel-Tag-Peptid.

Sowohl die Form der hyperbolischen Bindungskurven, als auch die  $K_D$ -Wert beider Enantiomere sind gleich.



**Abbildung IV-34: Bestimmung der Dissoziationskonstante  $K_D$  für das Spiegelmer SP-56 gegen das Spiegel-Tag-Peptid.** Zur Ermittlung der Bindungskonstanten wurden bei einer konstanten Konzentration von 100 nM Spiegelmer SP-56 steigende Konzentrationen an Spiegel-Tag-Peptid eingesetzt und die Bindung mittels des Bindungstests mit magnetischen Partikeln untersucht. Für beide Enantiomere SP-56 konnte eine gleiche Bindungskonstante ermittelt werden.

## IV.2 KRISTALLISATION UND STRUKTURAUFKLÄRUNG VON NUKLEINSÄUREN

Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Kristallisation und Röntgenstrukturaufklärung von Nukleinsäuren. Durch die Kristallisation eines Doppelstranges, bestehend ausschließlich aus LNA-Monomeren (Abschnitt IV.2.1), konnte erstmals die Struktur einer LNA/LNA-Doppelhelix aufgeklärt werden (Abschnitt IV.2.2). Außerdem wird die Kristallisation des im ersten Teil der Arbeit erhaltenen *Strep-Tag-II*-Binders ST-146-A beschrieben (Abschnitt IV.2.3).

### IV.2.1 KRISTALLISATION UND RÖNTGENKRISTALLOGRAFISCHE ANALYSE EINER LNA-DOPPELHELIX

Die Sequenz der LNA/LNA-Homoduplex wurde von einem RNA/RNA-Homoduplex des Aminoacylstammes der tRNA<sup>Ser</sup> aus *E.coli* abgeleitet, dessen Struktur bereits gelöst ist (202). Die chemisch synthetisierten Einzelstränge 5'-(GGTGAGG)<sup>L</sup>-3' und 5'-(CCTCACCC)<sup>L</sup>-3' wurden zur Ausbildung der Doppelhelix zunächst in Wasser hybridisiert. Anschließend wurden im ersten Testverfahren 24 Kristallisationsbedingungen mit Hilfe des *Nucleic Acid Mini Screen Kit* (HR2-118, Hampton Research) mittels der Technik des hängenden Tropfens untersucht. Hierbei wurde als Reservoirlösung 35 %iges 2-Methyl-2,4-pentandiol (MPD) eingesetzt. Weiterhin wurden in einem zweiten Testverfahren 48 Kristallisationsbedingungen des *Natrix Formulation Kit* (HR2-116, Hampton Research) mittels der Technik des sitzenden Tropfens getestet.

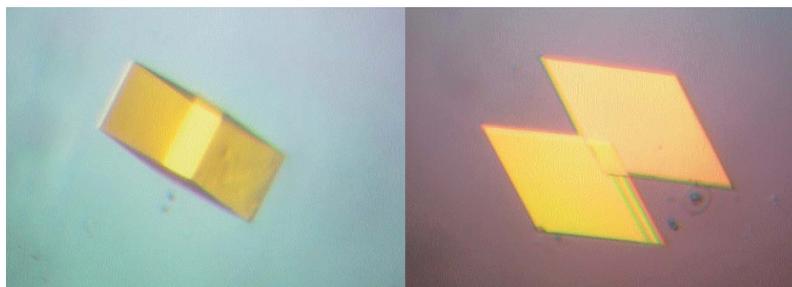
Die Konzentration des LNA-Duplexes entsprach bei allen Ansätzen 0,5 mM. Nach drei bis vier Tagen Wachstum wurden Kristalle mit dem ersten Testverfahren (Lösung 2) unter den in Tabelle IV-9 angegebenen Bedingungen erhalten.

**Tabelle IV-9: Kristallisationsbedingungen für Kristalle des LNA/LNA-Duplexes.** Die Konzentration der Reservoirlösung betrug 35 % MPD (v/v). Die Kristalle wuchsen bei einer Temperatur von 294 K.

Komponente	Konzentration
Natriumcacodylat, pH 5,5	40 mM
Cobalthexamin	20 mM
Natriumchlorid	80 mM
Magnesiumchlorid	20 mM
MPD	10 % (v/v)

Eine Optimierung der Konzentration der MPD-Reservoirlösung erbrachte die besten Kristalle (Abbildung IV-35) bei Konzentrationen von 33 - 41 % MPD. Diese waren von regelmäßigem

Wachstum und hoher Reproduzierbarkeit. Der für die Vermessung verwendete Kristall war bei 40 % (v/v) MPD gewachsen.



**Abbildung IV-35: Repräsentative Kristalle des LNA/LNA-Homoduplexes.** Die Dimensionen der Kristalle betragen ungefähr 0,2 x 0,2 x 0,1 - 0,05 mm. Die Konzentration der MPD-Reservoirlösung betrug 33 % (v/v) MPD (links), und 35 % (v/v) MPD (rechts).

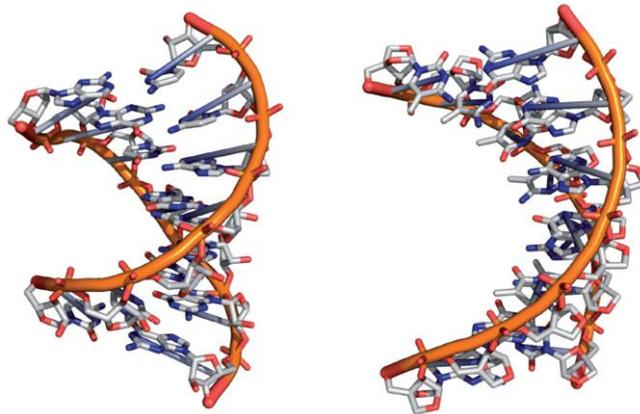
Die Datenakquisition erfolgte am Elettra Synchrotron, Triest, bei einer Wellenlänge von 1,0 Å. Da MPD als Kryoprotektans wirkt, wurde kein Kryopuffer eingesetzt. Neben einem hochaufgelösten Datensatz (80 - 1,9 Å) wurde ein niedrigaufgelöster Datensatz (80 - 2,7 Å) erfasst. Tabelle IV-10 zeigt die Daten der prozessierten und zusammengeführten Datensätze.

**Tabelle IV-10: Statistik der Datensammlung und Prozessierung des LNA/LNA-Duplexes.** Die Statistik beinhaltet die zusammengeführten Daten des hochaufgelösten und des niedrigaufgelösten Datensatzes. Werte in Klammern entsprechen den Daten der höchsten Auflösungsschale.  $*R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$ .  $I_i(hkl)$  und  $\langle I(hkl) \rangle$  entsprechen den gemessenen individuellen und Durchschnitts-Intensitäten eines Reflexes mit den Indizes  $hkl$ .  $\sum_i$  entspricht der Summe über die jeweiligen Messungen eines Reflexes mit den Indizes  $hkl$ .  $\sum_{hkl}$  ist die Summe über alle Reflexe.

<b>Strahlungsquelle</b>	XRD1, Elettra
<b>Wellenlänge [Å]</b>	1,000
<b>Raumgruppe</b>	C2
<b>Parameter der Einheitszelle [Å, °]</b>	$a = 77,91; b = 40,74; c = 30,06; \beta = 91,02$
<b>Matthews-Koeffizient (Å<sup>3</sup>Da<sup>-1</sup>)</b>	2,48
<b>Duplexe pro asymmetrischer Einheit</b>	2
<b>Wassergehalt [%]</b>	66,5
<b>Gemessene Reflexe</b>	35694
<b>Einzigartige Reflexe</b>	7382
<b>Auflösungsbereich [Å]</b>	80 - 1,9 (1,93 - 1,90)
<b>Vollständigkeit [%]</b>	98 (97,2)
<b>Multiplizität</b>	4,8 (3,8)
<b>*<math>R_{\text{merge}}</math> [%]</b>	7,3 (21,7)
<b>Durchschnitt <math>\langle \sigma(I) \rangle</math></b>	19,7 (1,0)

## IV.2.2 STRUKTUR EINER LNA/LNA-DOPPELHELIX

In der Folge konnte erstmals die Struktur einer LNA/LNA-Doppelhelix, bestehend ausschließlich aus LNA-Nukleotiden, gelöst werden (203). Die Lösung der Struktur erfolgte mittels Molekularem Ersatz.



**Abbildung IV-36: Vergleich der Struktur eines LNA/LNA-Homodimers (rechts) und des korrespondierenden RNA/RNA-Homodimers (links).** Der LNA-Duplex ist eine gestreckte Helix. Statt der elf Basenpaare pro Windung der Helix bei der RNA, besitzt der LNA-Duplex 14 Basenpaare pro Windung (203).

Die Struktur der Doppelhelix kann als rechtsgängige antiparallele Helix beschrieben werden, deren Stränge mittels Watson-Crick-Basenpaarung verbunden sind. Alle Nukleotide liegen in der C2'-*exo*-Konformation vor. Die Gestalt des Homodimers entspricht einer gestreckten Helix mit einer verbreiterten Großen Furche und einer im Vergleich zur korrespondierenden RNA/RNA-Doppelhelix Kleinen Furche geringerer Größe. Die Veränderungen der helikalen Parameter der Helix im Vergleich zur RNA bewirken eine Konformation des gesamten Moleküls, welche nicht durch die kanonische A- oder B-Konformation von Nukleinsäuren beschrieben werden kann. Die Entwindung der Helix resultiert in einem Anstieg der hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Basen beider Stränge, und daraus folgend in einer Erhöhung der Stapelungsenergie der Nukleotide.

## IV.2.3 KRISTALLISATION DES D-*STREP*-TAG-II-BINDENDEN APTAMERS ST-146-A

Die Aufklärung der Struktur eines Aptamers ist nicht nur als bildgebendes Verfahren von großem Wert, sondern es können auch Charakteristika der Bindung aufgeklärt, näher untersucht oder bestätigt werden. Mit der Kristallisation der Verkürzung des im ersten Teil der Arbeit erhaltenen D-*Strep-Tag-II*-Binders ST-146 ist der erste Schritt hin zu einer Aufklärung der Struktur des Moleküls erreicht.

Die verkürzte Version des besten *Strep-Tag-II*-Binders ST-146, das 43 Nukleotide große Molekül ST-146-A, wurde für Kristallisationsversuche eingesetzt. Zunächst wurde Aptamer

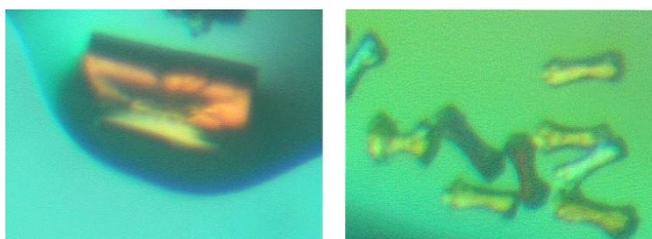
ST-146-A in die für die Bindung an das Zielmolekül erforderliche Faltung überführt. Hierzu erfolgte eine De- und Renaturierung mit 1 mM Magnesiumchlorid, des Weiteren wurde Tween 20 (Endkonzentration 0,05 %) zugefügt.

Anschließend wurden im ersten Testverfahren 24 Kristallisationsbedingungen des *Nucleic Acid Mini Screen Kit* (HR2-118, Hampton Research) mittels der Technik des hängenden Tropfens untersucht. Hierbei wurde als Reservoirolösung 35 %iges MPD eingesetzt. Weiterhin wurden in einem zweiten Testverfahren 48 Kristallisationsbedingungen des *Natrix Formulation Kit* (HR2-116, Hampton Research) mittels der Technik des sitzenden Tropfens getestet. Die Konzentration des ST-146-A entsprach bei allen Kristallisationsansätzen 0,3 mM. Ein Kristallwachstum konnte nach zehn Tagen unter den in Tabelle IV-11 angegebenen Bedingungen erreicht werden.

**Tabelle IV-11: Kristallisationsbedingungen für Kristalle des Aptamers ST-146-A.** Die Kristalle wurden mittels des zweiten Testverfahrens (Lösung 43) bei einer Temperatur von 294 K erhalten.

Komponente	Konzentration
Tris, pH 7,5	50 mM
Ammoniumacetat	50 mM
Magnesiumchlorid	10 mM
MPD	10 % (v/v)

Abbildung IV-37 zeigt repräsentative Kristalle, welche unter diesen Bedingungen erhalten worden waren.



**Abbildung IV-37: Repräsentative Kristalle des D-Strep-Tag-II-bindenden Aptamers ST-146-A.** Die Dimensionen der Kristalle betragen ungefähr 0,1 x 0,03 x 0,03 mm (links) und 0,05 x 0,01 x 0,01 mm (rechts).



## V. DISKUSSION

---

In dieser Arbeit wurden erstmals affine und spezifische Binder für das Affinitätspeptid *Strep-Tag-II* entwickelt und somit die Grundlage für ein völlig neues Affinitätssystem aus Spiegelmer und Affinitäts-*Tag* geschaffen. Die Vorteile eines solchen Systems gehen mit den hervorragenden Eigenschaften der Spiegelmere einher, wie der Resistenz gegenüber dem Abbau durch Nukleasen bei gleichzeitiger affiner und spezifischer Bindung an das Zielmolekül. Diese Vorteile können nun auch für verschiedene Anwendungen zur Detektion und Affinitätsaufreinigung von *Strep-Tag-II*-Fusionsproteinen eingesetzt werden. Das entwickelte Spiegelmer ST-146 bindet *Strep-Tag-II*-Fusionsproteine im nanomolaren Bereich. ST-146 bindet sowohl N- als auch C-terminale *Strep-Tag-II*-Fusionsproteine und das Affinitätssystem kann in einem Bereich von pH 5 - 7,5 eingesetzt werden.

Als Weiterentwicklung des Affinitätssystems aus Spiegelmer und Affinitäts-*Tag* wurde ein neuer Affinitäts-*Tag* für Fusionsproteine vorgestellt. Der Spiegel-*Tag* wurde *in silico* entwickelt. Es wurden Spiegelmere gegen dieses Affinitätspeptid hergestellt, welche ebenfalls eine Bindung im nanomolaren Bereich aufweisen. Die Spiegelmere können mittels ihrer Bindung an rekombinante Spiegel-*Tag*-Fusionsproteine für die Detektion und die Aufreinigung rekombinanter Proteine eingesetzt werden.

Um eine Strukturaufklärung der im ersten Teil dieser Arbeit erhaltenen Affinitäts-*Tag*-bindenden Moleküle durch Röntgenstrukturanalyse zu ermöglichen, wurden im zweiten Teil Nukleinsäuren kristallisiert. Es wurden Kristalle des verkürzten *Strep-Tag-II*-bindenden Aptamers ST-146 gezüchtet, die eine röntgenkristallografische Aufklärung der Struktur dieses Moleküls ermöglichen. Weiterhin wurde eine Doppelhelix kristallisiert, welche ausschließlich aus LNA-Monomeren besteht. Dies ermöglichte erstmals die Strukturaufklärung einer LNA/LNA-Duplex.

### V.1 *IN VITRO* SELEKTIONEN GEGEN PEPTIDE

Das Gelingen einer *in vitro* Selektion ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Einer der wichtigsten Punkte im Vorfeld der Selektion ist die Auswahl eines geeigneten Zielmoleküls. Aptamere oder Spiegelmere wurden gegen eine Vielzahl von Zielmolekülen oder -strukturen selektiert, allerdings ist nicht jedes Molekül als Zielmolekül geeignet. Ein entscheidender Faktor für den Erfolg einer Selektion gegen ein Peptid ist der isoelektrische Punkt des Zielmoleküls. Im Allgemeinen bilden Proteine oder Peptide, welche bei physiologischen Bedingungen (pH 7,0 - 7,4) positiv geladen sind, exzellente Zielmoleküle für eine *in vitro* Selektion (204). Die in dieser Arbeit eingesetzten Peptide besitzen einen isoelektrischen

Punkt von 7,6 (*Strep-Tag-II*-Peptid) und 11,3 (*Spiegel-Tag*) und sind somit ideal geeignet für eine *in vitro* Selektion, weil sie unter den Selektionsbedingungen positive Ladungen tragen.

Sowohl RNA- als auch DNA-Bibliotheken werden für *in vitro* Selektionen eingesetzt, wobei gezeigt werden konnte, dass DNA-Aptamere bezüglich ihrer Affinität und Spezifität mit RNA-Aptameren vergleichbar sind (23). DNA ist jedoch vergleichsweise stabiler und kann kostengünstiger synthetisiert werden, zudem kann der eigentliche Selektionsprozess schneller und einfacher durchgeführt werden. Daher wurde für die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Selektionen eine DNA-Bibliothek verwendet.

Ein weiterer entscheidender Punkt für den Erfolg einer *in vitro* Selektion ist die Auswahl der Immobilisierung der Zielmoleküle und damit im Zusammenhang stehend die Wahl der Separationsstrategie. Magnetische Partikel bilden eine ideale Selektionsmatrix, da sie eine effektive Separierung des Zielmoleküls und der daran gebundenen Aptamere erlauben (26;27). Trotz dieser idealen Voraussetzung konnten innerhalb dieser Arbeit erst hochspezifische Aptamere gegen Peptide angereichert werden, nachdem die Separationstechnik umgestellt wurde (Abschnitt IV.1.5). So wurden nach der Optimierung des Protokolls Aptamere und Peptidzielmoleküle zunächst frei in Lösung gebunden und anschließend wurden die magnetischen Streptavidin-Partikel zur Bindung des Aptamer-Peptid-Komplexes zugegeben.

Die Immobilisierung des Aptamer-Peptid-Komplexes nach einer Bindung frei in Lösung bietet hierbei verschiedene Vorteile. Zum Einen wird ein optimaler Zugang der DNA-Bibliothek zum Zielmolekül ermöglicht. Besonders bei sehr kurzen Peptiden wie dem Oktapeptid *Strep-Tag-II* ist dieser Faktor von Bedeutung. Des Weiteren garantiert diese Vorgehensweise, dass die mit Bedacht gewählten molaren Verhältnisse zwischen Aptamer-Bibliothek und Zielmolekül eingehalten werden können. Liegt das Zielmolekül dagegen bereits immobilisiert vor, kann keine genaue Aussage über die Anzahl der tatsächlich zugänglichen Peptide getroffen werden. Dadurch wird das Zielmolekül möglicherweise in zu geringer Konzentration für eine Anreicherung eingesetzt.

Für *in vitro* Selektionen von Nukleinsäuren gibt es kein Standardprotokoll und die Durchführung der einzelnen Schritte der Selektion kann stark variieren. Beispielsweise wurde innerhalb dieser Arbeit die Elution gebundener Aptamere direkt in den Puffer der anschließenden Polymerasekettenreaktion vorgenommen. Dieses Vorgehen umgeht den zeitaufwendigen Schritt der Fällung der Aptamere und ermöglicht so die Durchführung einer Selektionsrunde innerhalb eines Tages.

Ein wichtiger Faktor bei *in vitro* Selektionen von Nukleinsäuren ist die Stringenzerhöhung im Verlauf der SELEX. Sowohl bei der *Strep-Tag-II*-, als auch bei der *Spiegel-Tag*-SELEX waren Maßnahmen zur Erhöhung der Stringenz ergriffen worden. Besonders durch eine Reduktion des Zielmoleküls kann ein hoher Selektionsdruck erzeugt werden, da weniger

Moleküle um den Bindungspartner (die Aptamer-Bibliothek) konkurrieren. Dadurch kam es in beiden Fällen zu einer Anreicherung von Aptameren, die affin und spezifisch das jeweilige Zielpeptid binden.

Im Falle der Spiegel-*Tag*-SELEX betrug das Verhältnis zwischen Aptamer-Bibliothek und Spiegel-*Tag*-Peptid in den letzten Selektionsrunden 3:1, währenddessen das Verhältnis zwischen Aptamer-Bibliothek und *Strep-Tag-II*-Peptid in den letzten Selektionsrunden auf 8:1 gesteigert worden war. Die etwas geringer stringenten Konditionen im Fall der Spiegel-*Tag*-SELEX können ein Grund dafür sein, dass hier nicht alle selektierten Aptamere in der Lage waren, dass Spiegel-*Tag*-Peptid zu binden. Im Gegensatz dazu wurden bei der *Strep-Tag-II*-SELEX ausschließlich Aptamere generiert, welche affin das Zielmolekül binden.

Die angereicherte Aptamer-Bibliothek der letzten Runde der *in vitro* Selektion wurde bei beiden Selektionen direkt in einen Vektor kloniert ohne vorherige Vervielfältigung der Moleküle in einer Polymerasekettenreaktion. Dieses Vorgehen ermöglicht eine Vereinzelnung der Aptamer-Bibliothek ohne eine Verschiebung der Verhältnisse in der angereicherten Bibliothek. Wird stattdessen eine Polymerasekettenreaktion zwischengeschaltet, kann es zu einer Erhöhung derjenigen Sequenzen kommen, welche sich besonders gut amplifizieren lassen. In der Folge bietet die anschließende Sequenzanalyse nicht das Bild der tatsächlich angereicherten Bibliothek, sondern zusätzlich werden die Einflüsse durch die Amplifikation wiedergespiegelt. Durch eine unmittelbare Klonierung des Eluates der letzten Selektionsrunde kann dies jedoch ausgeschlossen werden.

## V.2 STREP-TAG-II-BINDENDE APTAMERE

Die Analyse der erhaltenen Sequenzen nach der *Strep-Tag*-SELEX zeigte, dass im Gesamten nur sieben verschiedene Sequenzen enthalten waren. Da mit 66 Klonen eine recht hohe Anzahl an Klonen bezüglich der Primärstruktur analysiert wurde, bietet diese Analyse ein gutes Bild der tatsächlichen Verhältnisse in der angereicherten Bibliothek der siebten Selektionsrunde. Die Diversität der Ausgangs-Bibliothek war somit im gesamten Verlauf der Selektion von ehemals etwa  $10^{15}$  verschiedenen Sequenzen auf eine Anzahl von sieben reduziert worden. Dies verdeutlicht besonders gut das antiproportionale Verhältnis der Anreicherung bindender Sequenzen und gleichzeitiger Abnahme der Diversität während einer idealen *in vitro* Selektion.

Für alle sieben unterschiedlichen Sequenzen konnte ein gemeinsames Motiv formuliert werden, welches in allen Sequenzen zu finden ist. Dieses besteht aus vier Bereichen mit einer Länge von drei oder vier Nukleotiden und befindet sich im Zufallsbereich der Aptamere. Das Vorhandensein eines solchen Motivs in der Gesamtheit der Sequenzen ist bereits ein erster Hinweis darauf, dass es sich hierbei um das für die Bindung verantwortliche Motiv handelt.

Ein weiterer Hinweis, dass es sich bei dem formulierten Motiv tatsächlich um das Bindungsmotiv handelt, wurde durch Verkürzungsexperimente gezeigt. Die zwei besten Binder ST-146 und ST-134 binden das Zielmolekül *Strep-Tag-II*-Peptid auch dann, wenn Sequenzen am 5'- und am 3'-Ende der Aptamere entfernt wurden. Eine Bindung konnte in beiden Fällen nur erreicht werden, wenn die konservierten Bereiche der Konsensussequenz in den Verkürzungen enthalten waren. Wurde dagegen ein Bereich des Aptamers ST-146 gewählt in dem die konservierten Bereiche nicht enthalten sind, konnte keinerlei Bindung an das Zielmolekül erhalten werden.

Für die konservierten Bereiche der Konsensussequenz wurde ein G-Quadruplexmotiv postuliert. Für das tatsächliche Vorhandensein eines solchen Motives in den *Strep-Tag*-bindenden Sequenzen sprechen verschiedene Faktoren. So enthalten ausnahmslos alle Sequenzen innerhalb der Konsensussequenz vier paarweise auftretende Guanosinnukleotide, welche von Sequenzen mit ein bis acht Nukleotiden Länge unterbrochen werden. Ausnahmslos alle *Strep-Tag*-Aptamere besitzen somit die Grundvoraussetzung für dieses bei Aptameren sehr häufig auftretende Motiv.

Des Weiteren besteht eine auffällige Ähnlichkeit des als Bindungsmotiv eingeschätzten konservierten Bereiches innerhalb der *Strep-Tag-II*-Aptamere zu dem Thrombin-Aptamer mit der Sequenz 5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3' (186). In beiden Fällen liegen die vier paarweise auftretenden Guanosinnukleotide mit kurzen T-reichen Sequenzen verbunden vor. Für das Thrombinaptamer konnte das Vorhandensein von G-Quadruplexmotiven durch die Aufklärung der Struktur mittels Röntgenstrukturanalyse und NMR-Spektroskopie erbracht werden.

Der stärkste Hinweis auf das tatsächliche Vorhandensein der G-Quadruplex-Motive bei den *Strep-Tag-II*-bindenden Aptameren ist jedoch die beim besten Binder ST-146 festgestellte Abhängigkeit der Bindung von Kaliumionen. Durch einen Entzug von Kaliumionen ist keine Bindung des Aptamers an das *Strep-Tag-II*-Peptid mehr feststellbar. Darüber hinaus konnte für die *Strep-Tag-II*-bindenden Aptamere nicht nur eine Kaliumionenabhängigkeit festgestellt werden, sondern es zeigte sich, dass auch der Entzug von Natriumionen einen negativen Einfluss auf die Bindung hat. Dieser Effekt ist jedoch sehr viel geringer, als derjenige, welcher durch die Reduktion von Kaliumionen erzielt wird. Diese Ergebnisse sind konsistent zu den in der Literatur beschriebenen Ionenabhängigkeiten von G-Quadruplexformationen (181).

Einen tatsächlichen Nachweis der G-Quadruplexmotive kann die Röntgenstrukturanalyse der Aptamere erbringen. Da für die verkürzte Version des *Strep-Tag-II*-bindenden Aptamers ST-146 Kristalle erhalten worden sind, kann durch die röntgenkristallografische Analyse dieser Kristalle in Zukunft der Beweis für das Vorhandensein des postulierten Motives erbracht werden. Darüberhinaus kann auch die Anordnung der Stränge innerhalb der

G-Quadruplexformation aufgeklärt werden und eine Einordnung des Typs vorgenommen werden.

### V.3 CHARAKTERISIERUNG DER *STREP-TAG-II*-BINDUNG DURCH ST-146

Für das Aptamer ST-146 konnte eine Dissoziationskonstante von 383 nM ermittelt werden. Der Wert der Bindungskonstante zeigt, dass auch gegen sehr kleine Peptide wie den *Strep-Tag-II* Nukleinsäureliganden mit einer Bindung im nanomolaren Bereich selektiert werden können. Da Peptide in diesen Größenordnungen zu klein sind, um eine komplexe Struktur auszubilden liegen sie in der Lösung als Mischung verschiedener Konformere mit hoher Flexibilität vor. Diese Eigenschaften machen Peptide teilweise zu schwierigen Zielmolekülen für eine *in vitro* Selektion. Röntgenstrukturanalysen von Aptameren gebunden an kleine Zielmoleküle zeigten jedoch, dass Aptamere eine Art Käfig um kleine Moleküle bilden und diese somit in einer bestimmten Struktur stabilisieren (173). Denkbar ist daher eine Stabilisierung eines Konformers des *Strep-Tag-II*-Peptides bei der Bindung durch ST-146 als Erklärung für die affine Bindung des Zielmoleküls. Bindungskonstanten in einer ähnlichen Größenordnung konnten für andere Aptamere gegen Peptide ermittelt werden (205).

Für das korrespondierende Spiegelmer ST-146 konnte eine Dissoziationskonstante von 387 nM erhalten werden. Durch die Übereinstimmung der beiden Werte für das Aptamer und das korrespondierende Spiegelmer wird hier die Grundlage der Spiegeltechnik offenbar: Die Bindung des Aptamers an das gespiegelte Zielmolekül entspricht deckungsgleich derjenigen des gespiegelten Aptamers (des Spiegelmers) an das ungespiegelte Zielmolekül.

Die Bestimmung der Bindungskonstante für die verkürzte Version ST-146-A erbrachte einen Wert der Dissoziationskonstante von 570 nM. Unter Einbeziehung des Fehlers ist dieser Wert als durchaus vergleichbar mit dem des Vollmängemoleküls ST-146 einzustufen. Eine Reduktion der Sequenz um 46 Nukleotide bewirkt keine oder nur eine geringe Verminderung der affinen Bindung. Diese Eigenschaft ist besonders bei der Anwendung des Spiegelmers von Bedeutung, da so die Kosten für die Synthese des Spiegelmers reduziert werden können.

Für die Bindung des *Strep-Tag-II*-Peptides durch ST-146 wurde eine starke Abhängigkeit vom pH-Wert ermittelt, wobei die Bindung bei sinkendem pH-Wert zunimmt. Grund für die Verschiebung des Optimums der Bindung in den sauren Bereich ist die bei niedrigeren pH-Werten zunehmende Komponente der elektrostatischen Anziehung, welche zu der Bindung zwischen Aptamer und Peptid hinzukommt. Das *Strep-tag-II*-Peptid (isoelektrischer Punkt 7,6) wird bei sinkendem pH-Wert zunehmend positiver. Die elektrostatische Anziehung beider Moleküle wird somit größer, was in einem Ansteigen der Bindung resultiert. pH-Werte größer als 8,5 resultieren in einem Verlust der Bindung, da hier die DNA stark negativ und das Peptid ebenfalls zunehmend negativ geladen vorliegen. Somit kommt es zu einer

Abstoßung beider Moleküle, was schließlich in einem Verlust der Bindung resultiert, wenn die Abstoßung zu groß wird.

Die starke Abhängigkeit der Bindung vom pH-Wert ist für die Anwendung des Spiegelmers ST-146 von großem Vorteil. Der erste Vorteil besteht in der Größe des pH-Bereiches, innerhalb dessen eine Bindung des *Strep-Tag-II* möglich ist. So kann das Spiegelmer auch bei saurem pH-Wert für eine Detektion des Zielmoleküls eingesetzt werden.

Ein weiterer Vorteil der pH-Wert-Abhängigkeit der Bindung durch ST-146 besteht in den dadurch vorhandenen Möglichkeiten einer pH-Wert-abhängigen Elution des Spiegelmers oder des gebundenen Zielmoleküls. Wird der pH-Wert in den alkalischen Bereich verschoben, kann eine Elution gebundener Moleküle erreicht werden. Hierfür sind pH-Werte größer 8,5 ausreichend, wodurch eine Elution unter milden Bedingungen möglich ist.

#### **V.4 ANWENDUNG: DETEKTION EINES *STREP-TAG-II*-FUSIONSPROTEINS DURCH DAS SPIEGELMER ST-146**

Eine Bindung des Spiegelmers ST-146 konnte sowohl für eine N- als auch für eine C-terminale Fusion des Proteins mit dem *Strep-Tag-II* festgestellt werden. Für eine Anwendung des Spiegelmers zur Detektion oder Affinitätsaufreinigung von *Strep-Tag-II*-Fusionsproteinen ist dies ein großer Vorteil, da keine Beschränkung bei der Auswahl des Terminus für eine Fusion des Affinitätspeptides besteht.

Da für beide Fusionsarten eine Bindung gezeigt werden konnte, ist festzustellen, dass die extremen N- und C-terminalen Bereiche des *Strep-Tag-II* Peptides nicht an der Bindung an das Aptamer beteiligt sein können. Innerhalb der *in vitro* Selektion des ST-146 war das Peptid am C-Terminus immobilisiert worden, daher bestand vor allem die Möglichkeit einer Einbeziehung des freien N-Terminus des Peptides in das Bindungsmotiv. Da jedoch gezeigt werden konnte, dass auch im Falle einer Verknüpfung des Peptides an den C-Terminus des zur Fusion bestimmten Proteins eine Bindung stattfindet, kann dies ausgeschlossen werden. Stattdessen findet die Bindung durch ST-146 offenbar im mittleren Bereich des Peptides *Strep-tag-II* statt.

Die Dissoziationskonstanten für das Spiegelmer gegen das N-terminal fusionierte *Strep-Tag-II*-Fusionsprotein wurden auf 223 - 604 nM bestimmt. Häufig kann bei Aptameren oder Spiegelmeren, die gegen Peptid-Epitope generiert werden, ein Verlust der Bindung festgestellt werden, wenn das Peptid nicht mehr frei, sondern als Teil eines Proteins vorliegt. Bei der Bindung des Spiegelmers ST-146 an das *Strep-Tag-II*-Fusionsprotein allerdings konnte keine derartige Reduktion der Bindungsaffinität beobachtet werden.

Mit Bindungskonstanten im dreistelligen nanomolaren Bereich erreicht das Spiegelmer ST-146 eine affine Bindung von *Strep-Tag-II*-Fusionsproteinen. Im Vergleich hierzu liegt die Bindungskonstante des *Strep-Tag-II* an sein natürliches Zielmolekül Streptavidin in einem

Bereich von  $K_d = 13 - 72 \mu\text{M}$  (159). Die Bindung durch das Spiegelmer ST-146 ist somit 35 - 195-fach höher. In der Vergangenheit wurden große Anstrengungen unternommen, um die Bindungsaffinität des *Strep-Tag-II*-Peptides an Streptavidin zu erhöhen. Als Ergebnis dieser Bemühungen wurde das Streptavidin-Derivat *Strep-Tactin* vorgestellt, welches den *Strep-Tag-II* mit einer Bindungskonstante von etwa  $1 \mu\text{M}$  bindet (153). Jedoch ist auch hier das Spiegelmer ST-146 mit einer 2,5-fach höheren Bindung überlegen.

Weiterhin konnte die affine Bindung des *Strep-Tag-II*-Fusionsproteins für einen Bereich von pH 5 - 7 gezeigt werden. Zum einen bestätigen diese Werte die Übertragung der ermittelten Bindungscharakteristika des Aptamers ST-146 auf das enantiomere Spiegelmer ST-146. Zum anderen offenbart sich auch hier die Varianz der Einsatzmöglichkeiten des Spiegelmers. Die Detektion von *Strep-Tag-II*-Fusionsproteinen ist nicht nur bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 möglich, sondern auch im sauren pH-Bereich kann das Spiegelmer eingesetzt werden. Darüber hinaus kann mit Hilfe des pH-Wertes die maximale Menge an gebundenem Fusionsprotein gesteigert werden, beziehungsweise eine milde Elution bei pH-Werten größer als pH 8,5 erreicht werden. Für eine Anwendung des Spiegelmers ST-146 zur Affinitätsaufreinigung von rekombinanten *Strep-Tag-II*-Fusionsproteinen ist eine solche Elutionsmöglichkeit von großem Wert.

Dass das Spiegelmer ST-146 auch bei der Anwesenheit großer Mengen anderer Proteine in der Lage ist *Strep-Tag-II*-Fusionsproteine affin zu binden, konnte ebenfalls gezeigt werden. Mit diesem Experiment wurde eine zukünftige Anwendung des Spiegelmers simuliert. Denkbar ist beispielsweise die Detektion von *Strep-Tag-II*-Fusionsproteinen direkt im Lysat nach einem Zellaufschluss. Durch eine geeignete Markierung des Spiegelmers durch Radioaktivität oder gekoppelte Fluoreszenzmarker wäre hierbei die sensitive Detektion aus einem Proteingemisch möglich. Somit ergeben sich unkomplizierte Detektionsmöglichkeiten, ohne eine vorherige zeitaufwendige gelelektrophoretische Auftrennung des Proteingemisches eines Zellaufschlusses.

Einer der wichtigsten Punkte für einen Einsatz des Spiegelmers ST-146 ist neben der Affinität die Spezifität der Erkennung von *Strep-Tag-II*-Fusionsproteinen. Da diese bei der Anwesenheit großer Mengen anderer Proteine stattfinden soll, muss hierbei eine unspezifische Bindung anderer Proteine ausgeschlossen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Erkennung von *Strep-Tag-II*-Fusionsproteinen bei einem physiologischen pH-Wert von pH 7,0 - 7,4 hochspezifisch erfolgt. Innerhalb dieses Bereiches wurde keine Bindung anderer Proteine durch das Spiegelmer ST-146 festgestellt. Für Proteine mit einem isoelektrischen Punkt im sauren pH-Bereich wie BSA konnte auch bei den pH-Werten 5 und 6 keine unspezifische Bindung festgestellt werden. Ein sehr leichter Anstieg der Bindung wurde für Proteine mit einem isoelektrischen Punkt im neutralen oder alkalischen Bereich detektiert, jedoch nur bei zunehmend sauren Bedingungen. Der Grund hierfür ist ebenfalls in

der zunehmenden Komponente der elektrostatischen Anziehung bei niedrigeren pH-Werten zu finden. Da das negative Rückgrat des Spiegelmers hierbei zunehmend neutralisiert wird, wird eine unspezifische Bindung an Proteine möglich, die bei höheren pH-Werten nicht binden.

In Anbetracht der einzubeziehenden Komponenten Affinität und Spezifität scheint ein pH-Wert von 6,0 ideal geeignet für eine Erkennung von *Strep-Tag-II*-Fusionsproteinen. Bei diesem pH-Wert kann sowohl eine hohe Bindung von *Strep-Tag-II*-Fusionsproteinen, als auch eine spezifische Erkennung dieser erreicht werden. Die Varianz durch die pH-Wert-Abhängigkeit kann auch hier für verschiedene Anwendungen des Spiegelmers genutzt werden. Liegt die Bedeutung der Anwendung eher darin große Mengen an *Strep-Tag-II*-Fusionsproteinen zu binden, kann ein pH-Wert kleiner als pH 7 eingesetzt werden. Richtet sich der Fokus der Anwendung dagegen stark auf eine hochspezifische Erkennung von *Strep-Tag-II*-Fusionsproteinen sollte ein pH-Wert von 7,0 - 7,4 gewählt werden.

## V.5 SPIEGEL-TAG-BINDENDE APTAMERE

Im Falle der Anreicherung Spiegel-Tag-bindender Aptamere waren ebenfalls sieben Selektionsrunden durchgeführt worden, um affine Binder anzureichern. Die Analyse der Klone nach der Spiegel-Tag-SELEX zeigte eine Reduktion der Sequenzen von etwa  $10^{15}$  verschiedenen Molekülen in der Anfangsbibliothek K2 auf 13 verschiedene Aptamersequenzen nach der letzten Runde der *in vitro* Selektion.

Durch ein erneutes Gruppieren der Sequenzen konnten keine Bereiche innerhalb der Sequenzen definiert werden, welche konserviert in allen Sequenzen vorkommen. Dies sagt jedoch nichts über das Bindungspotential der Aptamere aus. Es ist nicht ungewöhnlich für *in vitro* Selektionen, dass Gemische von Sequenzen erhalten werden, die mit völlig unterschiedlichen Bindungsmotiven das Zielmolekül binden. Grund hierfür ist, dass auch durch kleine Liganden wie Peptide in einer *in vitro* Selektion viele verschiedene Epitope für Bindungen durch Aptamere bereitgestellt werden.

Für 63 % der analysierten Aptamere konnte im Bindungstest der Klone eine Bindung an das Zielmolekül Spiegel-Tag ermittelt werden. 38 % der analysierten Aptamere dagegen banden das Zielmolekül nicht oder mit einer nicht im signifikanten Bereich liegenden Abweichung der Bindung der unangereicherten Bibliothek an das Peptid. Ein Grund hierfür könnten die etwas weniger stringenten Konditionen während der *in vitro* Selektion gewesen sein. Somit können sich auch Aptamere in der Bibliothek anreichern, welche das Zielmolekül nicht oder nur in einem sehr geringen Maße binden.

## V.6 SP-56

Das Aptamer SP-56 wurde für weitere Bestimmungen der Bindungscharakteristika und für die Synthese als Spiegelmer ausgewählt, da dieses Aptamer eine ideale Kombination aus der Sequenzlänge und der Bindungsaffinität aufwies. Die ermittelte Sekundärstruktur des SP-56 zeigte, dass dem Molekül ausgeprägte Sekundärstrukturen wie lange Haarnadeln fehlen und vergleichsweise wenige doppelsträngige Bereiche vorhanden sind. Dennoch war für dieses Aptamer eine affine Bindung des Zielmoleküls Spiegel-*Tag*-Peptid ermittelt worden. Eine Analyse der Sequenz des SP-56 hinsichtlich vorhandener potentieller G-Quadruplexmotive zeigte ein solches Motiv innerhalb des Zufallsbereiches des Aptamers. Dies könnte das Bindungsmotiv und als solches verantwortlich für die affine Bindung des Spiegel-*Tag*-Peptides sein.

Für die Bindung des Aptameres SP-56 an das D-Spiegel-*Tag*-Peptid wurde eine Dissoziationskonstante von 583 nM ermittelt. Die Bindungskonstante liegt somit in einem Bereich, welcher auch für andere Aptamer-Peptid-Wechselwirkungen beschrieben wurde. Die Bindungskonstante des korrespondierenden Spiegelmers SP-56 an das L-Spiegel-*Tag*-Peptid beträgt 512 nM. Auch hier zeigte sich, wie bereits bei Aptamer und Spiegelmer ST-146, die Übereinstimmung der Werte der Bindungskonstante für Aptamer und Spiegelmer.

Die bereits für das *Strep-Tag*-II-bindende Spiegelmer ST-146 festgestellte Abhängigkeit der Bindung vom pH-Wert wurde auch für das Spiegel-*Tag*-bindende Aptamer SP-56 festgestellt. Analog konnte auch hier ein Ansteigen der Bindung im sauren Bereich detektiert werden. Dies verdeutlicht den Einfluss der Komponente der elektrostatischen Anziehung auf die Bindung eines Aptamers an ein Peptid. Zudem eröffnet die pH-Abhängigkeit der Interaktion von SP-56 mit dem Spiegel-*Tag*-Peptid Möglichkeiten einer pH-abhängigen Elution bei dem Einsatz des Spiegelmers zur Detektion oder Aufreinigung von Spiegel-*Tag*-Fusionsproteinen.

## V.7 KRISTALLISATION UND STRUKTURAUFKLÄRUNG EINER LNA/LNA-DOPPELHELIX

Durch die Kristallisation einer LNA/LNA-Doppelhelix konnte erstmals die hochauflösende röntgenkristallografische Strukturbestimmung eine Duplex, bestehend ausschließlich aus LNA-Monomeren, durchgeführt werden. Interessanterweise wurden die Kristalle der LNA/LNA-Doppelhelix unter den selben Bedingungen erhalten, die bereits für das entsprechende RNA/RNA-Analogon in der Literatur beschrieben wurden (202).

Durch den Vergleich der Struktur der LNA-Duplex mit der analogen aus RNA-Monomeren bestehenden Duplex konnten Aussagen bezüglich der Besonderheiten der geometrischen Parameter der Helix getroffen werden. So besitzt eine LNA-Doppelhelix 14 Basenpaare pro

Windung, was im Gesamten zu einer Öffnung und gleichzeitigen Entwindung der Gestalt der Helix im Vergleich zu der korrespondierenden RNA führt.

Die verbesserte Interstrang-Basenstapelung der LNA-Doppelhelix führt zu einer Interaktion der übereinander liegenden aromatischen Ringe der Basen. Dies trägt zu einer Aufklärung der bei LNAs beobachteten Erhöhung der thermischen Stabilität gegenüber der sequenzidentischen RNA-Helix bei.

Mit der Kristallisation und Strukturaufklärung einer Doppelhelix, bestehend ausschließlich aus LNA-Monomeren, konnte zu einem detaillierteren Wissen um die strukturellen Eigenheiten dieser häufig bei siRNAs und Aptameren eingesetzten Modifikation beigetragen werden. Zudem konnte eine neue, nie zuvor beschriebene Form der Doppelhelix einer Nukleinsäure definiert werden.

## V.8 KRISTALLISATION DES *STREP-TAG-II*- BINDERS ST-146-A

Für die Verkürzung des Aptamers ST-146 wurden Kristalle gezüchtet. Da für diese Verkürzung eine Dissoziationskonstante in derselben Größenordnung wie für das Vollängemolekül ermittelt worden ist, kann zukünftig durch die röntgenkristallografische Aufklärung der Struktur dieses Moleküls das Bindungsmotiv der *Strep-Tag-II*-bindenden Nukleinsäuren dargestellt werden. Zudem könnte durch die Strukturaufklärung das postulierte G-Quadruplexmotiv nachgewiesen werden und die strukturellen Eigenschaften geklärt werden. Darüber hinaus kann der Umstand des Kristallwachstums des Moleküls ST-146-A als Hinweis auf eine molekülinterne erhöhte Stabilität, wie sie durch G-Quadruplexmotive erhalten wird, gedeutet werden.

## AUSBLICK

Mit der Entwicklung des Spiegelmers ST-146 gegen das *Strep-Tag-II*-Peptid wurde die Grundlage für ein völlig neues Affinitätssystem bestehend aus Affinitätspeptid und Spiegelmer geschaffen. Die hervorragenden Eigenschaften von Spiegelmeren, wie die hohe Stabilität in biologischen Medien bei gleichzeitiger affiner und spezifischer Bindung des Zielmoleküls, birgt die Grundlage für einen Einsatz dieses Spiegelmers für ein breites Spektrum an Anwendungen.

ST-146 kann analog zu Antikörper-basierenden Systemen zur Detektion von *Strep-Tag-II*-Fusionsproteinen eingesetzt werden. Allerdings besitzt das affine und spezifische Spiegelmer hier eindeutige Vorteile gegenüber dem Einsatz eines Antikörpers. So kann ein Fluoreszenzfarbstoff direkt innerhalb der Synthese des ST-146 in das Molekül eingebracht werden. In der Folge könnte das zeitaufwendige antikörperbasierende Detektionssystem mit erstem und zweitem Antikörper auf einen spiegelmerbasierenden Ein-Schritt-Prozess

reduziert werden. Auch eine Detektion mittels radioaktiver Messmethoden ist mit einem Spiegelmer sowohl zeit- als auch kostengünstiger zu realisieren, da das Spiegelmer innerhalb einer Kinasierungsreaktion einfach und schnell markiert werden kann. Neben dem Einsatz in *Western-Blot*-ähnlichen Verfahren könnte das Spiegelmer auch in ELISAs oder Immunopräzipitationsverfahren eingesetzt werden und hier in Konkurrenz zu verwendeten Antikörpern treten.

Neben der Detektion ist ein Einsatz des Spiegelmers ST-146 auch zur Immobilisierung von *Strep-Tag-II*-Fusionsproteinen denkbar. Auf Grund der hochaffinen Bindung des ST-146 an das *Strep-Tag-II*-Peptid könnten beispielsweise neuartige spiegelmerbasierende Sensorchips für Oberflächenplasmonenresonanz-Messungen geschaffen werden. Auch hier hätte ein spiegelmerbasierendes System verschiedene Vorteile gegenüber antikörperbasierenden Systemen. So können Spiegelmere de- und renaturiert werden, was eine komplette Rekonstitution des Sensorchips ermöglicht.

Ein weiteres Einsatzgebiet für das *Strep-Tag-II*-bindende Spiegelmer ST-146 ist die hochspezifische Affinitätsaufreinigung von *Strep-Tag-II*-Fusionsproteinen. Für besonders sensible Anwendungen, bei denen ein hoher Grad der Reinheit und Spezifität der Aufreinigung erforderlich ist, wäre eine Affinitätsmatrix bestehend aus ST-146 eine exzellente Wahl.

Für all diese Anwendungsmöglichkeiten bietet das Spiegelmer ST-146 exzellente Eigenschaften und Bindungscharakteristika. Bezüglich der Eigenschaften ist hier die außerordentliche Stabilität des Spiegelmers herauszustellen. So wäre eine Detektion oder Aufreinigung von *Strep-Tag-II*-Fusionsproteinen direkt aus einem Zellaufschluss bezüglich der Nuklease-Stabilität völlig unproblematisch.

Weiterhin können verschiedene Bindungscharakteristika des ST-146 für Anwendungen eingesetzt werden. So kann die pH-Wert-Abhängigkeit der Bindung an das *Strep-Tag-II*-Peptid einerseits zu einem Einsatz des Spiegelmers in einem ganzen Bereich des pH-Wertes von 5 - 7,5 genutzt werden. Darüber hinaus kann ein leicht alkalischer pH-Wert von 8,5 zu einer milden Elution von *Strep-Tag-II*-Fusionsproteinen eingesetzt werden. Falls keine pH-Wert-abhängige Elution genutzt werden soll, kann andererseits die Kaliumionenabhängigkeit der Bindung zu einer Elution des ST-146 eingesetzt werden. So kann durch Entzug der Kaliumionen die Bindung unterbrochen und so ebenfalls eine milde Elution des Moleküls von *Strep-Tag-II*-Fusionsproteinen ermöglicht werden.

Mittels der Strukturaufklärung des ST-146-A könnte das Bindungsmotiv der *Strep-Tag-II*-bindenden Aptamere bestätigt werden. Weiterhin könnten die strukturellen Eigenschaften des Moleküls, wie das postulierte G-Quadruplexmotiv, ermittelt und näher bestimmt werden und so zu einer Vermehrung des Wissens um diese Strukturen beitragen. Auch eine Kokristallisation des ST-146-A mit dem *Strep-Tag-II*-Peptid oder einem *Strep-Tag-II*-

Fusionsprotein wäre von großem Nutzen, um die strukturellen und Bindungseigenschaften des Moleküls zu evaluieren.

Darüber hinaus könnten durch eine Kristallisation des korrespondierenden Spiegelmers ST-146-A Rückschlüsse auf das Kristallwachstum einer enantiomeren Nukleinsäure gezogen werden. Eine Strukturaufklärung des Aptamers und des korrespondierenden Spiegelmers würde zudem einen großen Zuwachs an Wissen um die strukturellen Eigenschaften und der Fragestellung um Unterschiede der Enantiomere bezüglich Ionenbindungsstellen oder Hydratationsmustern erbringen.

Mit dem Spiegel-Tag wurde ein völlig neues Affinitätspeptid für rekombinante Fusionsproteine vorgestellt. Für das neue Affinitätspeptid wurde das Spiegelmer SP-56 entwickelt, welches den Spiegel-Tag hochaffin bindet. Dieses Affinitätssystem kann für Anwendungen analog zu denen für das Spiegelmer ST-146 beschriebenen eingesetzt werden.

## ZUSAMMENFASSUNG

---

Protein-Affinitäts-*Tags* sind Peptidsequenzen, welche zur Detektion und Affinitätsaufreinigung von rekombinant hergestellten Proteinen eingesetzt werden. Das Oktapeptid *Strep-Tag-II* gehört zu den meist verwendeten kurzen Affinitäts-*Tags*. Eine hochaffine und hochspezifische Erkennung ist zur Detektion und Aufreinigung von *Strep-Tag-II*-Fusionsproteinen unerlässlich.

Spiegelmer sind enantiomere Aptamere, welche durch die Anwendung der Spiegeltechnik auf die *in vitro* Selektion von Nukleinsäuren gewonnen werden. Die so erhaltenen L-Nukleinsäuren sind durch ihren Aufbau aus L-Monomeren hochgradig stabil und besitzen dennoch die Eigenschaften von Aptameren: die hochaffine und -spezifische Bindung des Zielmoleküls.

Innerhalb dieser Arbeit wurden erstmals Spiegelmer gegen das *Strep-Tag-II*-Affinitätspeptid entwickelt. Diese können zur affinen und spezifischen Detektion, Immobilisierung und Affinitätsaufreinigung von *Strep-Tag-II*-Fusionsproteinen eingesetzt werden.

Innerhalb von sieben Selektionsrunden der *in vitro* Selektion wurden aus einer kombinatorischen DNA-Bibliothek mit etwa  $10^{15}$  verschiedenen Molekülen sieben verschiedene Aptamere isoliert, welche alle affin das D-*Strep-Tag-II*-Peptid binden. Für die konservierten Bereiche der Aptamere wurde eine G-Quadruplexstruktur postuliert, was mit der ermittelten Abhängigkeit der Bindung von Kalium- und Natriumionen kohärent ist.

Das Aptamer und das korrespondierende Spiegelmer ST-146 binden das D- bzw. L-*Strep-Tag-II*-Peptid mit einer Dissoziationskonstante von 370 nM. Die Bindungskonstante einer auf 43 Nukleotide verkürzten Version des ST-146 liegt in derselben Größenordnung. Die für dieses Molekül erhaltenen Kristalle können zu einer röntgenkristallografischen Strukturaufklärung des *Strep-Tag-II*-Binders führen.

Das Spiegelmer ST-146 wurde sowohl zur N-, als auch zur C-terminalen Detektion eines *Strep-Tag-II*-Fusionsproteins eingesetzt. Die affine und spezifische Erkennung von *Strep-Tag-II*-Fusionsproteinen durch das Spiegelmer ( $K_d = 220 - 600$  nM) ist stark vom pH-Wert abhängig, wobei ein pH-Bereich von 5 - 7,5 ideal für die Bindung ist. Darüber hinaus konnte die Erkennung von *Strep-Tag-II*-Fusionsproteinen aus einem Gemisch von Proteinen gezeigt werden.

Analog zu ST-146 wurde ein Spiegelmer gegen einen neuen Affinitäts-*Tag*, den *in silico* generierten Spiegel-*Tag* entwickelt. Die Aminosäuresequenz dieses neuen Affinitäts-*Tags* ist GSHKRNQTIEGR. Das Spiegelmer SP-56 bindet den Spiegel-*Tag* affin mit einer Dissoziationskonstante von 550 nM. Auch für die Interaktion des SP-56 mit dem Spiegel-*Tag* wurde eine starke Abhängigkeit vom pH-Wert ermittelt.

*Locked Nucleic Acids* (LNAs) sind Nukleinsäureanalogons, welche häufig zur Stabilisierung von siRNAs und Aptameren eingesetzt werden. Im zweiten Teil der Arbeit wurde erstmals eine komplett aus LNA-Monomeren aufgebaute Doppelhelix kristallisiert und röntgenkristallografisch vermessen. Die Struktur der ersten LNA/LNA-Doppelhelix vervollständigt das Wissen um die strukturellen und molekularen Eigenschaften dieser Nukleinsäureklasse.

## SUMMARY

---

Protein affinity tags are peptide sequences, which are used for the detection and affinity purification of recombinant proteins. The octapeptide *Strep*-Tag-II is among the most commonly used short affinity tags. A sensitive and high specific recognition of *Strep*-Tag-II fusion proteins is essential for the detection and purification of these proteins.

Spiegelmers are enantiomeric aptamers, which are generated by applying the mirror-image technology to the *in vitro* selection of nucleic acids. These L-nucleic acids are highly stable by means of being composed of L-monomers that are not susceptible to degradation by nucleases. However, they exhibit the qualities of aptamers: binding to the target with high affinity and high specificity.

In this work for the first time, Spiegelmers against the affinity tag *Strep*-tag-II were developed. They can be used for affinity and high specificity detection, immobilization and affinity purification of *Strep*-tag-II fusion proteins.

Seven different aptamers were isolated by *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment* (SELEX) from a random DNA library of approximately  $10^{15}$  different types of molecules. Each of them binds to the target molecule D-*Strep*-tag-II peptide. A G-quadruplex structure is postulated for the conserved sequences of the aptamers. This is coherent with the observed dependence of the binding-affinity on potassium and sodium ions.

The aptamer and the corresponding Spiegelmer ST-146 bind with a binding constant of 370 nM to the D- and L-*Strep*-tag-II peptide, respectively. A binding constant in the same magnitude was obtained for the binding of a truncated 43 nucleotides version of ST-146. The crystals obtained for this molecule might lead to the X-ray crystallographic structure determination of the *Strep*-tag-II binder.

The Spiegelmer ST-146 was employed for the detection of fusion proteins with N- and C-terminal *Strep*-tag-II, respectively. The specific recognition of *Strep*-tag-II fusion proteins by ST-146 ( $K_d = 220 - 600$  nM) strongly depends on pH whereas values from pH 5 to 7.5 are ideal. Furthermore, ST-146 was shown to detect *Strep*-Tag-II fusion proteins from a protein mixture.

Similar to ST-146, a Spiegelmer against a new affinity tag, the *in silico* derived 'Spiegel-Tag', was developed. The amino acid sequence of the new tag is GSHKRNQTIEGR. Spiegelmer SP-56 binds the 'Spiegel-Tag' with a binding constant of 550 nM. A strong dependence on pH was detected for the interaction of SP-56 with the Spiegel-Tag as well.

Locked Nucleic Acids (LNAs) are modified nucleic acids, which are commonly used for protecting siRNAs and aptamers from degradation. In the second part of this work, for the first time, a double helix consisting exclusively of LNA monomers was crystallized and analyzed by X-ray crystallography. The structure of the first LNA/LNA duplex completes the knowledge of the structural and molecular properties of this class of nucleic acids.

## REFERENZEN

---

1. Guerrier-Takada,C., Gardiner,K., Marsh,T., Pace,N. and Altman,S. (1983) The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*, **35**, 849-857.
2. Kruger,K., Grabowski,P.J., Zaug,A.J., Sands,J., Gottschling,D.E. and Cech,T.R. (1982) Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell*, **31**, 147-157.
3. Strobel,S.A. and Cochrane,J.C. (2007) RNA catalysis: ribozymes, ribosomes, and riboswitches. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **11**, 636-643.
4. Werner,A., Carlile,M. and Swan,D. (2009) What do natural antisense transcripts regulate? *RNA. Biol.*, **6**, 43-48.
5. Lee,R.C., Feinbaum,R.L. and Ambros,V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, **75**, 843-854.
6. Chekulaeva,M. and Filipowicz,W. (2009) Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **21**, 452-460.
7. Tiemann,K. and Rossi,J.J. (2009) RNAi-based therapeutics-current status, challenges and prospects. *EMBO Mol. Med.*, **1**, 142-151.
8. Martinez,J., Patkaniowska,A., Urlaub,H., Luhrmann,R. and Tuschl,T. (2002) Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*, **110**, 563-574.
9. Bennett,C.F. and Swayze,E.E. (2010) RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **50**, 259-293.
10. Stahel,R.A. and Zangemeister-Wittke,U. (2003) Antisense oligonucleotides for cancer therapy-an overview. *Lung Cancer*, **41 Suppl 1**, S81-S88.
11. Juliano,R., Alam,M.R., Dixit,V. and Kang,H. (2008) Mechanisms and strategies for effective delivery of antisense and siRNA oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.*, **36**, 4158-4171.
12. Wang,S.L., Yao,H.H. and Qin,Z.H. (2009) Strategies for short hairpin RNA delivery in cancer gene therapy. *Expert. Opin. Biol. Ther.*, **9**, 1357-1368.
13. Ellington,A.D. and Szostak,J.W. (1990) In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, **346**, 818-822.
14. Tuerk,C. and Gold,L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, **249**, 505-510.
15. Breaker,R.R. (1997) DNA aptamers and DNA enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1**, 26-31.
16. Chastain,M. and Tinoco,I., Jr. (1991) Structural elements in RNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **41**, 131-177.

17. Famulok, M. (1999) Oligonucleotide aptamers that recognize small molecules. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **9**, 324-329.
18. Stoltenburg, R., Reinemann, C. and Strehlitz, B. (2007) SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol. Eng*, **24**, 381-403.
19. Patel, D.J. (1997) Structural analysis of nucleic acid aptamers. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1**, 32-46.
20. Patel, D.J., Suri, A.K., Jiang, F., Jiang, L., Fan, P., Kumar, R.A. and Nonin, S. (1997) Structure, recognition and adaptive binding in RNA aptamer complexes. *J. Mol. Biol.*, **272**, 645-664.
21. Robertson, D.L. and Joyce, G.F. (1990) Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature*, **344**, 467-468.
22. Brody, E.N. and Gold, L. (2000) Aptamers as therapeutic and diagnostic agents. *J. Biotechnol.*, **74**, 5-13.
23. Gold, L., Polisky, B., Uhlenbeck, O. and Yarus, M. (1995) Diversity of oligonucleotide functions. *Annu. Rev. Biochem.*, **64**, 763-797.
24. Joyce, G.F. (1994) In vitro evolution of nucleic acids. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **4**, 331-336.
25. Goring, H.U., Homann, M. and Lörger, M. (2003) In vitro selection of high-affinity nucleic acid ligands to parasite target molecules. *Int. J. Parasitol.*, **33**, 1309-1317.
26. Tahiri-Alaoui, A., Frigotto, L., Manville, N., Ibrahim, J., Romby, P. and James, W. (2002) High affinity nucleic acid aptamers for streptavidin incorporated into bi-specific capture ligands. *Nucleic Acids Res.*, **30**, e45.
27. Murphy, M.B., Fuller, S.T., Richardson, P.M. and Doyle, S.A. (2003) An improved method for the in vitro evolution of aptamers and applications in protein detection and purification. *Nucleic Acids Res.*, **31**, e110.
28. Bruno, J.G. and Kiel, J.L. (2002) Use of magnetic beads in selection and detection of biotoxin aptamers by electrochemiluminescence and enzymatic methods. *Biotechniques*, **32**, 178-3.
29. Liu, J. and Stormo, G.D. (2005) Combining SELEX with quantitative assays to rapidly obtain accurate models of protein-DNA interactions. *Nucleic Acids Res.*, **33**, e141.
30. Tombelli, S., Minunni, M., Luzi, E. and Mascini, M. (2005) Aptamer-based biosensors for the detection of HIV-1 Tat protein. *Bioelectrochemistry*, **67**, 135-141.
31. Tok, J.B., Cho, J. and Rando, R.R. (2000) RNA aptamers that specifically bind to a 16S ribosomal RNA decoding region construct. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 2902-2910.
32. Holeman, L.A., Robinson, S.L., Szostak, J.W. and Wilson, C. (1998) Isolation and characterization of fluorophore-binding RNA aptamers. *Fold. Des*, **3**, 423-431.
33. Vo, N.V., Oh, J.W. and Lai, M.M. (2003) Identification of RNA ligands that bind hepatitis C virus polymerase selectively and inhibit its RNA synthesis from the natural viral RNA templates. *Virology*, **307**, 301-316.

## REFERENZEN

---

34. Bianchini,M., Radrizzani,M., Brocardo,M.G., Reyes,G.B., Gonzalez,S.C. and Santa-Coloma,T.A. (2001) Specific oligobodies against ERK-2 that recognize both the native and the denatured state of the protein. *J. Immunol. Methods*, **252**, 191-197.
35. Schneider,D., Gold,L. and Platt,T. (1993) Selective enrichment of RNA species for tight binding to Escherichia coli rho factor. *FASEB J.*, **7**, 201-207.
36. Mendonsa,S.D. and Bowser,M.T. (2004) In vitro selection of high-affinity DNA ligands for human IgE using capillary electrophoresis. *Anal. Chem.*, **76**, 5387-5392.
37. Mendonsa,S.D. and Bowser,M.T. (2005) In vitro selection of aptamers with affinity for neuropeptide Y using capillary electrophoresis. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 9382-9383.
38. Tsai,R.Y. and Reed,R.R. (1998) Identification of DNA recognition sequences and protein interaction domains of the multiple-Zn-finger protein Roaz. *Mol. Cell Biol.*, **18**, 6447-6456.
39. Davis,K.A., Abrams,B., Lin,Y. and Jayasena,S.D. (1996) Use of a high affinity DNA ligand in flow cytometry. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 702-706.
40. Yang,X., Li,X., Prow,T.W., Reece,L.M., Bassett,S.E., Luxon,B.A., Herzog,N.K., Aronson,J., Shope,R.E., Leary,J.F. *et al.* (2003) Immunofluorescence assay and flow-cytometry selection of bead-bound aptamers. *Nucleic Acids Res.*, **31**, e54.
41. Misono,T.S. and Kumar,P.K. (2005) Selection of RNA aptamers against human influenza virus hemagglutinin using surface plasmon resonance. *Anal. Biochem.*, **342**, 312-317.
42. Rhie,A., Kirby,L., Sayer,N., Wellesley,R., Disterer,P., Sylvester,I., Gill,A., Hope,J., James,W. and Tahiri-Alaoui,A. (2003) Characterization of 2'-fluoro-RNA aptamers that bind preferentially to disease-associated conformations of prion protein and inhibit conversion. *J. Biol. Chem.*, **278**, 39697-39705.
43. Bruno,J.G. (1997) In vitro selection of DNA to chloroaromatics using magnetic microbead-based affinity separation and fluorescence detection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **234**, 117-120.
44. Missailidis,S., Thomaidou,D., Borbas,K.E. and Price,M.R. (2005) Selection of aptamers with high affinity and high specificity against C595, an anti-MUC1 IgG3 monoclonal antibody, for antibody targeting. *J. Immunol. Methods*, **296**, 45-62.
45. Theis,M.G., Knorre,A., Kellersch,B., Moelleken,J., Wieland,F., Kolanus,W. and Famulok,M. (2004) Discriminatory aptamer reveals serum response element transcription regulated by cytohesin-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 11221-11226.
46. Weiss,S., Proske,D., Neumann,M., Groschup,M.H., Kretzschmar,H.A., Famulok,M. and Winnacker,E.L. (1997) RNA aptamers specifically interact with the prion protein PrP. *J. Virol.*, **71**, 8790-8797.
47. Gyllensten,U.B. and Erlich,H.A. (1988) Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **85**, 7652-7656.
48. Schneider,D.J., Feigon,J., Hostomsky,Z. and Gold,L. (1995) High-affinity ssDNA inhibitors of the reverse transcriptase of type 1 human immunodeficiency virus. *Biochemistry*, **34**, 9599-9610.

## REFERENZEN

---

49. Williams,K.P. and Bartel,D.P. (1995) PCR product with strands of unequal length. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 4220-4221.
50. Jones,L.A., Clancy,L.E., Rawlinson,W.D. and White,P.A. (2006) High-affinity aptamers to subtype 3a hepatitis C virus polymerase display genotypic specificity. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **50**, 3019-3027.
51. Little,J.W. (1967) An exonuclease induced by bacteriophage lambda. II. Nature of the enzymatic reaction. *J. Biol. Chem.*, **242**, 679-686.
52. Thomas,K.R. and Olivera,B.M. (1978) Processivity of DNA exonucleases. *J. Biol. Chem.*, **253**, 424-429.
53. Djordjevic,M. (2007) SELEX experiments: new prospects, applications and data analysis in inferring regulatory pathways. *Biomol. Eng*, **24**, 179-189.
54. Jayasena,S.D. (1999) Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin. Chem.*, **45**, 1628-1650.
55. Beinoraviciute-Kellner,R., Lipps,G. and Krauss,G. (2005) In vitro selection of DNA binding sites for ABF1 protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, **579**, 4535-4540.
56. Shi,H., Fan,X., Ni,Z. and Lis,J.T. (2002) Evolutionary dynamics and population control during in vitro selection and amplification with multiple targets. *RNA.*, **8**, 1461-1470.
57. Stoltenburg,R., Reinemann,C. and Strehlitz,B. (2005) FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection. *Anal. Bioanal. Chem.*, **383**, 83-91.
58. Jenison,R.D., Gill,S.C., Pardi,A. and Polisky,B. (1994) High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science*, **263**, 1425-1429.
59. Win,M.N., Klein,J.S. and Smolke,C.D. (2006) Codeine-binding RNA aptamers and rapid determination of their binding constants using a direct coupling surface plasmon resonance assay. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 5670-5682.
60. Haller,A.A. and Sarnow,P. (1997) In vitro selection of a 7-methyl-guanosine binding RNA that inhibits translation of capped mRNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 8521-8526.
61. Sassanfar,M. and Szostak,J.W. (1993) An RNA motif that binds ATP. *Nature*, **364**, 550-553.
62. Mannironi,C., Di,N.A., Fruscoloni,P. and Tocchini-Valentini,G.P. (1997) In vitro selection of dopamine RNA ligands. *Biochemistry*, **36**, 9726-9734.
63. (2002) Preclinical and phase 1A clinical evaluation of an anti-VEGF pegylated aptamer (EYE001) for the treatment of exudative age-related macular degeneration. *Retina*, **22**, 143-152.
64. Baldrich,E., Restrepo,A. and O'Sullivan,C.K. (2004) Aptasensor development: elucidation of critical parameters for optimal aptamer performance. *Anal. Chem.*, **76**, 7053-7063.
65. Rajendran,M. and Ellington,A.D. (2008) Selection of fluorescent aptamer beacons that light up in the presence of zinc. *Anal. Bioanal. Chem.*, **390**, 1067-1075.

## REFERENZEN

---

66. Grate,D. and Wilson,C. (1999) Laser-mediated, site-specific inactivation of RNA transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **96**, 6131-6136.
67. Geiger,A., Burgstaller,P., von der,E.H., Roeder,A. and Famulok,M. (1996) RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 1029-1036.
68. Wallace,S.T. and Schroeder,R. (1998) In vitro selection and characterization of streptomycin-binding RNAs: recognition discrimination between antibiotics. *RNA.*, **4**, 112-123.
69. Williams,K.P., Liu,X.H., Schumacher,T.N., Lin,H.Y., Ausiello,D.A., Kim,P.S. and Bartel,D.P. (1997) Bioactive and nuclease-resistant L-DNA ligand of vasopressin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **94**, 11285-11290.
70. Nieuwlandt,D., Wecker,M. and Gold,L. (1995) In vitro selection of RNA ligands to substance P. *Biochemistry*, **34**, 5651-5659.
71. Lorsch,J.R. and Szostak,J.W. (1994) In vitro selection of RNA aptamers specific for cyanocobalamin. *Biochemistry*, **33**, 973-982.
72. Watrin,M., Von,P.F., Dausse,E., Schroeder,R. and Toulme,J.J. (2009) In vitro selection of RNA aptamers derived from a genomic human library against the TAR RNA element of HIV-1. *Biochemistry*, **48**, 6278-6284.
73. Kensch,O., Connolly,B.A., Steinhoff,H.J., McGregor,A., Goody,R.S. and Restle,T. (2000) HIV-1 reverse transcriptase-pseudoknot RNA aptamer interaction has a binding affinity in the low picomolar range coupled with high specificity. *J. Biol. Chem.*, **275**, 18271-18278.
74. Green,L.S., Jellinek,D., Jenison,R., Ostman,A., Heldin,C.H. and Janjic,N. (1996) Inhibitory DNA ligands to platelet-derived growth factor B-chain. *Biochemistry*, **35**, 14413-14424.
75. Wiegand,T.W., Williams,P.B., Dreskin,S.C., Jouvin,M.H., Kinet,J.P. and Tasset,D. (1996) High-affinity oligonucleotide ligands to human IgE inhibit binding to Fc epsilon receptor I. *J. Immunol.*, **157**, 221-230.
76. Pan,W., Craven,R.C., Qiu,Q., Wilson,C.B., Wills,J.W., Golovine,S. and Wang,J.F. (1995) Isolation of virus-neutralizing RNAs from a large pool of random sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **92**, 11509-11513.
77. Morris,K.N., Jensen,K.B., Julin,C.M., Weil,M. and Gold,L. (1998) High affinity ligands from in vitro selection: complex targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **95**, 2902-2907.
78. Ringquist,S., Jones,T., Snyder,E.E., Gibson,T., Boni,I. and Gold,L. (1995) High-affinity RNA ligands to Escherichia coli ribosomes and ribosomal protein S1: comparison of natural and unnatural binding sites. *Biochemistry*, **34**, 3640-3648.
79. Daniels,D.A., Chen,H., Hicke,B.J., Swiderek,K.M. and Gold,L. (2003) A tenascin-C aptamer identified by tumor cell SELEX: systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **100**, 15416-15421.
80. Mayer,G., Raddatz,M.S., Grunwald,J.D. and Famulok,M. (2007) RNA ligands that distinguish metabolite-induced conformations in the TPP riboswitch. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, **46**, 557-560.

## REFERENZEN

---

81. Famulok,M. and Mayer,G. (2005) Intramers and aptamers: applications in protein-function analyses and potential for drug screening. *Chembiochem.*, **6**, 19-26.
82. Wilson,D.S. and Szostak,J.W. (1999) In vitro selection of functional nucleic acids. *Annu. Rev. Biochem.*, **68**, 611-647.
83. Maberley,D. (2005) Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *Issues Emerg. Health Technol.*, 1-4.
84. Chapman,J.A. and Beckey,C. (2006) Pegaptanib: a novel approach to ocular neovascularization. *Ann. Pharmacother.*, **40**, 1322-1326.
85. Ruckman,J., Green,L.S., Beeson,J., Waugh,S., Gillette,W.L., Henninger,D.D., Claesson-Welsh,L. and Janjic,N. (1998) 2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165). Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain. *J. Biol. Chem.*, **273**, 20556-20567.
86. (2003) Anti-vascular endothelial growth factor therapy for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: phase II study results. *Ophthalmology*, **110**, 979-986.
87. Cunningham,E.T., Jr., Adamis,A.P., Altaweel,M., Aiello,L.P., Bressler,N.M., D'Amico,D.J., Goldbaum,M., Guyer,D.R., Katz,B., Patel,M. *et al.* (2005) A phase II randomized double-masked trial of pegaptanib, an anti-vascular endothelial growth factor aptamer, for diabetic macular edema. *Ophthalmology*, **112**, 1747-1757.
88. Siddiqui,M.A. and Keating,G.M. (2005) Pegaptanib: in exudative age-related macular degeneration. *Drugs*, **65**, 1571-1577.
89. Ng,E.W. and Adamis,A.P. (2006) Anti-VEGF aptamer (pegaptanib) therapy for ocular vascular diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1082**, 151-171.
90. Ng,E.W., Shima,D.T., Calias,P., Cunningham,E.T., Jr., Guyer,D.R. and Adamis,A.P. (2006) Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **5**, 123-132.
91. Ng,E.W. and Adamis,A.P. (2005) Targeting angiogenesis, the underlying disorder in neovascular age-related macular degeneration. *Can. J. Ophthalmol.*, **40**, 352-368.
92. Nimjee,S.M., Rusconi,C.P., Harrington,R.A. and Sullenger,B.A. (2005) The potential of aptamers as anticoagulants. *Trends Cardiovasc. Med.*, **15**, 41-45.
93. Dyke,C.K., Steinhubl,S.R., Kleiman,N.S., Cannon,R.O., Aberle,L.G., Lin,M., Myles,S.K., Melloni,C., Harrington,R.A., Alexander,J.H. *et al.* (2006) First-in-human experience of an antidote-controlled anticoagulant using RNA aptamer technology: a phase 1a pharmacodynamic evaluation of a drug-antidote pair for the controlled regulation of factor IXa activity. *Circulation*, **114**, 2490-2497.
94. Sayer,N., Ibrahim,J., Turner,K., Tahiri-Alaoui,A. and James,W. (2002) Structural characterization of a 2'F-RNA aptamer that binds a HIV-1 SU glycoprotein, gp120. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **293**, 924-931.
95. Collett,J.R., Cho,E.J. and Ellington,A.D. (2005) Production and processing of aptamer microarrays. *Methods*, **37**, 4-15.

## REFERENZEN

---

96. Collett, J.R., Cho, E.J., Lee, J.F., Levy, M., Hood, A.J., Wan, C. and Ellington, A.D. (2005) Functional RNA microarrays for high-throughput screening of antiprotein aptamers. *Anal. Biochem.*, **338**, 113-123.
97. Ehrentreich-Forster, E., Orgel, D., Krause-Griep, A., Cech, B., Erdmann, V.A., Bier, F., Scheller, F.W. and Rimmel, M. (2008) Biosensor-based on-site explosives detection using aptamers as recognition elements. *Anal. Bioanal. Chem.*, **391**, 1793-1800.
98. Clark, S.L. and Remcho, V.T. (2002) Aptamers as analytical reagents. *Electrophoresis*, **23**, 1335-1340.
99. Drolet, D.W., Moon-McDermott, L. and Romig, T.S. (1996) An enzyme-linked oligonucleotide assay. *Nat. Biotechnol.*, **14**, 1021-1025.
100. Ferreira, C.S., Papamichael, K., Guilbault, G., Schwarzacher, T., Gariépy, J. and Missailidis, S. (2008) DNA aptamers against the MUC1 tumour marker: design of aptamer-antibody sandwich ELISA for the early diagnosis of epithelial tumours. *Anal. Bioanal. Chem.*, **390**, 1039-1050.
101. Deng, Q., German, I., Buchanan, D. and Kennedy, R.T. (2001) Retention and separation of adenosine and analogues by affinity chromatography with an aptamer stationary phase. *Anal. Chem.*, **73**, 5415-5421.
102. German, I., Buchanan, D.D. and Kennedy, R.T. (1998) Aptamers as ligands in affinity probe capillary electrophoresis. *Anal. Chem.*, **70**, 4540-4545.
103. Davis, K.A., Lin, Y., Abrams, B. and Jayasena, S.D. (1998) Staining of cell surface human CD4 with 2'-F-pyrimidine-containing RNA aptamers for flow cytometry. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 3915-3924.
104. Ravelet, C., Grosset, C. and Peyrin, E. (2006) Liquid chromatography, electrochromatography and capillary electrophoresis applications of DNA and RNA aptamers. *J. Chromatogr. A*, **1117**, 1-10.
105. Mairal, T., Ozalp, V.C., Lozano, S.P., Mir, M., Katakis, I. and O'Sullivan, C.K. (2008) Aptamers: molecular tools for analytical applications. *Anal. Bioanal. Chem.*, **390**, 989-1007.
106. Kusser, W. (2000) Chemically modified nucleic acid aptamers for in vitro selections: evolving evolution. *J. Biotechnol.*, **74**, 27-38.
107. James, W. (2001) Nucleic acid and polypeptide aptamers: a powerful approach to ligand discovery. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **1**, 540-546.
108. Bunka, D.H. and Stockley, P.G. (2006) Aptamers come of age - at last. *Nat. Rev. Microbiol.*, **4**, 588-596.
109. Green, L.S., Jellinek, D., Bell, C., Beebe, L.A., Feistner, B.D., Gill, S.C., Jucker, F.M. and Janjic, N. (1995) Nuclease-resistant nucleic acid ligands to vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Chem. Biol.*, **2**, 683-695.
110. Eaton, B.E. and Pieken, W.A. (1995) Ribonucleosides and RNA. *Annu. Rev. Biochem.*, **64**, 837-863.

111. King,D.J., Bassett,S.E., Li,X., Fennewald,S.A., Herzog,N.K., Luxon,B.A., Shope,R. and Gorenstein,D.G. (2002) Combinatorial selection and binding of phosphorothioate aptamers targeting human NF-kappa B RelA(p65) and p50. *Biochemistry*, **41**, 9696-9706.
112. Keefe,A.D. and Cload,S.T. (2008) SELEX with modified nucleotides. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **12**, 448-456.
113. Dougan,H., Lyster,D.M., Vo,C.V., Stafford,A., Weitz,J.I. and Hobbs,J.B. (2000) Extending the lifetime of anticoagulant oligodeoxynucleotide aptamers in blood. *Nucl. Med. Biol.*, **27**, 289-297.
114. Marro,M.L., Daniels,D.A., McNamee,A., Andrew,D.P., Chapman,T.D., Jiang,M.S., Wu,Z., Smith,J.L., Patel,K.K. and Gearing,K.L. (2005) Identification of potent and selective RNA antagonists of the IFN-gamma-inducible CXCL10 chemokine. *Biochemistry*, **44**, 8449-8460.
115. Schmidt,K.S., Borkowski,S., Kurreck,J., Stephens,A.W., Bald,R., Hecht,M., Friebe,M., Dinkelborg,L. and Erdmann,V.A. (2004) Application of locked nucleic acids to improve aptamer in vivo stability and targeting function. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 5757-5765.
116. Darfeuille,F., Reigadas,S., Hansen,J.B., Orum,H., Di,P.C. and Toulme,J.J. (2006) Aptamers targeted to an RNA hairpin show improved specificity compared to that of complementary oligonucleotides. *Biochemistry*, **45**, 12076-12082.
117. Klussmann,S., Nolte,A., Bald,R., Erdmann,V.A. and Furste,J.P. (1996) Mirror-image RNA that binds D-adenosine. *Nat. Biotechnol.*, **14**, 1112-1115.
118. Nolte,A., Klussmann,S., Bald,R., Erdmann,V.A. and Furste,J.P. (1996) Mirror-design of L-oligonucleotide ligands binding to L-arginine. *Nat. Biotechnol.*, **14**, 1116-1119.
119. Schumacher,T.N., Mayr,L.M., Minor,D.L., Jr., Milhollen,M.A., Burgess,M.W. and Kim,P.S. (1996) Identification of D-peptide ligands through mirror-image phage display. *Science*, **271**, 1854-1857.
120. Brunner,H. (1999) *Rechts oder links in der Natur und anderswo*. Wiley-VCH, Weinheim.
121. Cotter,P.D., O'Connor,P.M., Draper,L.A., Lawton,E.M., Deegan,L.H., Hill,C. and Ross,R.P. (2005) Posttranslational conversion of L-serines to D-alanines is vital for optimal production and activity of the lantibiotic lactacin 3147. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **102**, 18584-18589.
122. Heck,S.D., Siok,C.J., Krapcho,K.J., Kelbaugh,P.R., Thadeio,P.F., Welch,M.J., Williams,R.D., Ganong,A.H., Kelly,M.E., Lanzetti,A.J. *et al.* (1994) Functional consequences of posttranslational isomerization of Ser46 in a calcium channel toxin. *Science*, **266**, 1065-1068.
123. Leva,S., Lichte,A., Burmeister,J., Muhn,P., Jahnke,B., Fesser,D., Erfurth,J., Burgstaller,P. and Klussmann,S. (2002) GnRH binding RNA and DNA Spiegelmers: a novel approach toward GnRH antagonism. *Chem. Biol.*, **9**, 351-359.
124. Purschke,W.G., Eulberg,D., Buchner,K., Vonhoff,S. and Klussmann,S. (2006) An L-RNA-based aquaretic agent that inhibits vasopressin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **103**, 5173-5178.

## REFERENZEN

---

125. Wlotzka,B., Leva,S., Eschgfaller,B., Burmeister,J., Kleinjung,F., Kaduk,C., Muhn,P., Hess-Stumpp,H. and Klussmann,S. (2002) In vivo properties of an anti-GnRH Spiegelmer: an example of an oligonucleotide-based therapeutic substance class. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 8898-8902.
126. Purschke,W.G., Radtke,F., Kleinjung,F. and Klussmann,S. (2003) A DNA Spiegelmer to staphylococcal enterotoxin B. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 3027-3032.
127. Denekas,T., Troltsch,M., Vater,A., Klussmann,S. and Messlinger,K. (2006) Inhibition of stimulated meningeal blood flow by a calcitonin gene-related peptide binding mirror-image RNA oligonucleotide. *Br. J. Pharmacol.*, **148**, 536-543.
128. Vater,A., Jarosch,F., Buchner,K. and Klussmann,S. (2003) Short bioactive Spiegelmers to migraine-associated calcitonin gene-related peptide rapidly identified by a novel approach: tailored-SELEX. *Nucleic Acids Res.*, **31**, e130.
129. Faulhammer,D., Eschgfaller,B., Stark,S., Burgstaller,P., Englberger,W., Erfurth,J., Kleinjung,F., Rupp,J., Dan,V.S., Schroder,W. *et al.* (2004) Biostable aptamers with antagonistic properties to the neuropeptide nociceptin/orphanin FQ. *RNA.*, **10**, 516-527.
130. Helmling,S., Jarosch,F. and Klussmann,S. (2006) The promise of ghrelin antagonism in obesity treatment. *Drug News Perspect.*, **19**, 13-20.
131. Jarosch,F., Buchner,K. and Klussmann,S. (2006) In vitro selection using a dual RNA library that allows primerless selection. *Nucleic Acids Res.*, **34**, e86.
132. Kobelt,P., Helmling,S., Stengel,A., Wlotzka,B., Andresen,V., Klapp,B.F., Wiedenmann,B., Klussmann,S. and Monnikes,H. (2006) Anti-ghrelin Spiegelmer NOX-B11 inhibits neurostimulatory and orexigenic effects of peripheral ghrelin in rats. *Gut*, **55**, 788-792.
133. Shearman,L.P., Wang,S.P., Helmling,S., Stribling,D.S., Mazur,P., Ge,L., Wang,L., Klussmann,S., Macintyre,D.E., Howard,A.D. *et al.* (2006) Ghrelin neutralization by a ribonucleic acid-SPM ameliorates obesity in diet-induced obese mice. *Endocrinology*, **147**, 1517-1526.
134. Eulberg,D., Buchner,K., Maasch,C. and Klussmann,S. (2005) Development of an automated in vitro selection protocol to obtain RNA-based aptamers: identification of a biostable substance P antagonist. *Nucleic Acids Res.*, **33**, e45.
135. Sayyed,S.G., Gaikwad,A.B., Lichtnekert,J., Kulkarni,O., Eulberg,D., Klussmann,S., Tikoo,K. and Anders,H.J. (2010) Progressive glomerulosclerosis in type 2 diabetes is associated with renal histone H3K9 and H3K23 acetylation, H3K4 dimethylation and phosphorylation at serine 10. *Nephrol. Dial. Transplant.*, **25**, 1811-1817.
136. Clauss,S., Gross,O., Kulkarni,O., vila-Ferrufino,A., Radomska,E., Segerer,S., Eulberg,D., Klussmann,S. and Anders,H.J. (2009) Ccl2/Mcp-1 blockade reduces glomerular and interstitial macrophages but does not ameliorate renal pathology in collagen4A3-deficient mice with autosomal recessive Alport nephropathy. *J. Pathol.*, **218**, 40-47.
137. Kulkarni,O., Eulberg,D., Selve,N., Zollner,S., Allam,R., Pawar,R.D., Pfeiffer,S., Segerer,S., Klussmann,S. and Anders,H.J. (2009) Anti-Ccl2 Spiegelmer permits 75% dose reduction of cyclophosphamide to control diffuse proliferative lupus nephritis and pneumonitis in MRL-Fas(lpr) mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **328**, 371-377.

## REFERENZEN

---

138. Ninichuk,V., Clauss,S., Kulkarni,O., Schmid,H., Segerer,S., Radomska,E., Eulberg,D., Buchner,K., Selve,N., Klussmann,S. *et al.* (2008) Late onset of Ccl2 blockade with the Spiegelmer mNOX-E36-3'PEG prevents glomerulosclerosis and improves glomerular filtration rate in db/db mice. *Am. J. Pathol.*, **172**, 628-637.
139. Kulkarni,O., Pawar,R.D., Purschke,W., Eulberg,D., Selve,N., Buchner,K., Ninichuk,V., Segerer,S., Vielhauer,V., Klussmann,S. *et al.* (2007) Spiegelmer inhibition of CCL2/MCP-1 ameliorates lupus nephritis in MRL-(Fas)lpr mice. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **18**, 2350-2358.
140. Sayyed,S.G., Hagele,H., Kulkarni,O.P., Endlich,K., Segerer,S., Eulberg,D., Klussmann,S. and Anders,H.J. (2009) Podocytes produce homeostatic chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12, which contributes to glomerulosclerosis, podocyte loss and albuminuria in a mouse model of type 2 diabetes. *Diabetologia*, **52**, 2445-2454.
141. Arnau,J., Lauritzen,C., Petersen,G.E. and Pedersen,J. (2006) Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expr. Purif.*, **48**, 1-13.
142. Korf,U., Kohl,T., van der,Z.H., Zahn,R., Schleegeer,S., Ueberle,B., Wandschneider,S., Bechtel,S., Schnolzer,M., Otteleben,H. *et al.* (2005) Large-scale protein expression for proteome research. *Proteomics.*, **5**, 3571-3580.
143. Baneyx,F. and Mujacic,M. (2004) Recombinant protein folding and misfolding in Escherichia coli. *Nat. Biotechnol.*, **22**, 1399-1408.
144. Mujacic,M., Cooper,K.W. and Baneyx,F. (1999) Cold-inducible cloning vectors for low-temperature protein expression in Escherichia coli: application to the production of a toxic and proteolytically sensitive fusion protein. *Gene*, **238**, 325-332.
145. Borsig,L., Berger,E.G. and Malissard,M. (1997) Expression and purification of His-tagged beta-1,4-galactosyltransferase in yeast and in COS cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **240**, 586-589.
146. Malissard,M., Borsig,L., Di,M.S., Grutter,M.G., Kragl,U., Wandrey,C. and Berger,E.G. (1996) Recombinant soluble beta-1,4-galactosyltransferases expressed in Saccharomyces cerevisiae. Purification, characterization and comparison with human enzyme. *Eur. J. Biochem.*, **239**, 340-348.
147. Kost,T.A., Condreay,J.P. and Jarvis,D.L. (2005) Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat. Biotechnol.*, **23**, 567-575.
148. Tsai,S.F., Martin,D.I., Zon,L.I., D'Andrea,A.D., Wong,G.G. and Orkin,S.H. (1989) Cloning of cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells. *Nature*, **339**, 446-451.
149. Hochuli,E., Dobeli,H. and Schacher,A. (1987) New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J. Chromatogr.*, **411**, 177-184.
150. Hefti,M.H., Van Vugt-Van der Toorn CJ, Dixon,R. and Vervoort,J. (2001) A novel purification method for histidine-tagged proteins containing a thrombin cleavage site. *Anal. Biochem.*, **295**, 180-185.

## REFERENZEN

---

151. Chaga,G., Hopp,J. and Nelson,P. (1999) Immobilized metal ion affinity chromatography on Co<sup>2+</sup>-carboxymethylaspartate-agarose Superflow, as demonstrated by one-step purification of lactate dehydrogenase from chicken breast muscle. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **29 ( Pt 1)**, 19-24.
152. Schmidt,T.G., Koepke,J., Frank,R. and Skerra,A. (1996) Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *J. Mol. Biol.*, **255**, 753-766.
153. Voss,S. and Skerra,A. (1997) Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng.*, **10**, 975-982.
154. Lamla,T. and Erdmann,V.A. (2003) Searching sequence space for high-affinity binding peptides using ribosome display. *J. Mol. Biol.*, **329**, 381-388.
155. Lamla,T. and Erdmann,V.A. (2004) The Nano-tag, a streptavidin-binding peptide for the purification and detection of recombinant proteins. *Protein Expr. Purif.*, **33**, 39-47.
156. Keefe,A.D., Wilson,D.S., Seelig,B. and Szostak,J.W. (2001) One-step purification of recombinant proteins using a nanomolar-affinity streptavidin-binding peptide, the SBP-Tag. *Protein Expr. Purif.*, **23**, 440-446.
157. Smith,D.B. and Johnson,K.S. (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, **67**, 31-40.
158. di,G.C., Li,P., Riggs,P.D. and Inouye,H. (1988) Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene*, **67**, 21-30.
159. Einhauer,A. and Jungbauer,A. (2001) The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **49**, 455-465.
160. Einhauer,A. and Jungbauer,A. (2001) Affinity of the monoclonal antibody M1 directed against the FLAG peptide. *J. Chromatogr. A*, **921**, 25-30.
161. Kipriyanov,S.M., Kupriyanova,O.A., Little,M. and Moldenhauer,G. (1996) Rapid detection of recombinant antibody fragments directed against cell-surface antigens by flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, **196**, 51-62.
162. Porath,J., Carlsson,J., Olsson,I. and Belfrage,G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, **258**, 598-599.
163. Porath,J. (1992) Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expr. Purif.*, **3**, 263-281.
164. Hochuli,E., Gillissen,D. and Kocher,H.P. (1987) Specificity of the immunoabsorbent used for large-scale recovery of interferon alpha-2a. *J. Chromatogr.*, **411**, 371-378.
165. Tsuji,S., Tanaka,T., Hirabayashi,N., Kato,S., Akitomi,J., Egashira,H., Waga,I. and Ohtsu,T. (2009) RNA aptamer binding to polyhistidine-tag. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **386**, 227-231.
166. Schmidt,T.G. and Skerra,A. (1993) The random peptide library-assisted engineering of a C-terminal affinity peptide, useful for the detection and purification of a functional Ig Fv fragment. *Protein Eng.*, **6**, 109-122.

## REFERENZEN

---

167. Wilson,D.S., Keefe,A.D. and Szostak,J.W. (2001) The use of mRNA display to select high-affinity protein-binding peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **98**, 3750-3755.
168. Maroux,S., Baratti,J. and Desnuelle,P. (1971) Purification and specificity of porcine enterokinase. *J. Biol. Chem.*, **246**, 5031-5039.
169. Lu,K., Miyazaki,Y. and Summers,M.F. (2010) Isotope labeling strategies for NMR studies of RNA. *J. Biomol. NMR*, **46**, 113-125.
170. Mooers,B.H. (2009) Crystallographic studies of DNA and RNA. *Methods*, **47**, 168-176.
171. Seela,F. (2008) Nucleic Acids from A to Z: A Concise Encyclopedia. Edited by Sabine Müller. *Chem. Eur. J. of Chem. Bio.*, **9**, 3088.
172. Long,S.B., Long,M.B., White,R.R. and Sullenger,B.A. (2008) Crystal structure of an RNA aptamer bound to thrombin. *RNA*, **14**, 2504-2512.
173. Tereshko,V., Skripkin,E. and Patel,D.J. (2003) Encapsulating streptomycin within a small 40-mer RNA. *Chem. Biol.*, **10**, 175-187.
174. Ghosh,G., Huang,D.B. and Huxford,T. (2004) Molecular mimicry of the NF-kappaB DNA target site by a selected RNA aptamer. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **14**, 21-27.
175. Cox,J.C., Hayhurst,A., Hesselberth,J., Bayer,T.S., Georgiou,G. and Ellington,A.D. (2002) Automated selection of aptamers against protein targets translated in vitro: from gene to aptamer. *Nucleic Acids Res.*, **30**, e108.
176. Padmanabhan,K., Padmanabhan,K.P., Ferrara,J.D., Sadler,J.E. and Tulinsky,A. (1993) The structure of alpha-thrombin inhibited by a 15-mer single-stranded DNA aptamer. *J. Biol. Chem.*, **268**, 17651-17654.
177. Padmanabhan,K. and Tulinsky,A. (1996) An ambiguous structure of a DNA 15-mer thrombin complex. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **52**, 272-282.
178. van,M.T. and Dingley,A.J. (2005) Characterization of the monovalent ion position and hydrogen-bond network in guanine quartets by DFT calculations of NMR parameters. *Chemistry*, **11**, 6064-6079.
179. Dingley,A.J., Peterson,R.D., Grzesiek,S. and Feigon,J. (2005) Characterization of the cation and temperature dependence of DNA quadruplex hydrogen bond properties using high-resolution NMR. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 14466-14472.
180. Burge,S., Parkinson,G.N., Hazel,P., Todd,A.K. and Neidle,S. (2006) Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 5402-5415.
181. Guedin,A., Alberti,P. and Mergny,J.L. (2009) Stability of intramolecular quadruplexes: sequence effects in the central loop. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 5559-5567.
182. Lane,A.N., Chaires,J.B., Gray,R.D. and Trent,J.O. (2008) Stability and kinetics of G-quadruplex structures. *Nucleic Acids Res.*, **36**, 5482-5515.
183. Gatto,B., Palumbo,M. and Sissi,C. (2009) Nucleic acid aptamers based on the G-quadruplex structure: therapeutic and diagnostic potential. *Curr. Med. Chem.*, **16**, 1248-1265.

## REFERENZEN

---

184. Chou,S.H., Chin,K.H. and Wang,A.H. (2005) DNA aptamers as potential anti-HIV agents. *Trends Biochem. Sci.*, **30**, 231-234.
185. Lee,K.Y., Kang,H., Ryu,S.H., Lee,D.S., Lee,J.H. and Kim,S. (2010) Bioimaging of nucleolin aptamer-containing 5-(N-benzylcarboxyamide)-2'-deoxyuridine more capable of specific binding to targets in cancer cells. *J. Biomed. Biotechnol.*, **2010**, 168306.
186. Macaya,R.F., Schultze,P., Smith,F.W., Roe,J.A. and Feigon,J. (1993) Thrombin-binding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 3745-3749.
187. Wang,K.Y., McCurdy,S., Shea,R.G., Swaminathan,S. and Bolton,P.H. (1993) A DNA aptamer which binds to and inhibits thrombin exhibits a new structural motif for DNA. *Biochemistry*, **32**, 1899-1904.
188. Schultze,P., Macaya,R.F. and Feigon,J. (1994) Three-dimensional solution structure of the thrombin-binding DNA aptamer d(GGTTGGTGTGGTTGG). *J. Mol. Biol.*, **235**, 1532-1547.
189. Petersen,M. and Wengel,J. (2003) LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. *Trends Biotechnol.*, **21**, 74-81.
190. Petersen,M., Nielsen,C.B., Nielsen,K.E., Jensen,G.A., Bondensgaard,K., Singh,S.K., Rajwanshi,V.K., Koshkin,A.A., Dahl,B.M., Wengel,J. *et al.* (2000) The conformations of locked nucleic acids (LNA). *J. Mol. Recognit.*, **13**, 44-53.
191. Elmen,J., Thonberg,H., Ljungberg,K., Frieden,M., Westergaard,M., Xu,Y., Wahren,B., Liang,Z., Orum,H., Koch,T. *et al.* (2005) Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 439-447.
192. Nielsen,K.E., Rasmussen,J., Kumar,R., Wengel,J., Jacobsen,J.P. and Petersen,M. (2004) NMR studies of fully modified locked nucleic acid (LNA) hybrids: solution structure of an LNA:RNA hybrid and characterization of an LNA:DNA hybrid. *Bioconjug. Chem.*, **15**, 449-457.
193. Petersen,M., Bondensgaard,K., Wengel,J. and Jacobsen,J.P. (2002) Locked nucleic acid (LNA) recognition of RNA: NMR solution structures of LNA:RNA hybrids. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 5974-5982.
194. Vester,B. and Wengel,J. (2004) LNA (locked nucleic acid): high-affinity targeting of complementary RNA and DNA. *Biochemistry*, **43**, 13233-13241.
195. Jhaveri,S., Rajendran,M. and Ellington,A.D. (2000) In vitro selection of signaling aptamers. *Nat. Biotechnol.*, **18**, 1293-1297.
196. Otwinowski,Z. and Minor,W. (1997) Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. *Methods in Enzymology*, **276**, 307-326.
197. Viswanathan,V.K., Krcmarik,K. and Cianciotto,N.P. (1999) Template secondary structure promotes polymerase jumping during PCR amplification. *Biotechniques*, **27**, 508-511.
198. Zuker,M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 3406-3415.

## REFERENZEN

---

199. SantaLucia, J., Jr. (1998) A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 1460-1465.
200. Guedin, A., Alberti, P. and Mergny, J.L. (2009) Stability of intramolecular quadruplexes: sequence effects in the central loop. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 5559-5567.
201. Musheev, M.U. and Krylov, S.N. (2006) Selection of aptamers by systematic evolution of ligands by exponential enrichment: addressing the polymerase chain reaction issue. *Anal. Chim. Acta*, **564**, 91-96.
202. Eichert, A., Furste, J.P., Schreiber, A., Perbandt, M., Betzel, C., Erdmann, V.A. and Forster, C. (2009) The 1.2 Å crystal structure of an *E. coli* tRNA<sup>(Ser)</sup> acceptor stem microhelix reveals two magnesium binding sites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **386**, 368-373.
203. Eichert, A., Behling, K., Betzel, C., Erdmann, V.A., Furste, J.P. and Forster, C. (2010) The crystal structure of an 'All Locked' nucleic acid duplex. *Nucleic Acids Res.*
204. Mayer, G. (2009) The chemical biology of aptamers. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, **48**, 2672-2689.
205. Leva, S., Lichte, A., Burmeister, J., Muhn, P., Jahnke, B., Fesser, D., Erfurth, J., Burgstaller, P. and Klussmann, S. (2002) GnRH binding RNA and DNA Spiegelmers: a novel approach toward GnRH antagonism. *Chem. Biol.*, **9**, 351-359.

## EIGENE PUBLIKATIONEN

---

### Publikationen

Behling,K., Eichert,A., Fürste,J.P., Betzel,C., Erdmann,V.A. and Förster,C. (2009) Crystallization and X-ray diffraction analysis of an 'all-locked' nucleic acid duplex derived from a tRNA<sup>Ser</sup> microhelix. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 65, 809-812.

Eichert,A., Behling,K., Betzel,C., Erdmann,V.A., Fürste,J.P. and Förster,C. (2010) The crystal structure of an 'All Locked' nucleic acid duplex. *Nucleic Acids Res.*, 38, 6729-6736.

Behling K. and Erdmann V.A.

*In vitro* Selection of Spiegelmers against Affinity tags.

*Manuskript in Vorbereitung*

### Patent

„Spiegelmere zur Detektion, Affinitätsaufreinigung und Immobilisierung von Protein-Affinitäts-Tags“

*in Vorbereitung*

### Poster

Katja Behling and Volker A. Erdmann. *In vitro* Selection of DNA Aptamers against Immunoglobulines., 13th Annual Meeting of the RNA Society., 28. Juli - 03. August, 2008, Berlin, Germany

Katja Behling and Volker A. Erdmann. *In vitro* Selection of Nucleic Acids against IgGs. Tag der Chemie and Innovationskongress Chemie und Biotechnologie, 23 -24. April, 2008, Berlin, Germany

## DANKSAGUNG

---

Zuallererst danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Volker A. Erdmann für die Betreuung meiner Arbeit und seine Unterstützung. Sein Optimismus und sein Vertrauen haben mich immer aufgebaut und ermutigt an den Erfolg zu glauben.

Für die Erstellung des Zweitgutachtens möchte ich mich bei Prof. Dr. Burghardt Wittig bedanken.

Ich danke all denjenigen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der AG Erdmann, die für eine positive, angenehme und fruchtbare Arbeitsatmosphäre gesorgt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frank Kuppler. Er war mir während meiner Promotion eine große Stütze, ein guter Helfer, ein lustiger Zimmergenosse, ein guter Freund.

Ebenfalls möchte ich mich bei Dr. Andreas Zerressen-Harte für die unzähligen *in vitro* Selektionsgespräche, netten Kaffeepausen und ein letztes Lesen des Manuskriptes bedanken.

Dr. Charlotte Förster danke ich für die fruchtbare Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Kristallisation.

Dr. Werner Schröder danke ich für die HPLC-Messungen und für viele nette Gespräche. Ich weiß nicht, ob ich mit meiner Arbeit so weit gekommen wäre, wenn wir nicht über die Immobilisierung der Peptide geplaudert hätten.

Weiterhin möchte ich mich bei all meinen Arbeitsstudentinnen und -studenten bedanken. Ich wünsche ihnen viel Erfolg bei ihren weiteren Wegen.

Dr. Stefan Jehle danke ich für alles, was er für mich getan hat. Außerdem danke ich ihm für das mehrfache Lesen des Manuskriptes.

André Eichert danke ich für seine Geduld, seine Unterstützung und die vielen anregenden Gespräche. Ebenfalls danke ich ihm für das Lesen des Manuskriptes.

Zuletzt, aber am allermeisten, danke ich meinen Eltern. Ihre Unterstützung ist grenzenlos, sie sind immer für mich da und sie sind für mich mein Zuhause, wie ich mir kein besseres wünschen könnte. Durch ihre Unterstützung und ihren Glauben an mich haben auch sie Anteil an dieser Arbeit.

## LEBENS LAUF

---

**Dieser Abschnitt wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen in der Online-Version entfernt.**

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

A	Ampere
A <sub>260</sub>	Lichtabsorption bei 260 nm
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bq	Becquerel
bp	Basenpaare
c	Konzentration
C <sub>m</sub>	Massenkonzentration
C <sub>n</sub>	Stoffmengenkonzentration
CMA	Cobalt-Carboxymethylaspartat
cpm	(engl.) <i>counts per minute</i> , Zählrate
Cu	Curie
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDA	Ethylendiamin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTPs	Desoxyribonukleinsäuretriphosphat
dpm	(engl.) <i>decay per minute</i>
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ΔG	Freie Energie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	(engl.) <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FABP	(engl.) <i>Fatty Acid Binding Protein</i>
FDA	(engl.) <i>Food and Drug Administration</i>
g	Gramm
x g	Gravitation
°C	Grad Celsius
h	Stunde
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPLC	(engl.) <i>high performance liquid chromatography</i>
IMAC	(engl.) <i>immobilized metal-affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
K	Kelvin
k <sub>a</sub>	Geschwindigkeitskonstante der Assoziation
k <sub>d</sub>	Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation
K <sub>a</sub>	Assoziationskonstante
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
l	Liter
LB	Luria Bertani
LNA	(engl.) <i>Locked Nucleic Acid</i>
Lsg	Lösung
m	Meter
M	Molekulargewicht
MALDI TOF	(engl.) <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight</i>
min	Minute
MPD	2-Methyl-2,4-Pentandiol
NMR	(engl.) <i>Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy</i>
nt	Nukleotide

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

NTA	Nitriloessigsäure
<sup>32</sup> P	Phosphorisotop
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	(engl.) <i>Phosphate buffered Saline</i>
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	(lat.) <i>pondus Hydrogenii</i>
%	Prozent
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale RNA
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SELEX	(engl.) Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment
TAE	TrisAcetat/EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borat/EDTA
TEMED	,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
V	Volt
W	Watt
U	(engl.) <i>Unit</i>
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen,
w/v	Gewicht pro Volumen,
ZA	Zählausbeute

## Abkürzungen für Nukleotide

Desoxyadenosin (A)  
Desoxycytidin (C)  
Desoxyguanosin (G)  
Desoxythymidin (T)

## Abkürzungen für Aminosäuren

Alanin (Ala, A)	Glycin (Gly, G)	Prolin (Pro, P)
Arginin (Arg, R)	Histidin (His, H)	Serin (Ser, S)
Asparagin (Asn, N)	Isoleucin (Ile, I)	Threonin (Thr, T)
Asparaginsäure (Asp, D)	Leucin (Leu, L)	Tryptophan (Trp, W)
Cystein (Cys, C)	Lysin (Lys, K)	Tyrosin (Tyr, Y)
Glutamin (Gln, Q)	Methionin (Met, M)	Valin (Val, V)
Glutaminsäure (Glu, E)	Phenylalanin (Phe, F)	

Präfixe für Einheiten: f, Femto ( $10^{-15}$ ); p, Pico ( $10^{-12}$ ); n, Nano ( $10^{-9}$ );  $\mu$ , Mikro ( $10^{-6}$ ); m, Milli ( $10^{-3}$ ); k, Kilo ( $10^3$ )

Weiterhin wurden allgemein übliche Abkürzungen verwendet.

# ANHANG

---

## 1 Geräte

Autoklav 400EP-Z	Varioklav
Elektrophorese-Netzgerät	Pharmacia
Feinwaage AC 88	Mettler
Geldokumentationsanlage	Peqlab
Inkubator	Heraeus
Kühlzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus
Magnetrührer	Biorad
Mikroskop CH-2	Olympus
Ölpumpe Typ 10004 A C	Alcatel
PCR Thermocycler	Biometra
pH-Meter	Shimadzu
Phospho-Scanner Storm 840	Molecular Dynamics
Pipetten	Gilson
Reinstwasseranlage	Millipore
Rotations-Vakuum-Konzentrator	Savant
Schüttler G76	New Brunswick Scientific
Spektralfotometer UV-1202	Shimadzu
Szintillationszähler LS 6000 SC	Beckmann
Thermoschüttler Comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge Capsule	Tomy
Transilluminator Reprostar II	Camag
Ultraschallgerät	Bioblock Scientific
Ultratoraxgerät	Janke und Kunkel KG
Ultrazentrifuge CS-150 GX	Beckman
Ultrazentrifuge L8-55M	Beckman
Vortexgerät Vortex Genie 2	Bender und Hobein AG
Wasserbad	GFL
Zentrifuge Biofuge A	Heraeus
Zentrifuge Biofuge 13	Heraeus

## 2 Chemikalien und Lösungen

Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth
APS	Carl Roth
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-ATP (3000 Ci/mmol, 9,25 MBq)	Hartmann
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck
Biotin	Carl Roth
Bradford-Reagenz Roti-Nanoquant	Carl Roth
Bradford-Reagenz Roti-Quant	Carl Roth
Bromphenolblau	Carl Roth
BSA	Sigma
Chloroform-Isoamylalkohol	Carl Roth
Coomassie Serva Blue R	Serva
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-dCTP (3000 Ci/mmol, 9,25 MBq)	Hartmann
dNTPs 10 mM Roti Mix 3	Carl Roth
EDTA	Carl Roth
Entwicklerlösung	Fujifilm
Essigsäure	Carl Roth

Ethanol 100 %	Carl Roth
Ethidiumbromid (1 %ige Lsg.)	Carl Roth
Fixierlösung	Fujifilm
Glycerol	Carl Roth
Glycin	Carl Roth
Glycogen 20 mg/ml	Fermentas
Harnstoff	Carl Roth
Harnstoff Ultra Qualität	Carl Roth
HCl	Carl Roth
Hefeextrakt	Gibco BRL
IPTG	Carl Roth
Isopropanol	Carl Roth
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
Kaliumhydroxid	Merck
KCl	Merck
LB-Agar	LAB M
Methanol	Carl Roth
MgCl <sub>2</sub>	Carl Roth
MgCl <sub>2</sub> 25 mM-Lsg.	Ampliqon
MgCl <sub>2</sub> 50 mM-Lsg.	New England Biolabs
MPD	Fluka
Natriumacetat	Carl Roth
Natriumcacodylat	Fluka
NaCl	Riedel de Haën
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck
NaOH	Merck
NTC-Puffer	Macherey-Nagel
Pepton Nr. 140	Gibco BRL
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth
Rotiphorese Gel 40 (Acrylamid/Bisacrylamid (19:1))	Carl Roth
Rotiphorese Gel 30 (Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1))	Carl Roth
SDS	Serva
TEMED	Carl Roth
Thrombin	Sigma
Tris	Carl Roth
Tween 20	Carl Roth
Xylencyanol	Carl Roth

### 3 Enzyme

<i>Taq</i> -Polymerase	Ampliqon
<i>Phusion</i> -Polymerase	New England Biolabs
λ-Exonuklease	Fermentas
T4-Polynukleotid-Kinase	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase	Promega
Benzoenase Nuklease	Merck
Lysozym	Sigma

### 4 Zellen und Plasmide

pGEM-T-Vektor	Promega
<i>E.coli</i> XL1-Blue <i>Supercompetent Cells</i>	Stratagene

## 5 Puffer und Lösungen

### Coomassie-Färbelösung für SDS-Gele

20 % (v/v) Ethanol  
10 % (v/v) Essigsäure  
16 Tabletten ServaBlueR / l

### 2 x denaturierender DNA-Probenpuffer

8 M Harnstoff  
1 x TBE  
0,05 % (w/v) Xylencyanol  
0,05 % (w/v)  
Bromphenolblau

### 6 x DNA-Probenpuffer für Agarosegele

10 mM Tris, pH 7,6  
0.15% (w/v) Orange G  
0.03% (w/v) Xylencyanol  
60% Glycerol  
60 mM EDTA

### Elutionspuffer NPTB

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8,0  
300 mM NaCl  
10 mM Biotin  
0,05 % (v/v) Tween 20

### Entfärbelösung für SDS-Gele

20 % (v/v) Ethanol  
10 % (v/v) Essigsäure

### 10 x λ-Exonuklease-Puffer

670 mM Glycin-KOH, pH 9,4  
25 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,1% (v/v) Triton X-100

### LB-Agar

LB-Medium  
15 g/l (w/v) Agar

### LB-Medium

0,5 % (w/v) Hefeextrakt  
1 % Pepton Nr. 40  
1,0 % NaCl  
pH 7,0 mit NaOH-Plätzchen  
1 / 600 ml

### Lyse-Puffer NP

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8,0  
300 mM NaCl

### 2 x nativer DNA-Probenpuffer

1 x TBE  
0,05 % (w/v) Xylencyanol  
0,05 % (w/v)  
Bromphenolblau

### NE-Puffer

5 mM Tris, pH 8,5

### PBS-Puffer

8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4  
1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
140 mM NaCl  
2,7 mM KCl

### PBS-M

PBS, pH 7,4  
1 mM MgCl<sub>2</sub>

### PBS-M-Puffer pH 5

PBS, pH 5  
1 mM MgCl<sub>2</sub>

### PBS-M-Puffer pH 6

PBS, pH 6  
1 mM MgCl<sub>2</sub>

### PBS-M-Puffer pH 7

PBS, pH 7  
1 mM MgCl<sub>2</sub>

### PBS-MT

PBS, pH 7,4  
1 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,05 % (v/v) Tween 20

### PBS-T

PBS, pH 7,4  
0,05 % (v/v) Tween 20

### 4 x Probenpuffer für SDS-Gele

0,2 M Tris, pH 6,8  
8 % (w/v) SDS  
40 % (w/v) Glycerin  
0,4 % (w/v) Bromphenolblau  
4 % (v/v) β-Mercaptoethanol

### 5 x SDS-Laufpuffer

125 mM Tris, pH 8,3  
1,25 M Glycin  
0,5 % (w/v) SDS

### 10 x TAE Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer)

0,4 M Tris, pH 8,3  
0,2 M Acetat  
10 mM EDTA

### 10 x Taq-Polymerase PCR-Puffer

100 mM Tris, pH 8,3  
500 mM KCl

### 10 x TBE Puffer

1,0 M Tris, pH 8,3  
1,0 M Borat  
20 mM EDTA

### 2 x T4 Ligations-Puffer

60 mM Tris, pH 7,8  
20 mM MgCl<sub>2</sub>  
20 mM Dithiothreitol  
2 mM ATP  
10 % (w/v) PEG

### Tris-Puffer pH 7,4

100 mM Tris, pH 7,4

### Tris-Puffer mit KCl

100 mM Tris, pH 7,4  
140 mM NaCl

### Tris-Puffer mit NaCl

100mM Tris, pH 7,4  
140 mM NaCl

### 10 x T4-Polynukleotid-Kinase-Puffer

700 mM Tris, pH 7,6  
100 mM MgCl<sub>2</sub>  
50 mM Dithiothreitol

### Waschpuffer NPT

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8,0  
300 mM NaCl  
0,05 % (v/v) Tween 20

## 6 Größenstandards

O'GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder	Fermentas
O'GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder	Fermentas
GeneRuler 50 bp DNA Ladder	Fermentas
Hyperladder I	Bioline
Proteinleiter Roti-Mark 10-150 Plus	Carl Roth

## 7 Synthetische Oligonukleotide

### D-Nukleinsäuren

Alle D-Nukleinsäuren wurden von der IBA GmbH (Göttingen) bezogen.

### DNA-Bibliothek K2

5'-GGG AAT TCG AGC TCG GTA CC-(N)<sub>60</sub>-C TGC AGG CAT GCA AGC TTG G-3'

### Forward Primer K2

5'-GGG AAT TCG AGC TCG GTA CC

### Reverse Primer K2

5'-CCA AGC TTG CAT GCC TGC AG-3'

### P-Reverse Primer K2

5' - P-CCA AGC TTG CAT GCC TGC AG-3'

[P] = Phosphorylrest am 5'-Ende

### Reverse Hexathylenglycol-Primer K2

5' – (T)<sub>20</sub> – X - CCA AGC TTG CAT GCC TGC AG-3'

[T<sub>20</sub>] = 20 x Thymin

X = Hexaethylenglykol-Modifikation

### Aptamer ST-146

5'-GGG AAT TCG AGC TCG GTA CCT CCG GAG GAT TCT GGT CGG TGT TTG GGG  
CAG GAG GTA CTT TCC CAG GCA CTG CAG GCA TGC AAG CTT GG-3'

### Aptamer ST-146-A

5'-GTA CCT CCG GAG GAT TCT GGT CGG TGT TTG GGG CAG GAG GTA C-3'

### Aptamer ST-146-B

5'-CCAGGCACTGCAGGCATGCAAGCTTGG-3'

### Aptamer ST-134-A

5'-CCT GGG GGC ACG GAT TGG CGA TTG GGT CAT GGT GTG GTT GGT AGT GCC  
TGC AGG-3'

### Aptamer SP-56

5'-GGG AAT TCG AGC TCG GTA CCC TAG TCC GGT GTG GGC TGG CGA TTG AGG  
CTC ACC TTT TTT CCT CTC TGT GTC TGC AGG CAT GCA AGC TTG G-3'

## L-Nukleinsäuren

L-Nukleinsäuren wurden von ChemGenes (Wilmington, USA) bezogen.

### Spiegelmer ST-146

5'-GGG AAT TCG AGC TCG GTA CCT CCG GAG GAT TCT GGT CGG TGT TTG GGG  
CAG GAG GTA CTT TCC CAG GCA CTG CAG GCA TGC AAG CTT GG-3'

### Spiegelmer SP-56

5'-GGG AAT TCG AGC TCG GTA CCC TAG TCC GGT GTG GGC TGG CGA TTG AGG  
CTC ACC TTT TTT CCT CTC TGT GTC TGC AGG CAT GCA AGC TTG G-3'

## LNAs

LNA-Moleküle wurden von der IBA GmbH (Göttingen) bezogen.

### LNA 1

5'-(GGT GAG G)<sup>L</sup>-3'

### LNA 2

5'-(CCT CAC C)<sup>L</sup>-3'

## **8 Peptide**

Die D-Peptide wurden von Inbiolabs (Riga) und die L-Peptide von Biosyntan (Berlin) bezogen.

### D-Peptide

#### D-Strep-Tag-II-Peptid

NH<sub>2</sub>-WSHPQFEK-EDA-Biotin

EDA = -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-

#### D-Spiegel-Tag-Peptid

NH<sub>2</sub>- GSHKRNQTIEGR-EDA-Biotin

EDA = -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-

### L-Peptide

#### D-Strep-Tag-II-Peptid

NH<sub>2</sub>-WSHPQFEK-EDA-Biotin

EDA = -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-

#### D-Spiegel-Tag-Peptid

NH<sub>2</sub>- GSHKRNQTIEGR-EDA-Biotin

EDA = -NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-

9 Proteine

**Strep-Tag-II-FABP (Vektor pXSII)**

```

1   atgtggagccacccgcagttcgaaaaaagcgctgaaaacctgtat
46  ttccagggcggtggacgccttcgtgggtacctggaagttagtggac
91  agcaagaatttcgatgactacatgaagtcactcgggtgctcggtttt
136 gctaccaggcaggtgggcaatatgaccaagcctaccacaatcatc
181 gaagtgaatggggacacagtcataataaaacacaaagcaccttc
226 aagaacacagagatcagcttcaagctgggagtcgagttcgatgag
271 accacagcagatgacaggaaagtcagtcocatcgtagcgtggat
316 ggcggcaaaccttgccacgtgcagaagtggaaatggacaagagaca
361 tcacttgtgctgggagatgggtgacgggaaactcattctgacactc
406 acccacggcactgcagtttgcactcgtacttacgagaaacaggca
451 taa
    
```

```

1   M W S H P Q F E K S A E N L Y
16  F Q G V D A F V G T W K L V D
31  S K N F D D Y M K S L G V G F
46  A T R Q V G N M T K P T T I I
61  E V N G D T V I I K T Q S T F
76  K N T E I S F K L G V E F D E
91  T T A D D R K V K S I V T L D
106 G G K L V H V Q K W N G Q E T
121 S L V R E M V D G K L I L T L
136 T H G T A V C T R T Y E K Q A
150 *
    
```

ENLYFQG = TEV-Schnittstelle  
 WSHPQFEK = Strep-Tag-II

**FABP-Strep-Tag-II (Vektor pHMFA-SII)**

```

1   atggtggacgccttcgtgggtacctggaagttagtggac
40  agcaagaatttcgatgactacatgaagtcactcgggtgctc
79  ggttttctaccaggcaggtgggcaatatgaccaagcct
118 accacaatcatcgaagtgaatggggacacagtcatacata
157 aaaacacaaagcaccttcaagaacacagagatcagcttc
196 aagctgggagtcgagttcgatgagaccacagcagatgac
235 aggaaagtcagtcocatcgtagcgtggatggcggcaaaa
274 cttgtccacgtgcagaagtggaaatggacaagagacatca
312 cttgtgctgggagatgggtgacgggaaactcattctgaca
351 ctcacccacggcactgcagtttgcactcgtacttacgag
389 aaacaggcatggagccacccgcagttcgaaaaataa
    
```

```

1   M V D A F V G T W K L V D S K
16  N F D D Y M K S L G V G F A T
31  R Q V G N M T K P T T I I E V
46  N G D T V I I K T Q S T F K N
61  T E I S F K L G V E F D E T T
76  A D D R K V K S I V T L D G G
91  K L V H V Q K W N G Q E T S L
106 V R E M V D G K L I L T L T H
121 G T A V C T R T Y E K Q A W S
136 H P Q F E K *
    
```

WSHPQFEK = Strep-Tag-II

## 10 Kits

Natrix Formulation Kit HR2-116	Hampton Research
Nucleic Acid Mini Screen Kit HR2-118	Hampton Research
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel
pGEM-T-Klonierungskit	Promega

## 11 Sonstige Materialien

Kieselgelplatten 60 F254	Merck
Nitrocellulose-Filter HAWP 0,45 µm, 25 mm	Millipore
Phosphofilm	GE Healthcare
Quarzküvette	Hellma
StrataClean Resin	Stratagene
Strep-Tactin-beschichtete magnetische Partikel	Qiagen
Streptavidin-beschichtete magnetische Partikel Dynabeads M-280	Invitrogen
Ultrafiltrationseinheiten Amicon Ultra-4	Millipore
Ultrafiltrationseinheiten Microcon YM-30, YM-3	Millipore
96-well-CrystalQuick-Kristallisationsplatten	Greiner Bio-One
24-well-Linbro-Kristallisationsplatten	ICN Biochemicals Inc.

## 12 Software

Corel Draw, Corel Photo-Paint	Corel
Geneious	Biomatters Ltd.
HKL 2000 Suite	HKL Research Inc.
Image Quant NT	Amersham Biosciences
Office Suite 2007	Microsoft
Quantity One	Biorad
Sigma Plot	Systat Software